مجموعه مقالات

اولین کنفرانس بین المللی زیست شناسی گیاهان دارویی

دانشگاه قم، اسفند ماه ۱۴۰۱



شماره ۱


بسم الله الرحمن الرحيم

کنفرانس بین المللی زیست شناسی گیاهان دارویی

International Conference on BIOLOGY OF MEDICINAL PLANTS

محورهای همایش:

- فیزیولوژی تغذیه و متابولیسم گیاهان دارویی
- سیستماتیک و تنوع زیستی گیاهان دارویی
- زیست فناوری و ژنتیک گیاهان دارویی
- بیوشیمی و متابولیت های ثانویه گیاهان دارویی
- رشدونمو و تکوین گیاهان دارویی
- جلبک ها و گلسنگ های دارویی
- مردم گیاهشناسی و سنت های دیرینه
- کاربرد گیاهان دارویی در صنایع مختلف



ISC
Islamic World Science Citation Center
کد اختصاصی: ۰۱۲۲۰-۴۸۳۷۰

دانشگاه قم

نهم الی یازدهم اسفند ماه
۱۴۰۱

bio-medplant@qom.ac.ir
www.biomedplant.ir
@bio_medicinalplants

برای ورود به سایت کنفرانس
کیوآرکد را اسکن نمایید

مجموعه مقالات ارائه شده در

اولین کنفرانس بین المللی
زیست شناسی گیاهان دارویی

جلد اول

بیوشیمی و متابولیت های ثانویه گیاهان دارویی

دانشگاه قم – اسفند ۱۴۰۱

فهرست مطالب

دیباچه i

پیام انجمن فیزیولوژی گیاهی ایران ii

قطعنامه کنگره زیست گیاهان دارویی قم ۱۴۰۱ iv

کمیته علمی کنفرانس vi

کمیته اجرایی همایش vii

مجموعه مقالات کنفرانس: بیوشیمی و متابولیت های ثانویه گیاهان دارویی ۱

Antioxidants of natural products and treatment of infertility ۲

Characterization of the chemical profiles of essential oils of *Perovskia abrotanoides* Karel., an endemic plant to Golestan province ۷

Determination of furfural in the presence of sucrose and high temperature using high-performance liquid chromatography in Urmia red grape var. Shani ۲۱

Effects of *Onosma dichroanthum* Boiss. root extract on AGS human gastric cancer cell-line ۳۳

Effects of Organic Fertilizers on EO Yield and EO chemical compounds of white Savory under Dry Farming ۴۲

GC-MS analysis of the hydrodistilled essential oils from the aerial parts of (*Cannabis sativa* L.), a plant growing wild in Bandar Torkaman, Golestan Province, Iran ۵۲

In vitro evaluation of the biocidal effects of the plant *Artemisia absinthium* on a disease vector, the mosquito *Culiseta longiareolata* from the Tebessa region, Algeria ۵۹

Marine natural compounds as natural antioxidants: a brief review ۶۵

Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction (HS SPME) Based on MgAl Layered Double Hydroxide as a Fiber Coating for Analysis of *Grammosciadium platycarpum* Essential Oil ۷۲

Relationship between growth and taxan production in endophytic fungi isolated from *Corylus avellana* ۸۲

The effect of *Cakile maritima* Scop. on kinetic parameters of cabbage's guaiacol peroxidase ۹۱

The effect of hydro-ethanolic extract of sage plant (*Salvia officinalis* L.) on the expression of place preference induced by morphine in mice ۹۹

اثر رویشگاه بر عملکرد و محتویات اسانس دو جمعیت از گونه دارویی مریمگلی تماشایی ۱۰۷

اثر عصاره آبی – الکلی گیاه خوشاریزه (*Echinophora platyloba* L.) بر اضطراب در موش کوچک آزمایشگاهی ۱۱۵

اثر نوع حلال و روشهای مختلف روغنگیری بر میزان روغن، ترکیبات فنلی و فعالیت آنتیاکسیدانی بذر لیموترش محلی جهرم (*Citrus aurantifolia*)..... ۱۲۳

اثر نیتریک اکسید بر رشد و تولید استویوزید در کشت بافت گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)..... ۱۳۳

اثرات درمانی گیاهان خانواده درمنه با تأکید بر درمان سرطان سینه..... ۱۳۹

ارتباط طبیعت گیاهان دارویی با بیماری ها(به عنوان مثال کلیه)..... ۱۴۷

ارزیابی گیاه دارویی بادرشبو (رقم بومی مراغه) از لحاظ فعالیت سوپراکسید دسموتاز تحت تنش شوری ۱۵۴

استخراج آنتوسیانین ها از میوه آلوخاکی (*Prunus salicina*) و بررسی خواص ضد میکروبی آن ۱۵۹

استخراج و بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس خزه (*Pseudoleskeella catenulata* (Brid .ex schrad.) در ایران..... ۱۶۹

استفاده از کورکومین برای مقابله با استرس اکسیداتیو القاء شده در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت توسط دی- ۲-اتیل هگزیل فتالات ۱۷۷

القای رشد سلولی و تولید تاکسول توسط پیشماده در کشت سلولی فندق (*Corylus avellana*) ۱۹۱

اهمیت ترکیبات فنولی در طبیعت و صنعت..... ۱۹۸

اهمیت میکوریزها در بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی..... ۲۰۶

بررسی اثر نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز با عصاره گیاه تاج خروس وحشی ضد باکتریایی ، بیان ژن های VEGF و میزان رگ زایی در جنین جوجه..... ۲۲۲

بررسی اثر آلفا آمیلازها و مهارکننده های آن ها بر درمان دیابت ۲۳۴

بررسی اثر بسترهای مختلف کشت و کودهای زیستی و غیرزیستی بر عملکرد و مواد مؤثره گیاه دارویی زنجبیل (*Zingiber officinale* Rosc)..... ۲۴۳

بررسی اثر رویشگاه بر میزان فلاونوییدها در گیاه دارویی برازمبل ۲۵۷

بررسی اثر قارچهای اندوفیت جدا شده از گیاه *Rhabdociadium aucheri* بر روی قارچ *Fusarium oxysporum*.. ۲۶۴

بررسی اثر مهاری ترکیب فلاونوئیدی کوئرستین بر فعالیت آنزیم کربنیک انیدراز IX..... ۲۷۲

بررسی اثرات آللوپاتیک عصاره آبی گیاه دارویی اسفند (*Peganum harmala* L.) بر شاخص های جوانه زنی چند گیاه زراعی ۲۸۲

بررسی اسیدهای فنلی و خواص آنتی اکسیدانی گیاه *Artemisia annua*..... ۲۸۸

بررسی برخی از ترکیبات فیتوشیمیایی موجود دراندام های مختلف گیاه دارویی پنیرک قرمز *Malva sylvestris* L. ۲۹۵

بررسی بهترین حلال برای استخراج آلیزارین از گیاه دارویی و صنعتی روناس ۳۰۲

بررسی تأثیر موادّ تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر نرخ کالزایی گیاه خارمریم *Silybum marianum* ۳۰۸

بررسی تأثیر رویشگاه و مراحل مختلف رشد بر تغییرات بازده اسانس و ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه بابونه آناتولی Holub (*Anthemis wiedemanniana* (Fisch. & C.A. Mey.) ۳۱۵

بررسی ترکیبات اسانس درمنه معطر و درمنه برنجاسف جمع‌آوری‌شده از شمالغرب ایران ۳۲۳

بررسی توان اسیدگالیک در مقابله با اثر اکسیداتیو دی ۲-اتیل هگزیل فتالات (DEHP) در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت ۳۲۹

بررسی خواص آنتیاکسیدانی عصاره هیدرواتانولی رزماری (*Salvia rosmarinus* L.) و کاربرد آن در دوغ پاستوریزه ۳۴۳

بررسی درصد روغن و محتوای اسیدهای چرب بذر گیاه دارویی سرخارگل ۳۴۹

بررسی رشد گیاه بادرنجبویه تحت تأثیر متابولیتهای باکتری ۳۶۰

بررسی روند تغییرات متابولیت های ثانویه در گیاهان دارویی آویشن و درمنه ۳۶۷

بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره های مختلف اتانولی و استونی گلسنگ ۳۷۵

بررسی متابولیت‌های ثانویه ضدویروسی از منشأ جلبکهای سبز-آبی ۳۸۳

بررسی مقایسهای متابولیتهای ثانوی در اندامهای مختلف گیاه زرشک (*Berberis integerrima*) ۳۹۱

بررسی میزان اسیدهای چرب ژنوتیپ‌های مختلف گیاه کرچک در شرایط آب و هوایی اصفهان ۴۰۱

بررسی میزان فنل و فلاونوئید و خاصیت آنتیاکسیدانی گونه های درمنه جمع آوری شده از شمالغرب ایران ۴۱۱

بررسی نحوه انتقال دارویی ترکیبات گیاهی بر پایه Rhamnetin ۴۱۸

بررسی ویژگیهای فیزیکوشیمیایی روغن و پروفایل اسیدهای چرب در جلبک قهوهای سارگاسوم بوویانوم سواحل بوشهر ۴۲۴

بیوسنتز ترکیبات فنلی در گیاهان ۴۳۲

پاسخ ژنوتیپ‌های گشنیز (*Coriandrum sativum* L.) به منابع کود نیتروژن در شرایط رقابت با علف هرز ۴۳۶

پتانسیلهای دارویی گیاه بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium*) ۴۴۲

تأثیر الیسیتور زیستی کیتوسان بر محتوا برخی مشتقات فنلی کلپوره در شرایط کشت کالوس..... ۴۴۷

تأثیر باکتری *Pseudomonas chlororaphis* بر رشد و میزان اسیدرزمارینیک در گیاه بادرنجبویه تحت شرایط کنترل شده ۴۵۴

تاثیر اسانس روغنی (*Origanum vulgare* L.) بر فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز ۴۶۱

تاثیر آلکالوئیدهای *Nerium oleander* L. بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز گاو در شرایط *in vitro*..... ۴۷۶

تاثیر روشهای مختلف عصارهگیری بر میزان ترکیبات فنلی، تانن و فعالیت آنتیاکسیدانی شاخساره بادام کوهی (*Amygdalus scoparia*)..... ۴۹۰

تاثیر ریز مغذیها بر افزایش اسانس گل محمدی در کاشان ۵۰۰

تأثیر آللوپاتیک اسانس مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica* Bunge) و پونه (*Mentha pulegium* L.) بر جوانهزنی بذر گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) رقمهای صفه و فرامان ۵۰۹

تأثیر روشهای مختلف عصاره گیری بر مقدار ترکیبات پلی فنولی سه گیاه دارویی ترخون، نعناع و شوید..... ۵۱۷

تأثیر کود نیتروژنی و شدت نور بر برخی ترکیبات بیوشیمیایی برگ سبز چای..... ۵۲۳

تغییرات چربی و عملکرد کاملینا (*Camelina sativa*) تحت تاثیر زمان کشت و..... ۵۳۱

تکنیکهای کشت بافت جهت افزایش تولید متابولیتهای تخصصی در گیاهان دارویی ۵۳۹

تولید ترکیبات فعال زیستی در گیاهان دارویی با استفاده از باکتریهای محرک رشد ۵۴۶

خواص آنتی اکسیدانی برخی از گیاهان خانواده ی نعناع در شهرستان مراغه ۵۵۳

درمان ترکیبی آرتمیزینین و N-استیل سیستئین وضعیت شاخص های اسپرمی را تغییر می دهد..... ۵۶۳

ساپونین ها: ترکیبات فیتوشیمیایی با پتانسیل درمانی..... ۵۷۰

ساخت نانوکپسول کوئرستین و بررسی خواص آنتیاکسیدانی و زیست فراهمی آن در جهت دارورسانی هدفمند..... ۵۷۵

شگفتی طبیعت در درمان دیابت ۵۸۴

کاربرد گیاه درمنه خزری در طب سنتی و مدرن و صنایع آرایشی بهداشتی ۵۹۱

کلروژنیک اسید در گیاه قهوه: استخراج، اندازه گیری، خواص ۵۹۸

کیتوزان برای تقویت ترکیبات فنولی و تیمول گیاهچههای زنیان رشدیافته تحت تنش خشکی در کشت درون شیشه. ۶۰۸

گیاه دارویی باستانی توتون، متابولیت های ثانویه، ارزش اقتصادی..... ۶۱۴

تاثیر روشهای مختلف خشک کردن بر میزان اسانس، ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی پوست پرتقال (*Citrus sinensis*) ۶۲۲

مبانی تعیین ارزش آنتیاکسیدانی گیاهان دارویی ۶۳۱

متاآنالیز، روشی ارزشمند در تحلیل دادههای بیوشیمیایی و بالینی حاصل از تحقیقات گیاهان دارویی ۶۳۸

متابولیتهای ثانویه، خواص دارویی و استفاده سنتی از گونه های مختلف سرده *Epilobium* L. از خانواده گل‌مغربی... ۶۴۴

مروری بر برخی از عوامل موثر بر تغییرات کمی و کیفی و اثرات درمانی اسانس مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.) ۶۵۵

مروری بر تاثیر ترکیبات بیوشیمیایی یونجه زرد (*Melilotus officinalis*) بر درمان برخی از بیماری‌ها..... ۶۶۲

مروری بر ترکیبات فنولی گیاهی و اثرات محافظتی آنها در برابر بیماریها ۶۶۹

مروری بر روش‌های استخراج، فعالیت‌های بیولوژیکی و استراتژی های افزایش زیست فراهمی روتین..... ۶۷۶

مطالعه اثر کاتچین هیدرات بر سلولهای بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تیمار شده با دی ۲-اتیل هگزیل فتالات ۶۸۵

مطالعه مقدار آنتوسیانین کل در برگ سبز چای برخی اکسیشن‌های منتخب استان گیلان..... ۷۰۲

مقایسه روزنه و گرده گیاه دارویی *Lycium depressum* در استان گلستان و خراسان شمالی ۷۰۹

مقایسه روشهای استخراج ژنوم کل در گیاه دارویی *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss. ۷۱۵

نقش متابولیت های ثانویه گیاهی تولید شده در کشت بافت گیاهی در پیشگیری از آلزایمر ۷۲۷

دیباچــه

جمهوری اسلامی ایران با توجه به تنوعات محیطی و اقلیمی سرشار در زمینه گیاهان دارویی و همچنین پیشینه‌ی درخشان در طب سنتی می‌تواند به‌عنوان قطب علم و فناوری منطقه، نقش بسیار کلیدی و تأثیرگذار در پیشبرد اهداف و برنامه‌های ملی، منطقه‌ای و جهانی در حوزه‌ی سلامت، خودکفایی دارویی، ایجاد اشتغال با رویکرد اقتصاد دانش‌بنیان ایفا نماید. یکی از الزامات ایفای این نقش، داشتن منابع طبیعی و زیست پایدار و بهره‌برداری درست و بهینه از آن است. از این‌رو شایسته است امر حفاظت از رویشگاه‌های گیاهان دارویی و محصولات فرعی مرتعی و جنگلی در کشور همواره مورد توجه مدیران، کارشناسان و آحاد مردم قرار گیرد تا بسترهای لازم برای توسعه زنجیره تأمین و ارزش گیاهان دارویی فراهم شود. از طرفی اولویت ما و جهان باید حمایت و بهبود این زنجیره برای سلامت جامعه بشری باشد. در همین راستا، بررسی مشکلات و چالش‌های زیست، تولید و فرآوری گیاهان دارویی و افزایش ضریب نفوذ نوآوری‌ها و فناوری‌های نو باید از مهم‌ترین مسائل کشور در این زمینه خاص باشد . کنگره "زیست گیاهان دارویی " تلاش می کند زمینه‌های مناسب برای بررسی این موضوع را ، بین استادان، پژوهش‌گران، صنعت‌گران، مدیران، کشاورزان پیشرو، تولیدکنندگان و کلیه علاقه‌مندان این حوزه ارتباط برقرار کند، و موجب هم‌افزایی دانش در این زمینه و محورهای تعیین‌شده گردد. این رویداد جهانی، با دانشگاه قم و مشارکت انجمن فیزیولوژی گیاهی ایران و اتحادیه انجمن‌های گیاهان دارویی برگزار می‌شود.

امید است این کنگره بتواند گامی مؤثر و استوار در زیست‌بوم گیاهان دارویی کشور و همچنین بهره‌برداری پایدار از منابع طبیعی بردارد و به رشد و ارتقاء ارتباطات و تعاملات دانشگاه و صنعت در میهن عزیزمان ایران بینجامد.

اینجانب فرصت را مغتنم شمرده و از زحمات بی‌شائبه تمامی همراهان گرامی و حامیان پشتیبان در برپایی این کنگره بین‌المللی قدردانی و تشکر نموده و از پیشگاه خداوند متعال برای همگان سلامتی، بهروزی و توفیق روزافزون را مسئلت می‌نمایم.

دکتر محمدباقر رضایی

دبیر علمی کنفرانس

اسفندماه ۱۴۰۱

پیام انجمن فیزیولوژی گیاهی ایران

با استعانت از پروردگار متعال، انجمن فیزیولوژی گیاهی ایران مفتخر است که در آستانه پانزدهمین سال تأسیس خود در برگزاری کنفرانس زیست‌شناسی گیاهان دارویی در تاریخ ۹ و ۱۰ اسفند ۱۴۰۱ توسط دانشگاه قم، همکاری و مشارکت نماید. انجمن فیزیولوژی گیاهی ایران با هدف توسعه و ارتقاء علم فیزیولوژی گیاهی، برقراری ارتباط مؤثر و استوار با متخصصین این رشته و سایر رشته‌های مرتبط و استفاده بهینه از ظرفیت‌های علمی-پژوهشی کشور به همت جمعی از متخصصین، پژوهشگران و اعضاء هیات علمی در سال ۱۳۸۷ تأسیس و مشغول به فعالیت شد. شایان ذکر است که این انجمن تاکنون نشست‌های تخصصی، کارگاه‌های آموزشی و همایش‌های متعدد از جمله هفت کنفرانس ملی فیزیولوژی گیاهی در دانشگاه‌های بزرگ کشور از جمله صنعتی اصفهان، یزد، تربیت مدرس، زنجان و علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برگزار نموده است. همچنین، این انجمن حمایت از برگزاری کنفرانس‌های ملی و بین‌المللی بسیاری در زمینه علوم زیستی، آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی، تغذیه گیاهی، کشاورزی در مناطق خشک و علوم و تکنولوژی بذر را در کارنامه آموزشی و پژوهشی خود ثبت نموده است.

اگرچه استفاده از گیاهان به عنوان دارو از زمان‌های خیلی دور در جوامع بشری متداول بوده است، با این وجود در سال‌های اخیر استفاده از محصولات دارویی گیاهی به دلیل داشتن منشأ طبیعی و احتمالاً با عوارض جانبی کمتر در مقایسه با داروهای شیمیایی مورد توجه و علاقه شدید مردم سراسر جهان قرار گرفته است. برای بسیاری از گیاهان دارویی، تمرکز اولیه تحقیقات عمدتاً در زمینه فیتوشیمی و فارماکوگنوزی این گیاهان بوده است. قابلیت اصلی گیاهان دارویی، تولید متابولیت‌های ثانویه به عنوان ترکیبات زیست فعال واجد ارزش دارویی و درمانی می‌باشد. این ترکیبات بسیار متنوع شامل ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، روغن‌های ضروری، استروئیدها و سایر فرآورده‌های ثانویه گیاهی هستند که علاوه بر ارزش دارویی، در صنایع شیمیایی، عطرسازی و غذایی کاربرد فراوان دارند. حضور متابولیت‌های ثانویه در گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف گیاهی بسته به شرایط محیطی بسیار متنوع می‌باشد. این ترکیبات مستقیماً در رشد و نمو گیاه مورد استفاده قرار نمی‌گیرند و فاقد نقش ساختاری هستند. با این وجود، به لحاظ اکوفیزیولوژی، در واکنش‌های تدافعی گیاه در مقابل پاتوژن‌ها، حشرات و گیاه‌خواران، برقراری روابط همزیستی و سازگاری گیاه با تنش‌های غیرزیستی نظیر گرما، خشکی، شوری، فلزات سنگین و پرتوهای ماورای بنفش مشارکت دارند. سازوکار شیمیایی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌تواند در عین دخالت در واکنش‌های دفاعی گیاه دارای اثرات بالقوه دارویی و درمانی برای انسان باشد. به‌طوری‌که فعالیت نوروتوکسین برخی متابولیت‌های ثانویه گیاهی در برابر گیاهخواری از طریق تأثیر بر سیستم عصبی مرکزی انسان در تهیه داروهای ضد افسردگی، آرام‌بخش، شل‌کننده عضلات و بی‌حس‌کننده ها مشارکت مؤثری داشته است. کیفیت و کمیت متابولیت‌های ثانویه و عملکرد گیاهان دارویی به‌طور قابل‌توجهی تحت تأثیر عوامل محیطی نظیر دما، شدت نور، میزان رطوبت، شرایط خاک و حضور جمعیت‌های میکروبی و جانوری خاک تغییر می‌کند. بنابراین، مطالعه بیشتر و عمیق‌تر برای ایجاد شرایط رشدی و محیطی مناسب، شناسایی اثرات تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی بر متابولیسم ثانویه، استفاده از روش‌های کشت سلول و بافت به منظور اصلاح ژنتیکی برای دستیابی به کیفیت و کمیت بالاتر در تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی بسیار ضروری است. مطالعه در زمینه شرایط رشد گیاهان دارویی، علاوه بر اینکه می‌تواند آگاهی و شناخت از سازوکار عمل و توانایی فراورده‌های ثانویه گیاهی در مقابله با شرایط محیطی ارتقاء بخشد، گامی

مفید در راستای بهینه‌سازی کارآمد و پایدار تکنیک‌های کشت در شرایط محیطی مختلف با هدف افزایش کیفیت و کمیت متابولیت‌های ثانویه در گیاهان خواهد بود. شناسایی و کلونینگ ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی این ترکیبات به کمک مهندسی متابولیک می‌تواند علاوه بر بهبود تحمل گیاه در مقابله با تنش‌های محیطی، گام مؤثری در جهت تحریک سنتز متابولیت‌های ثانویه در سیستم‌های کشت گیاهی به کمک تکنیک‌های زیست‌فناوری مدرن باشد. بدیهی است تعامل هرچه بیشتر و همکاری سازنده‌تر بین متخصصین و پژوهشگران حوزه فیزیولوژی گیاهی، زیست‌فناوری گیاهی، ژنتیک گیاهی، فیتوشیمی و فارماکوگنوزی می‌تواند در تحقق اهداف مرتبط با هر تخصص و در نهایت رشد و توسعه زیرساخت‌های پایدار در تولیدات گیاهی دارویی کشور سهم بسزایی داشته باشد.

امید است که کنفرانس زیست‌شناسی گیاهان دارویی بتواند گامی مؤثر و مفید در راستای آشنایی با آخرین دستاوردهای پژوهشی در زمینه گیاهان دارویی، ارتباط و تبادل اطلاعات علمی بین اساتید، متخصصین، پژوهشگران و دانشجویان علاقمند و معرفی محققان و دانش‌آموختگان دانشگاهی توانمند این حوزه با هدفمند نمودن پژوهش‌های علمی مربوطه باشد.

دکتر مریم شهبازی

رئیس کمیته علمی کنفرانس و رئیس هیات مدیره انجمن فیزیولوژی گیاهی ایران
اسفندماه ۱۴۰۱

قطعنامه کنگره زیست گیاهان دارویی قم ۱۴۰۱

به نام خدای مهربان

با یاری ایزد منان و همیاری انجمن فیزیولوژی گیاهی ایران، اتحادیه انجمن‌های گیاهان دارویی و دانشگاه قم، اولین کنفرانس بین المللی زیست‌شناسی گیاهان دارویی در سال جهانی علوم پایه در روزهای نهم و دهم اسفند ماه سال ۱۴۰۱ با شرکت متخصصین بین المللی، اعضای هیات علمی دانشگاه‌ها، مراکز و موسسه‌های پژوهشی، کارشناسان و دانشجویان تحصیلات تکمیلی در شهر مقدس قم برگزار شد. ارائه آخرین نوآوری‌ها و دستاوردهای علمی در کنفرانس زیست شناسی گیاهان دارویی در زمینه علوم مرتبط و ارائه راه‌حل‌های مناسب در مورد چالش‌های موجود کشور می‌تواند برای نیل به حفظ منابع طبیعی و تنوع زیستی با ارزش کشور و توسعه گیاهان دارویی و بهره‌برداری مناسب جهت ارتقا سطح سلامت جامعه مفید واقع شود.

شرکت‌کنندگان در این کنفرانس خواهان توجه بیشتر متخصصین، پژوهشگران، برنامه‌ریزان و مسئولان اجرایی کشور به موارد زیر می‌باشند:

با عنایت به اهمیت و جایگاه علم زیست‌شناسی به عنوان یکی از رشته‌های علوم پایه و نظر به توانایی‌های قابل توجه جامعه زیست‌شناسان کشور و غنای کشور ایران از نظر پوشش گیاهی بویژه گیاهان دارویی، شرکت‌کنندگان این کنفرانس بر توجه بیشتر به آموزش و پژوهش بنیادی و پایه در حوزه گیاهان دارویی تاکید نمودند.

با توجه به تهدید تنوع زیستی کشور در اثر دخالت های بی‌رویه انسانی و افزایش روزافزون تعداد گونه‌های در معرض خطر انقراض و دانش سنتی مرتبط با آنها، شرکت‌کنندگان این کنفرانس بر ضرورت حساسیت و توجه بیشتر جامعه علمی، سازمان‌های دولتی و غیردولتی و نیز آحاد مردم بر حفظ این ذخایر ارزشمند و برنامه‌ریزی جهت پیشگیری از برداشت بی‌ضابطه گیاهان دارویی و ارائه سازوکار نظارتی در راستای بهره‌برداری علمی و کنترل شده به عنوان یک اولویت تاکید نمودند.

شناسایی گیاهان دارویی بومی و بومزاد کشور و شناخت یافته‌ها و دانش سنتی مرتبط با آنها، تعیین پروفایل مواد موثره در آنها به منظور معرفی پتانسیل و شناسنامه‌دار کردن این گونه‌ها در اولویت قرار گیرد.

شرکت‌کنندگان این کنفرانس ضمن اعلام آمادگی خود جهت کمک به تصمیم‌سازی و برنامه‌ریزی در سطح کلان کشور در حوزه‌های مرتبط با گیاهان دارویی با تاکید بر علوم نوین و استفاده از توانمندی‌های علمی و تخصصی انجمن فیزیولوژی گیاهی ایران و اتحادیه انجمن‌های گیاهان دارویی تاکید دارند.

تسهیل ایجاد شرکت‌های دانش بنیان و ایجاد شرکت‌های حدواسط از قبیل شتابدهنده‌ها جهت تکمیل زنجیره ایده تا محصول و توسعه فناوری مواد اولیه دارویی، بهداشتی و مکمل‌ها با حمایت‌های مادی و معنوی دولت و سازمان‌های مربوطه، همچنین زمینه‌سازی به منظور کارآفرینی و رونق اشتغال، بازاریابی، برند سازی و صادرات مورد تاکید قرار گرفت.

استفاده کاربردی از نتایج پژوهش‌های حوزه گیاهان دارویی در دانشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی کشور توسط سازمان‌های دولتی ذیربط از قبیل وزارت جهاد کشاورزی، بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، صنایع داروسازی و شرکت‌های خصوصی مورد تاکید می‌باشد.

از نظر شرکت‌کنندگان این کنفرانس، ایجاد پالایشگاه‌های تخصصی و به روزرسانی و اقتصادی کردن روش‌های استخراج مواد طبیعی و توسعه صنایع تبدیلی به منظور جلوگیری از صادرات گیاهان دارویی به صورت خام و استاندارد سازی تولید فرآورده‌های طبیعی حائز اهمیت ویژه می‌باشد.

برنامه‌ریزی علمی جهت توسعه کاشت و پرورش ارگانیک و سالم گونه‌های اقتصادی دارویی با بهره‌گیری از متخصصین دانشگاهی کشور ضروری می‌باشد.

ارتقا سطح آمادگی فناوری در حوزه گیاهان دارویی از طریق گسترش ارتباطات بین‌المللی جهت تبادل علوم و فناوری های حوزه زیست‌شناسی، فیتوشیمی، زیست‌فناوری و تولید مواد موثره دارویی ضروریست در اولویت قرارگیرد.

شرکت‌کنندگان در این کنفرانس از همکاری‌های همه‌جانبه و مجدانه ریاست محترم، معاونین و مدیران محترم، اعضای محترم هیات علمی، دانشجویان و کارکنان عزیز دانشگاه قم و مسئولین و مدیران محترم اجرایی شهر و استان قم در برگزاری شایسته اولین کنفرانس بین‌المللی گیاهان دارویی که زمینه تبادل یافته‌های علمی و پژوهشی صاحب‌نظران این حوزه را فراهم آورد، صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

کمیته علمی کنفرانس

رئیس کمیته علمی: دکتـر مریم شهبازی

دبیر کمیته علمی: دکتـر محمد باقر رضایی

اعضا

- آقای دکتر محمد باقر رضایی، رئیس انجمن اتحادیه انجمنهای گیاهان دارویی ایران
- خانم دکتر مریم شهبازی، دانشیار زیست شناسی گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
- آقای دکتر محسن شریفی، دانشیار فیزیولوژی گیاهی دانشگاه تربیت مدرس تهران
- خانم دکتر فائزه قناتی، استاد فیزیولوژی گیاهی دانشگاه تربیت مدرس تهران
- آقای دکتر مرتضی یوسف زادی، استاد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه قم
- آقای دکتر رضا شیخ اکبری مهر، استادیار سیستماتیک گیاهی، دانشگاه قم
- آقای دکتر منصور شریعتی، استاد فیزیولوژی گیاهی دانشگاه اصفهان
- آقای دکتر علی اکبر احسانپور، استاد فیزیولوژی گیاهی دانشگاه اصفهان
- آقای دکتر وحید نیکنام، استاد فیزیولوژی گیاهی دانشگاه تهران
- آقای دکتر پرویز احسان زاده، دانشیار زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه صنعتی اصفهان
- آقای دکتر افشین توکلی، دانشیار زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه زنجان
- آقای دکتر منصور افشارمحمدیان، دانشیار فیزیولوژی گیاهی دانشگاه گیلان
- آقای دکتر حمیدرضا صادقی‌پور، دانشیار فیزیولوژی گیاهی دانشگاه گلستان
- خانم دکتر مهناز اقدسی، دانشیار فیزیولوژی گیاهی دانشگاه گلستان
- آقای دکتر نادر چاپارزاده، استاد فیزیولوژی گیاهی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
- خانم دکتر سمر خیامیم، بانک ژن ملی ایران، موسسه تحقیقات و اصلاح بذر و نهال
- آقای دکتر علی اکبر قطبی راوندی، استادیار فیزیولوژی گیاهی دانشگاه شهید بهشتی
- خانم دکتر رویا رضوی زاده، دانشیار فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه پیام نور اصفهان
- خانم دکتر لیلا شبانی، دانشیار فیزیولوژی گیاهی دانشگاه شهر کرد
- خانم دکتر پرژک ذوفن، عضو هیات علمی فیزیولوژی گیاهی دانشگاه شهید چمران اهواز
- خانم دکتر عذرا صبورا، دانشیار فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه الزهرا
- خانم دکتر لیلا زرندی، استادیار فیزیولوژی گیاهی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
- خانم دکتر سارا خراسانی نژاد، استادیار فیزیولوژی گیاهان باغی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
- آقای دکتر مرتضی ابراهیمی، رئیس پژوهشکده گیاهان دارویی اصفهان
- آقای دکتر علی جلیلیان، عضو هیات علمی پژوهشکده گیاهان دارویی اصفهان

کمیته اجرایی همایش

دبیر اجرایی: دکتر مرتضی یوسف زادی

دبیرخانه کنفرانس:

مسئول: دکتر رضا شیخ اکبری مهر

اعضاء: زهرا بی‌غم، زهره قنبریان، نرگس لطیفی، کوثر ناصری، امیرحسین نصیری همراه

کمیته اسکان و پذیرایی :

مسئول: مهندس ابولقاسم سجادی

اعضاء: امیرحسین نصیری همراه، حمیدرضا رازقی، محمدعلی حیدری

کمیته سالن و اجرا :

مسئول: دکتر حسین نبی زاده

اعضاء: کوثر ناصری، سیدمحمدسجاد سجادی، زینب نادرپور، فاطمه علی‌مددی

کمیته نمایشگاه و غرفه ها :

مسئول: دکتر ابراهیم چراغی

اعضاء: حمیدرضا رازقی، محسن نوری، محمدعلی حیدری، امیرمحمد علیوردی لو

کمیته پذیرش و امور دبیرخانه:

مسئول: دکتر میثم مسعودی

اعضاء: هاجر شیروانی، زهرا خوانساری، فاطمه یزدانی‌تنها، نرگس لطیفی

دبیر امور اجرایی کنفرانس: دکتر غلامرضا راونجی

مجموعه مقالات کنفرانس:

بیوشیمی و متابولیت های ثانویه گیاهان دارویی

Antioxidants of natural products and treatment of infertility

Zahra Mirzakarimi, Zeinab Toluei*

Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, Iran

Abstract

Infertility is a major issue worldwide. Sexual dysfunction has many etiological factors, including physical and psychological conditions. Today, various methods are used to treat infertility, including hormone therapy, surgery, and assisted reproductive technology. Some of these methods are either very expensive or can have inappropriate effects on infertility treatment. Most of the infertile couples are looking for a safe, effective and low-cost treatment method.

The use of natural products such as herbs is an affordable and available treatment option for infertility. Several studies have been conducted on the antioxidant properties of natural products and androgenic activity in reproduction factors and hormones. On the other hand, the use of experimental treatment in current conventional methods without sufficient scientific evidence is increasing. In this paper, we study and collect some of the recent scientific researches conducted for the treatment of infertility using natural products.

Keywords: Infertility treatment, Natural products, Antioxidants, Herbal extracts

* ztoluei@kashanu.ac.ir

1. Introduction

Infertility, the inability of couples to conceive after one year of regular unprotected sex, is a major issue worldwide. Statistically, 10-16% of couples have infertility problems, of which 40% are related to men and 60% are related to women (Weng, 2018). Reproduction problems are due to various factors such as infections, genetic disorders, drugs, age, social and environmental factors, etc. (Zhao, 2019 and Sohrabvand, 2017). Evidence from a recent study shows that the incidence of infertility due to oxidative stress (OS) is increasing. One of the reasons is the imbalance between reactive oxygen species (ROS) and its protective factors, it means antioxidants. It seems that at the controlled level, some OS facilitates physiological reproductive functions, but at higher levels in pathological process in the genital system, and leading to infertility (Noh, 2020).

1.1 Infertility and oxidative stress

Antioxidants are the first line of defense against free radicals produced by oxidative stress, which can eliminate OS and reduce the incidence of cancer (Noh, 2020). Malondialdehyde (MDA) is an indicator for measuring lipid peroxidation products in the testis. An increase in the level of MDA leads to severe peroxidative damage, which causes infertility (Thang, 2020). Biological membranes, such as sperm, are vulnerable to the effects of ROS. Excessive production of ROS in the reproductive system can damage the DNA integrity in the sperm nucleus and cause dysfunction in spermatogenesis (Jaradat, 2019). Destruction of Leydig cells causes the cessation of testosterone production and spermatogenesis, because sperm production depends on testosterone from the differentiation of Leydig cells.

Activation of NF-κB by oxidative stress leads to stimulation of pro-inflammatory response and regulation of endothelin transformations and apoptosis of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF-α (Noh, 2020). Pathogenic bacteria in the uterus cause inflammation and histopathological lesions in the endometrium. These bacteria in the endometrium have complex signaling TLR-4. The secretion of chemokines and cytokines such as TNF-α and interleukins 6 and A1 stimulate the expression of TNF-α and IL-A1 genes. TNF-α and IL-A1 stimulate the potent chemotactic factors IL-8 and MCP-1 proteins. Finally, these factors lead to the accumulation of neutrophils for phagocytosis of invading pathogens in the uterine lumen (Noh, 2020).

1.2 Natural products and infertility treatment

In this section, we study the effects and mechanisms of plant extracts and natural products. From plants and natural products to treat infertility for thousands of years in the countries of the world; Such as: Iran, India, China and other countries have been used (Mohammad Rahimi, 2020). Recent studies show that the administration of plant extracts is effective in improving sperm parameters, androgen status and fertility index. The anti-mutagenic and protective effects of many classes of plant compounds are mainly attributed to flavonoids and their phenolic derivatives (Noh, 2020). Antioxidants inhibit excess free radicals, deactivate them, modulate hormonal activity and treat the resulting damage. Natural products include; Plants, animals and fungi are the source and can be used in various extracts, compounds and formulas. Natural products, including plant extracts, have potential effects on improving reproductive performance. Natural products should be chosen carefully. Improper selection causes acute toxicity and adverse effects on fertility, such as nicotine and tryptophan glycoside (Mohammad Rahimi, 2020). The antioxidant capacity of phenolic and flavonoid compounds has been used many times

in in vivo and in vitro systems (Noh, 2020). Many natural products have been used in the treatment of infertility; the following table summarizes the studies conducted in this field:

Table 1: Natural products for treating infertility

Natural product	Type	Type of study	Male or Female	Description	Reference
Phoenix dectylifera	Plant	In vitro	Male	Effect on Sertoli Cells-Activation of Spermatogenic stem cells	(Noh, 2020)
Trigonella foenum graecum	Plant	In vitro	Male	Reduction of lipid peroxidation- Increasing the activity of antioxidant	(Jaradat, 2019)
Allium Cepa	Plant	In vitro	Male	Protection of Testicles and sperm against Cadmium-Recovery of sperm parameters	(Jaradat, 2019)
Rosa damascena	Plant	In vitro	Male	Increase the Number and motility of Sperm-Abnormal sperm reduction	(Weng, 2018)
Achillea millefolium	Plant	In vivo	Male	Increased sperm motility	(Noh, 2020)
Allium sativum	Plant	In vivo	Male	Increase in Testicular weight, sperm count and Motility- Reduction of sperm abnormalities	(Musavi, 2018)
Tribulus trristris	Plant	In vivo	Male	Increase in testicular weight and sperm count	(Khaleghi, 2018)
Eurycoma longifolia	Plant	In vivo	Male	Increase in sperm count and testosterone concentration	(Noh, 2020)
Mucuna puriens	Plant	In vivo	Male	Improvement of sperm parameters and endocrine level	(Luthfi, 2015)
Butea superba	Plant	In vivo	Male	Increased number and concentration of sperm without interference in testicular yield	(Musavi, 2018)
Echium amoenum	Plant	In vivo	Male	Increased LH, FSH, sperm motility and the number of Leydig cells	(Noh, 2020)
Zingiber officinale	Plant	In vivo	Male	Increased testosterone, survival, sperm motility and maintain sperm morphology	(Jaradat, 2019)
Nigella setive	Plant	In vivo	Male	Improve reproductive performance-Increased testosterone level and testicular activity	(Dutta, 2018)
Lunasia amara	Plant	In vivo	Male	Increased the number and motility of the testicular sperm	(Barati, 2020)
Camellia sinensis	Plant	In vivo	Male	Improve sperm and testicular parameters and sex hormones	(Jaradat, 2019)
Withania somnifera	Plant	In vivo	Male	Stimulate the growth of the testicular, Gonadotropin secretion	(Abarikwu, 2020)
Panax ginseng	Plant	In vivo	Male	Recovering the number of Leydig and Sertoli cells, Create sperm Reinforcement process	(Kim, 2018)
Apis mellifera	Animal	In vivo	Male	Increase the number of sperm and parameters of sperm	(Noh, 2020)

Pro polis	Animal	In vivo	Male	Improvement of sperm parameters and natural sperm morphology- treatment of testicular damage	(Noh, 2020)
Antrodia cinnamomea	Fungi	In vitro	Male	Increasing the number and motility of sperm-reducing abnormal sperm	(Noh, 2020)
Evodiae rutaecarpa	Plant	In vitro	Female	Ovarian protection against 4-Vinyl cyclohexane diepoxide	(Noh, 2020)
Perilla frutescens	plant	In vitro	Female	Prevent abortion, The endometrium reception level regulator for fetal implantation	(Noh, 2020)
Astragalus membranaceus	Plant	In vivo	Female	Therapeutic treatment of endometrial hyperplasia and Ovarian function disorder-Increased blood estradiol levels	(Noh, 2020)
Cinnamomum verum	Plant	In vivo	Female	Improve insulin resistance and increased serum FSH levels in PCOS	(Weng, 2018)
Milicia excelsa	Plant	In vivo	Female	Sexual strength strengthening-Synchronizing the activity of the Hypothalamus-Pituitary-Gonad with estradiol and progesterone production	(Noh, 2020)
Schisandra chinensis	Plant	In vivo	Female	Has anti-inflammatory and anti-diabetic effects- Treatment of hyperprolactinemia and prolactima	(Noh, 2020)
Seneca biafrae (olive and Hierm) J Moor	Plant	In vivo	Female	Induction of puberty initiation and ovarian folliculogenesis-Increased activity of estrogen, progesterone, LH, FSH	(Noh, 2020)
Royal jelly	Animal	In vivo	Female	Stimulation of folliculogenesis-Increased Ovarian weight, Serum level of progesterone and estradiol	(Noh, 2020)

Conclusion

As said, infertility caused by oxidative stress is increasing. Antioxidants can deal with oxidative stress and restore damage. On the other hand, infertile couples choose low-cist, safe and effective treatments due to individual and social problems. According to the contents mentioned; It can be said that natural products can be an appropriate alternative and new to the methods in this field (Nassibeh, 2021).

Reference

Seungjin Noh, A. G. (2020). Role of Antioxidant Natural Products in Management of Infertility: A Review of Their Medicinal Potential. Antioxidants. 9(10): 957. PCMID: PMC7600260.

Elaheh Ouladsahebmadarek, G. S. (2016). The effect of compound herbal remedy used in male infertility on spermatogenesis and pregnancy rate. International Journal of women's Health and Reproduction Science. 4(4): 185-188.

Wang Shu Chiu, W. S. (2018). The Therapeutic Effect of Traditional Chinese Medicine for Poor Semen Quality in infertile Male. Journal of Clinical Medicine. 7(9): 239. PMC6162825.

Zhou Shao Hu, D. Y. (2019). Traditional Chinese Medicine as a Remedy for Male Infertility: A review. World Journal of men's Health. 37(2): 175-185.

Erfaneh Barati, H. N. (2020). Oxidative Stress and Male Infertility: Current Knowledge of Pathophysiology and Role of antioxidant therapy in Disease Management. Cellular and Molecular Life Science. 77(1): 93-113.

Farnaz Sohrabvand, S. M. (2017). Improvement in Sperm Parameters with Traditional Iranian Remedy: A Cast Report. Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 22(2): 223-236.

Nidal Jaradat, A. N. (2019). Herbal Remedy Used for the Treatment of infertility in males and females by Traditional Healers in the areas of the West Bank/Palestine. BMC Complementary and Alternative Medicine. 19(1): 194. PCMID: PMC6668085.

Sunny O Abarikwu, C. L. (2020). Plant of Management of Male Infertility. Andrologia. 52(3): e13509.

Hadis Musavi, M. T. (2018). Effect of garlic (allium sativum) on Male infertility: A Systematic Review. Journal of HerbMed Pharmacology. 7(4): 306-312.

Muhammad Ja'far Luthfi, M. M. (2015). Medicinal Plant: A Prospect in Developing Male Fertility Enhancing Agent. Biology, Medicine, & Natural Product Chemistry. 4(2): 41-47.

Kim Kwan-Ii, J. J. (2018). The Effectiveness of Korean Medicine treatment in Male Patients with Infertility: A Study Protocol for a Prospective Observational Pilot Study. Medicine. 97(1): e9696. PMCID: PMC5794379.

Sara Khaleghi, M. B. (2017). Tribulus Terrestris Extract Improves Human Sperm Parameters In vitro. Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 22(3): 407-412. PMCID: PMC5871152.

Ahmadi, B. (2020). Effect of Herbal Medicine on Fertility Potential in Experimental Animals-an Update Review. Materia Socia Medica. 32(2): 140-147.

Madiseh Mohammad Rahimi, M. M. (2020). Assessment of the Toxicity Effects of Nicotine on Sperm and IVF and the Potential Protective Role of Silymarin- an Experimental Study in Mice. Middle East Fertility Society Journal.26(1): DOI:10.1186/s43043-020-00025-4. Corpus ID: 214732088.

Thang Vu Ngoc, T. N. (2020). In vivo Efficacy TXCB, A Vietnamese Herbal Medicicne Prescription, on Seminal Quality Serum Testosterone, and Malondialdehyde Concentration in Rabbits. Natural Product Communications. 25(1): DOI:10.1177/1934578x20983144.

A. Ramalan Mansur, B. S. (2021). Effects of hydrometra hypocotyls extract of Borassus aethiopum on Sperm and Gonadal Indices of Male Wistar Rats. Journal of Medicinal Plants Research. 15(11): 515-521.

Sulango Dutta, P. S. (2018). Medicinal Herbs in the Manegment of Male Infertility. Journal of Pregnancy and Reproduction. 2(1): e13509. Doi: 10.1111/and.13509.

Nassibeh Roozbeh, A. A. (2021). A Systematic Review on Use of Medicinal Plant for Male Infertility Treatment. Journal of Family & Reproductive Health. 15(2): 74-81.

Sandra L. Gray, B. R. (2016). Journal of Ginseng Research. 2016. 40(3): 251-259.

Characterization of the chemical profiles of essential oils of *Perovskia abrotanoides* Karel., an endemic plant to Golestan province

Mohammad Reza Kianasab[1], Mehdi Nekoei[1], Behnam Mahdavi[2] and Majid Mohammadhosseini[1*]

[1]Department of Chemistry, College of Basic Sciences, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran
[2]Department of Chemistry, Faculty of Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

Abstract

The present study describes the potential capabilities of three different extraction techniques, namely hydrodistillation (HD), solvent–free microwave extraction (SFME) as well as headspace solid–phase microextraction (HS–SPME) to isolate the essential oils and volatile fractions from the flowers, leaves and stems of *Perovskia abrotanoides* Karel. in combination with chromatographic analysis using by GC and GC–MS instrumentations. Using the HD method, 21, 25 and 21 constituents were identified in the essential oils from the flowers, leaves and the stems of *P. abrotanoides* Karel. respectively accounting for 95.1, 95.1 and 96.2% of the oil profiles. By means of SFME, 33, 34 and 34 components were respectively identified covering 92.7, 93.5 and 95.2% of the entire oil compositions on the same organs. Furthermore, HS–SPME resulted in recognition of 21, 15 and 11 natural compounds on the aforementioned plant organs respectively constituting 95.4%, 87.9% and 93.8% of the total volatile profiles. Regarding the general categories of the oils and volatile compositions, it is evident that in all of the corresponding profiles, both in HD and in SFME techniques, the first and second ranks were respectively due to oxygenated monoterpenes (OM) and monoterpene hydrocarbons (MH) except the stem profile of the oil obtained by HD in which oxygen containing monoterpenes and sesquiterpenes, *e.g.* OM and OS had respectively the first and second ranks. Finally, a similar trend was noted in all of the characterized profiles of the volatiles of *P. abrotanoides* Karel. (flowers, leaves and stems) with high prevalence of MH and OM using HS–SPME technique.

Keywords: Essential oil, HS–SPME, *Perovskia abrotanoides* Karel., SFME, Volatiles

* e-mail for the corresponding author: majidmohammadhosseini@yahoo.com

1. Introduction

The genus *Perovskia* Karel. belonging to Lamiaceae family and Nepetoideae subfamily is among the most important herbal genera of Iran representing a wide range of medicinal, biological and pharmaceutical activities (Olmstead, 2005; Sadeghi et al., 2020; Iraji et al., 2021). This genus, known as "Russian Sage" in the literature, consists of nine species of which three species, namely *P. scrophulariifolia* Bunge, *P. abrotanoides* Karel., and *P. Atriplicifolia* Benth. are endemic in Iran growing wild at high altitudes in the mountainous regions (2000–4500 m) mainly in southeastern, north, northeastern and central areas of the country (Mozaffarian, 1996.Different phytochemical, ethnobotanical, biological and chemotaxonomical aspects of diverse Perovskia species have been extensively discussed in a recently published review {Mohammadhosseini, 2019 #781.Different phytochemical, ethnobotanical, biological and chemotaxonomical aspects of diverse Perovskia species have been extensively discussed in a recently published review {Mohammadhosseini, 2019 #781).

The current paper aims at characterizing of the chemical profiles of the essential oils from flowers, leaves and stems of *P. abrotanoides* Karel. using traditional water–distillation (hydrodistillation: HD) and solvent free microwave extraction (SFME). Furthermore, the volatile fractions obtained from the aforementioned parts have been trapped onto the organic fibers of a commercially available SPME device and characterized under the same chromatographic conditions with those of essential oils.

2. Material and methods

2.1. Plant material

The whole plant material samples (*P. abrotanoides* Karel.) were collected during the full flowering stage on 28 May 2020 from the mountainous regions of Khosh Yeylaq wildlife shelter as one of the most beautiful areas in Golestan Province with the general geographical coordinates of 36.8214° N, 55.3422° E. The plant material was first recognized by a local botanist and a Voucher specimen of a representative sample of *P. abrotanoides* Karel. was then deposited at the herbarium of Jahade Keshavarzi, Shahrood University of Technology (JDSUT299t).

2.2. Extraction of the essential oils and volatiles from *P. abrotanoides* Karel. organs

2.2.1. Hydrodistillation

To extract the essential oils using the traditional hydrodistillation method, a modified Clevenger glassware set up was used. Accordingly, 150–g portions of the pulverized air–dried plant organs (flowers, leaves and stems) were immersed in an appropriate amount of distilled water in a 2 L round bottom flask and the hydrodistillation process was continued for 2 h, after which no increase in the volume of the extracted oil was observed. The oil was then immediately dehydrated using Na_2SO_4 and stored at the refrigerator at 4 °C till the analysis time. The mean yields of the obtained oils using the hydrodistillation technique from the plant organs (flowers, leaves and stems) based on three replicate analyses were found to be respectively as: 0.45 ± 0.02, 0.5 ± 0.05 and 0.22 ± 0.03 (%w/w) based on the weight of the plant fresh sample.

2.2.2. Solvent free microwave extraction (SFME)

A commercially available microwave instrument (Milestone SRL, South Korea) operating at the general frequency of 2450 MHz was used. The system equipped with an oven having an interior cavity with the general dimensions as reported previously by our research group (Mohammadhosseini and Nekoei, 2014; Mohammadhosseini, 2015; Pasha Zanousi et al., 2016; Mohammadhosseini, 2017). During the extraction process, the distillate was repeatedly condensed by a simple Clevenger system placed outside the cavity. Furthermore, the water condensed was continuously directed to the extraction medium. This was mainly for provision of the same conditions of humidity and temperature for the extracted oils. As the name of the technique clearly shows, there is no need to use any solvent and instead the dried plant samples are immersed in water for the preliminary hydration of the relevant external layers prior to the extraction. At a fixed power of 800 W and after 30 min., the essential oils were obtained and found to have mean yields of 0.3 ± 0.01, 0.27 ± 0.03 and 0.15 ± 0.03 regarding the weight of the fresh plant sample.

2.2.3. Headspace solid phase microextraction (HS–SPME)

Volatile fractions which have a general definition different from that of the essential oils are usually formed upon heating in a headspace above the analyzed sample. Undoubtedly, one of the most straightforward strategies for the trapping and subsequent analysis of the volatile fractions is headspace solid phase microextraction (HS–SPME) in combination with GC/MS analysis which is often known as HS–SPME–GC/MS in the literature. The fiber used in our SPME–based analysis was of polydimethylsiloxane (PDMS) type which is well–suited to adsorb the volatiles emitted from diverse samples through its active sites. In the present report, the procedure used was similar to our previous reports (Mohammadhosseini and Nekoei, 2016; Nekoei and Mohammadhosseini, 2016; Zanousi et al., 2017)with the exception of the conditioning and the desorption time being 35 and 20 min., respectively.

3. Results

3.1. General chromatograms of the essential oils and volatiles obtained from different organs of *P. abrotanoides* Karel.

Using the HD approach, 25, 25 and 21 constituent components were identified in the chemical profile of the essential oil from the flowers (Figure 1), leaves (Figure 2) and stems (Figure 3) oils of *P. abrotanoides* Karel. accounting for 95.1%, 95.1% and 96.2% of the entire profiles, respectively. Likewise, by using the SFME technique on the same organs, 33 (Figure 4), 34 (Figure 5) and 34 (Figure 6) compounds were characterized respectively covering 92.7%, 93.5% and 95.2% of the relevant chemical profiles. Finally, when using the SPME approach on flowers, leaves and stems of *P. abrotanoides* Karel., 21 (Figure 7), 15 (Figure 8) and 11 (Figure 9) constituents were recognized in the respective volatiles totally involving 96.4%, 87.9% and 93.8% of the relevant profiles.

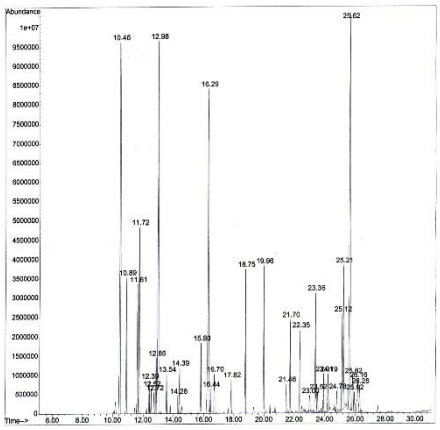


Figure 1. Chromatogram of the essential oil from the flowers of *P. abrotanoides* Karel. using hydrodistillation (HD) in combination with GC/MS (HD–GC/MS).

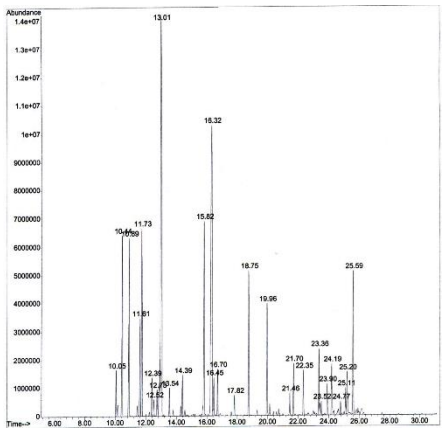


Figure 2. Chromatogram of the essential oil from the leaves of *P. abrotanoides* Karel. using hydrodistillation (HD) in combination with GC/MS (HD–GC/MS).

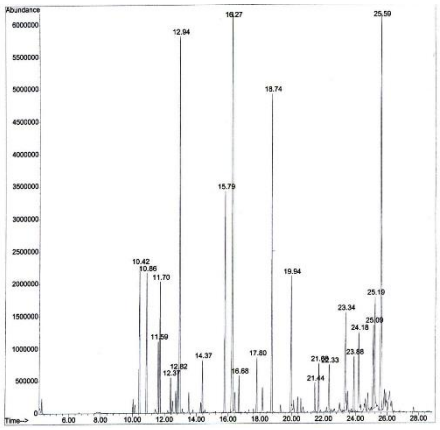


Figure 3. Chromatogram of the essential oil from the stems of *P. abrotanoides* Karel. using hydrodistillation (HD) in combination with GC/MS (HD–GC/MS).

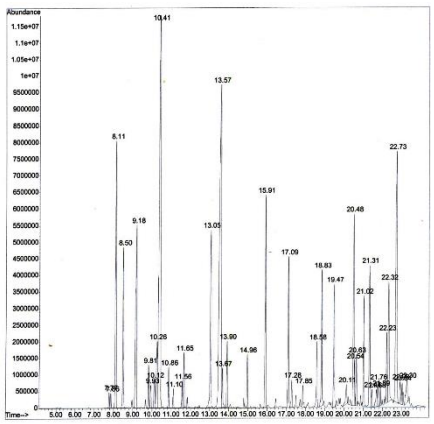


Figure 4. Chromatogram of the essential oil from the flowers of *P. abrotanoides* Karel. using solvent free microwave extraction (SFME) in combination with GC/MS (SFME –GC/MS).

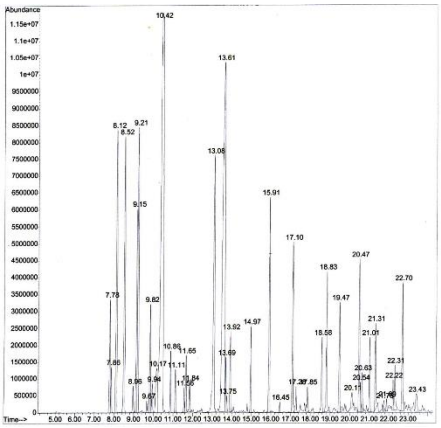


Figure 5. Chromatogram of the essential oil from the leaves of *P. abrotanoides* Karel.using solvent free microwave extraction (SFME) in combination with GC/MS (SFME –GC/MS).

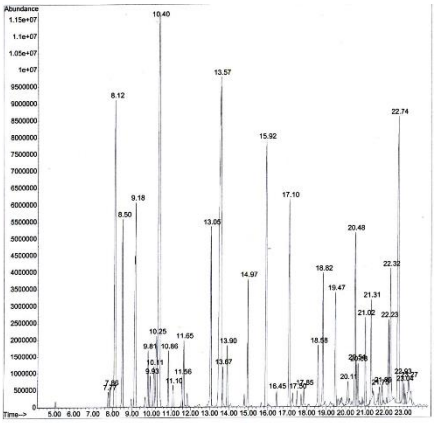


Figure 6. Chromatogram of the essential oil from the stems of *P. abrotanoides* Karel. using solvent free microwave extraction (SFME) in combination with GC/MS (SFME –GC/MS).

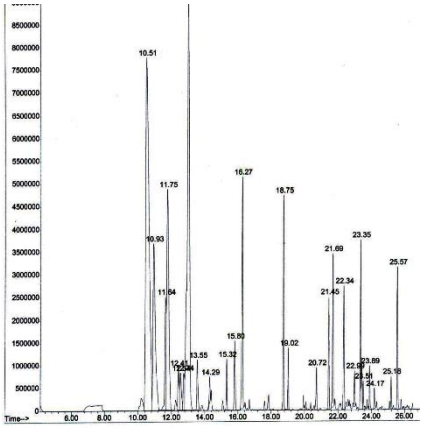


Figure 7. Chromatogram of the volatile fractions from the flowers of *P. abrotanoides* Karel. using headspace solid phase microextraction (HS–SPME) in combination with GC/MS (HS–SPME–GC/MS).

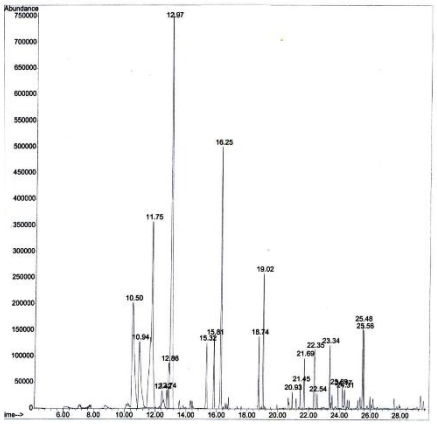


Figure 8. Chromatogram of the volatile fractions from the leaves of *P. abrotanoides* Karel. using headspace solid phase microextraction (HS–SPME) in combination with GC/MS (HS–SPME–GC/MS).

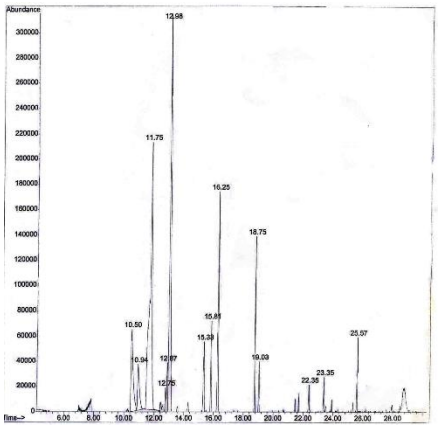


Figure 9. Chromatogram of the volatile fractions from the stems of *P. abrotanoides* Karel. using headspace solid phase microextraction (HS–SPME) in combination with GC/MS (HS–SPME–GC/MS).

4. Discussion

4.1. Comparison of abundance of natural compound groups in the essential oils and volatiles of *P. abrotanoides* Karel.

In the present report, profiling of the separated essential oils as well as volatiles from different organs of *P. abrotanoides* Karel. (Flowers, leaves and stems) subjected to GC–MS led to the identification of a broad spectrum of natural compounds belonging to different classes, *e.g.*, monoterpenes like monoterpene hydrocarbons (MH) and oxygenated monoterpenes (OM); sesquiterpenes involving sesquiterpene hydrocarbons (SH), and oxygenated sesquiterpenes (OS) along with other compounds totally considered as non–terpene hydrocarbons (NH) by the use of HD, SFME and HS–SPME approaches (see Table 1, Table 2 and Table 3).

Using the traditional HD method:

a) Flowers: Nine monoterpene hydrocarbons (26.6%), eight oxygenated monoterpenes (35.3%), eight sesquiterpene hydrocarbons (12.8%) and four oxygenated sesquiterpenes (20.4%) were recognized in the oil profile accounting for the following rank from frequency point of view: OM > MH > OS > SH.

b) Leaves: Seven monoterpene hydrocarbons (22.0%), eight oxygenated monoterpenes (59.0%), eight sesquiterpene hydrocarbons (7.4%) and three oxygenated sesquiterpenes (6.7%) were found implying: OM > MH > SH > OS.

c) Stems: Five monoterpene hydrocarbons (14.2%), eight oxygenated monoterpenes (52.6%), six sesquiterpene hydrocarbons (10.8%) and two oxygenated sesquiterpenes (18.6%) were recognized with the general rank of OM > OS > MH > SH.

Using the SFME technique:

a) Flowers: Nine monoterpene hydrocarbons (18.6%), nine oxygenated monoterpenes (45.4%), nine sesquiterpene hydrocarbons (15.1%), four oxygenated sesquiterpenes (12.3%) and two non–terpene hydrocarbons (1.3%) were obtained representing: OM > MH > SH > OS > NH.

b) Leaves: Ten monoterpene hydrocarbons (23.9%), nine oxygenated monoterpenes (53.6%), ten sesquiterpene hydrocarbons (11.4%), three oxygenated sesquiterpenes (3.5%) and two non–terpene hydrocarbons (1.1%) were totally characterized: OM > MH > SH > OS > NH.

c) Stems: Nine monoterpene hydrocarbons (21.4%), ten oxygenated monoterpenes (46.6%), ten sesquiterpene hydrocarbons (14.3%), and four oxygenated sesquiterpenes (12.3%) and only one non–terpene hydrocarbon with lower quantity (1.1%) were found leading to the following rank: OM > MH > SH > OS (like to the similar trends with that of flowers and leaves).

Using the SPME technique:

a) Flowers: Eight monoterpene hydrocarbons (51.1%), four oxygenated monoterpenes (31.1%), eight sesquiterpene hydrocarbons (11.8%) and one oxygenated sesquiterpene (2.4%) showing a rank of MH > OM > SH > OS.

b) Leaves: Five monoterpene hydrocarbons (41.6%), four oxygenated monoterpenes (40.1%), four sesquiterpene hydrocarbons (3.8%), one oxygenated sesquiterpene (2.1%) and one non–terpene hydrocarbon (0.3%) were present showing a rank of: MH > OM > SH > OS > NH.

c) Stems: Four monoterpene hydrocarbons (46.6%), four oxygenated monoterpenes (43.5%), two sesquiterpene hydrocarbons (1.8%), and one oxygenated sesquiterpene (1.9%) with the total rank similar to that of flower profile (MH > OM > SH > OS).

Regarding the general categories of the oils compositions, it is evident that in all of the corresponding profiles, both in HD and in SFME techniques, the first and second ranks were respectively due to OM and MH except the stem profile of the oil obtained by HD in which oxygen containing monoterpenes and sesquiterpenes, *e.g.* OM and OS had respectively the first and second ranks. Finally, a similar trend was noted in all of the characterized profiles of the volatiles of *P. abrotanoides* Karel. (flowers, leaves and stems) with high prevalence of MH and OM using HS–SPME technique. A simple perusal of Table 3 demonstrates that the total monoterpenes (MH and OM) were considerably higher than sesquiterpenes (SH and OS). There was also no NH except the volatile profile from the leaves of *P. abrotanoides* Karel. using the SPME technique with very low quantities of dodecanal (0.3%).

4.2. Major constituent components of the characterized profiles of essential oils and volatile fractions of *P. abrotanoides* Karel.

Using the HD method, twenty–nine, twenty–five and twenty–one constituents were identified in the essential oils from the flowers, leaves and the stems of *P. abrotanoides* Karel. respectively accounting for 95.1, 95.1 and 96.2% of the oil profiles (Table 1). Accordingly, high quantities of oxygenated monoterpenes, *e.g.*, 1,8–cineole (12.0, 24.0 and 12.9%) and borneol (12.4, 17.9 and 16.8%) along with some monoterpene hydrocarbons like α–pinene (12.3, 5.6 and 4.0%) and myrcene (4.2, 5.9 and 3.3%) were characterized. On the other hand, the other major component common in all HD profiles of the isolated oils was α–cadinol which is basically an oxygenated sesquiterpene. It

Table 1. Chemical compositions of the essential oils from the flowers, leaves and stems of *P. abrotanoides* Karel. using hydrodistillation (HD) combined with GC/MS method.

Sr. No.	Compound	Class	RI	Flower oil (%)	Leaf oil (%)	Stem oil (%)
1	α–Pinene	MH	939	**12.3 ± 0.05**	**5.6 ± 0.01**	**4.0 ± 0.01**
2	Camphene	MH	954	3.3 ± 0.01	5.5 ± 0.01	3.8 ± 0.01
3	β–Pinene	MH	979	3.1 ± 0.01	2.8 ± 0.01	1.9 ± 0.01
4	Myrcene	MH	991	4.2 ± 0.01	5.9 ± 0.01	3.3 ± 0.01
5	α-Terpinene	MH	1017	0.5 ± 0.01	0.5 ± 0.01	–
6	*p*-Cymene	MH	1025	0.5 ± 0.01	1.0 ± 0.01	–
7	Limonene	MH	1029	1.5 ± 0.01	–	1.2 ± 0.01
8	1,8-Cineole	OM	1031	**12.0 ± 0.01**	**24.0 ± 0.01**	**12.9 ± 0.01**
9	γ-Terpinene	MH	1060	0.8 ± 0.01	0.7 ± 0.01	–
10	α-Terpinolene	MH	1089	0.4 ± 0.01	–	–

11	Linalool	OM	1097	1.0 ± 0.01	1.2 ± 0.01	1.3 ± 0.01
12	Camphor	OM	1146	1.6 ± 0.01	7.0 ± 0.01	6.5 ± 0.01
13	Borneol	OM	1169	**12.4 ± 0.01**	**17.9 ± 0.01**	**16.8 ± 0.01**
14	α-Terpineol	OM	1189	0.9 ± 0.01	1.2 ± 0.01	0.9 ± 0.01
15	Linalyl acetate	OM	1257	0.7 ± 0.01	0.5 ± 0.01	1.3 ± 0.01
16	Bornyl acetate	OM	1289	3.3 ± 0.01	4.1 ± 0.01	9.4 ± 0.01
17	α-Terpinenyl acetate	OM	1349	3.4 ± 0.01	3.1 ± 0.01	3.5 ± 0.01
18	β-Caryophyllene	SH	1419	2.2 ± 0.01	1.5 ± 0.01	1.4 ± 0.01
19	β-Gurjunene	SH	1434	0.7 ± 0.01	0.7 ± 0.01	0.8 ± 0.01
20	α-Humulene	SH	1455	2.2 ± 0.01	1.3 ± 0.01	1.6 ± 0.01
21	Epizonaren	SH	1502	0.5 ± 0.01	–	–
22	γ-Cadinene	SH	1514	3.4 ± 0.01	1.8 ± 0.01	2.9 ± 0.01
23	*cis*-Calamenene	SH	1540	0.6 ± 0.01	0.4 ± 0.01	–
24	β-Calacorene	SH	1566	0.9 ± 0.01	0.9 ± 0.01	1.6 ± 0.01
25	Caryophyllene oxide	OS	1583	0.6 ± 0.01	0.4 ± 0.01	–
26	*trans*-isolongifolanone	SH	1627	2.3 ± 0.01	0.8 ± 0.01	2.5 ± 0.01
27	Cubenol	OS	1647	4.0 ± 0.01	1.6 ± 0.01	3.8 ± 0.01
28	α-Cadinol	OS	1654	**14.6 ± 0.01**	**4.7 ± 0.01**	**14.8 ± 0.01**
29	α-Bisabolol	OS	1686	1.2 ± 0.01	–	–
Total percentage				**95.1**	**95.1**	**96.2**
Monoterpene hydrocarbons (%)				26.6	22.0	14.2
Oxygenated monoterpenes (%)				35.3	59.0	52.6
Sesquiterpene hydrocarbons (%)				12.8	7.4	10.8
Oxygenated sesquiterpenes (%)				20.4	6.7	18.6
Non–terpene hydrocarbons (%)				0	0	0
Number of compounds				29	25	21

Table 2. Chemical compositions of the essential oils from the flowers, leaves and stems of *P. abrotanoides* Karel. using solvent free microwave extraction (SFME) technique.

Sr. No.	Compound	Class	RI	Flower oil (%)	Leaf oil (%)	Stem oil (%)
1	α-Thujene	MH	930	0.3 ± 0.01	0.6 ± 0.05	0.3 ± 0.01
2	α-Pinene	MH	939	**6.2 ± 0.07**	**5.5 ± 0.01**	**7.1 ± 0.05**
3	Camphene	MH	954	3.0 ± 0.02	5.4 ± 0.01	3.4 ± 0.05

4	β-Pinene	MH	979	5.1 ± 0.01	3.4 ± 0.01	6.0 ± 0.02
5	Myrcene	MH	991	–	5.6 ± 0.01	–
6	α-Phellandrene	MH	1003	–	0.2 ± 0.01	–
7	α-Terpinene	MH	1017	0.4 ± 0.06	0.5 ± 0.02	0.5 ± 0.01
8	*p*-Cymene	MH	1025	0.7 ± 0.01	1.5 ± 0.03	0.9 ± 0.02
9	Limonene	MH	1029	1.9 ± 0.03	–	1.9 ± 0.01
10	1,8-Cineole	OM	1031	**15.6 ± 0.1**	**20.5 ± 0.05**	**13.5 ± 0.03**
11	γ-Terpinene	MH	1060	0.6 ± 0.05	0.8 ± 0.01	0.8 ± 0.03
12	*cis*-Sabinene hydrate	OM	1070	0.3 ± 0.02	0.6 ± 0.05	0.3 ± 0.01
13	α-Terpinolene	MH	1089	0.4 ± 0.02	0.4 ± 0.02	0.5 ± 0.03
14	Linalool	OM	1097	0.9 ± 0.01	1.0 ± 0.02	1.1 ± 0.01
15	Camphor	OM	1146	4.1 ± 0.05	6.6 ± 0.03	3.7 ± 0.01
16	Borneol	OM	1169	**15.2 ± 0.1**	**16.2 ± 0.09**	**14.7 ± 0.06**
17	3-Cyclohexen-1-ol	NH	1181	0.7 ± 0.03	0.7 ± 0.01	0.6 ± 0.01
18	α-Terpineol	OM	1189	1.1 ± 0.03	1.1 ± 0.02	1.0 ± 0.03
19	Linalyl acetate	OM	1257	0.9 ± 0.01	1.2 ± 0.02	2.1 ± 0.01
20	Bornyl acetate	OM	1289	4.4 ± 0.02	3.7 ± 0.05	6.1 ± 0.01
21	α-Terpinenyl acetate	OM	1349	2.9 ± 0.01	2.7 ± 0.06	3.9 ± 0.01
22	Eugenol	NH	1359	0.6 ± 0.03	0.4 ± 0.02	–
23	α-Copaene	SH	1377	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.01
24	Geranyl acetate	OM	1381	–	–	0.2 ± 0.01
25	β-Caryophyllene	SH	1419	2.7 ± 0.02	2.3 ± 0.01	2.4 ± 0.01
26	β-Gurjunene	SH	1434	1.2 ± 0.02	1.2 ± 0.03	1.0 ± 0.01
27	α-Humulene	SH	1455	2.6 ± 0.01	1.9 ± 0.01	2.3 ± 0.01
28	Epizonaren	SH	1502	0.6 ± 0.03	0.4 ± 0.04	0.6 ± 0.05
29	γ-Cadinene	SH	1514	3.8 ± 0.05	2.5 ± 0.02	3.2 ± 0.05
30	δ-Cadinene	SH	1523	0.7 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.6 ± 0.02
31	*cis*-Calamenene	SH	1540	1.0 ± 0.01	0.6 ± 0.02	0.7 ± 0.01
32	β-Calacorene	SH	1566	2.1 ± 0.01	1.2 ± 0.04	1.5 ± 0.04
33	Caryophyllene oxide	OS	1583	0.3 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.02
34	*trans*-Isolongifolanone	SH	1627	1.4 ± 0.01	0.5 ± 0.03	1.6 ± 0.01
35	Cubenol	OS	1647	2.9 ± 0.01	0.9 ± 0.05	2.8 ± 0.01
36	α-Cadinol	OS	1654	**7.7 ± 0.01**	**2.4 ± 0.02**	**8.5 ± 0.05**
37	α-Bisabolol	OS	1686	–	–	0.7 ± 0.01
Total percentage				**92.7**	**93.5**	**95.2**
Monoterpene hydrocarbons (%)				18.6	23.9	21.4
Oxygenated monoterpenes (%)				45.4	53.6	46.6

Sesquiterpene hydrocarbons (%)	15.1	11.4	14.3
Oxygenated sesquiterpenes (%)	12.3	3.5	12.3
Non–terpene hydrocarbons (%)	1.3	1.1	0.6
Number of compounds	33	34	34

Table 3. Chemical compositions of the volatiles from the flowers, leaves and stems of *P. abrotanoides* Karel. using headspace solid phase microextraction (HS–SPME) technique combined with GC/MS.

Sr. No.	Compound	Class	RI	Flower (%)	Leaf (%)	Stem (%)
1	α-Pinene	MH	939	**25.8 ± 0.02**	**12.6 ± 0.03**	**8.7 ± 0.03**
2	Camphene	MH	954	**8.6 ± 0.01**	**7.1 ± 0.05**	**4.3 ± 0.02**
3	β-Pinene	MH	979	2.8 ± 0.02	–	–
4	Myrcene	MH	991	**10.1 ± 0.02**	**19.1 ± 0.04**	**31.2 ± 0.04**
5	α-Terpinene	MH	1017	1.2 ± 0.01	–	–
6	*p*-Cymene	MH	1025	1.0 ± 0.01	0.8 ± 0.01	–
7	Limonene	MH	1029	–	2.0 ± 0.05	2.4 ± 0.02
8	1,8-Cineole	OM	1031	**20.9 ± 0.03**	**25.5 ± 0.04**	**26.4 ± 0.02**
9	γ-Terpinene	MH	1060	1.2 ± 0.01	–	–
10	α-Terpinolene	MH	1089	0.4 ± 0.01	–	–
11	Camphor	OM	1146	1.5 ± 0.06	2.7 ± 0.01	3.7 ± 0.03
12	Borneol	OM	1169	**5.2 ± 0.01**	**9.9 ± 0.02**	**8.5 ± 0.08**
13	Bornyl acetate	OM	1289	3.5 ± 0.02	2.0 ± 0.01	4.9 ± 0.04
14	α-Copaene	SH	1377	0.7 ± 0.01	–	–
15	Dodecanal	NH	1409	–	0.3 ± 0.04	–
16	β-Caryophyllene	SH	1419	2.4 ± 0.01	1.3 ± 0.01	–
17	β-Gurjunene	SH	1434	1.6 ± 0.03	0.6 ± 0.03	–
18	α-Humulene	SH	1455	2.2 ± 0.01	–	1.0 ± 0.01
19	Epizonaren	SH	1502	0.6 ± 0.03	–	–
20	γ-Cadinene	SH	1514	3.2 ± 0.01	1.4 ± 0.03	0.8 ± 0.01
21	*cis*-Calamenene	SH	1540	0.5 ± 0.02	–	–
22	β-Calacorene	SH	1566	0.6 ± 0.01	0.5 ± 0.01	–
23	α-Cadinol	OS	1654	2.4 ± 0.01	2.1 ± 0.01	1.9 ± 0.01
Total percentage				**96.4**	**87.9**	**93.8**
Monoterpene hydrocarbons (%)				51.1	41.6	46.6
Oxygenated monoterpenes (%)				31.1	40.1	43.5
Sesquiterpene hydrocarbons (%)				11.8	3.8	1.8
Oxygenated sesquiterpenes (%)				2.4	2.1	1.9
Non–terpene hydrocarbons (%)				0	0.3	0

Number of compounds	21	15	11

should be also underlined that sesquiterpene hydrocarbons were not so prevalent in the obtained essential oils and the most abundant one was γ–cadinene (3.4, 1.8 and 2.9%).

Similar to the total profiles of the oils obtained using the HD approach, using SFME, 1,8–cineole (15.6, 20.5 and 13.5%) and borneol (15.2, 16.2 and 14.7%) were again among the predominant natural compounds in the separated oils from the flowers, leaves and stem profiles of *P. abrotanoides* Karel. (Table 2). Furthermore, α–pinene (6.2, 5.5 and 7.1%) and β–pinene (5.1, 3.4 and 6.0%) were MH with the third and fourth frequencies in the oil profiles obtained by SFME. In addition, a larger number of natural compounds belonging to SH group, compared to that of OS, were characterized. However, similar to HD profiles of the essential oils, α–cadinol (7.7, 2.4 and 8.5%) had the highest quantities in the aforementioned organs. It is also noteworthy that the overall amount of NH compounds was negligible (1.3, 1.1 and 0.6%). On the other hand, using the SPME technique gave rise to a rather different profile in which 1,8–cineole (20.9, 25.5 and 26.4%), α–pinene (25.8, 12.6 and 8.7%) and myrcene (10.1, 19.1 and 31.2%) were the most abundant compounds implying the high prevalence of MH and OM respectively in the characterized volatile profiles (Table 3).

4.3. Essential oils of *P. abrotanoides* Karel. in previous reports

A literature survey reveals that some authors have reported the chemical profiles of *P. abrotanoides* Karel. mostly growing wild in different parts of Iran. In accordance with these studies, the majority of the characterized profiles were dominated by the presence of considerable amounts of OM like 1,8–cineole (Sajjadi et al., 2005; Nezhadali et al., 2009; Oreizi et al., 2014; Hafez Ghoran et al., 2016) as well as camphor (Arabi et al., 2008; Morteza-Semnani, 2008) have assessed the hydrodistilled essential oils from *P. abrotanoides* Karel. Sardashti et al. (2013) have assessed the hydrodistilled essential oils from *P. abrotanoides* Karel. in Taftan Area, Sistan and Baluchestan province (Iran) at different flowering stages, namely pre–flowering, flowering and post flowering stages and implied OM as the main fractions of the studied oils with high prevalence of linalool and 1,8–cineole. In the work of Pourmortazavi et al. (2003) on the essential oils of *P. abrotanoides* Karel. (Aerial parts) using supercritical fluid extraction (SFE) and steam distillation (SD), despite the negligible difference, OM and MH constituted most of the relevant profiles with high frequency of 1,8–cineole and limonene. However, few reports are found in the literature in which non–terpene hydrocarbons were the dominant constituting group, *e.g.*, a report in Pakistan dealing with the characterization of the essential oil from the stems and leaves of *P. abrotanoides* Karel. which involved (*E*)–9–dodecenal and methyl ester derivatives of octadecanoic and hexadecenoic acid.

Acknowledgements

The financial supports of Islamic Azad University of for the performance of this study is highly appreciated.

References

Arabi, F., Moharramipour, S., Sefidkon, F. 2008. Chemical composition and insecticidal activity of essential oil from *Perovskia abrotanoides* (Lamiaceae) against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). International Journal of Tropical Insect Science 28(03): 144–150.

Hafez Ghoran, S., Azadi, B., Hussain, H. 2016. Chemical composition and antimicrobial activities of *Perovskia artemisioides* Boiss. essential oil. Natural Product Research 30(17): 1997–2001.

Iraji, M., Sadegh, M., Khaleghian, A. 2021. Anticancer effects of *Perovskia abrotanoides* hydroalcoholic extracts on MKN45 gastric cancer cells. Koomesh 23(2): 291–300.

Mohammadhosseini, M. 2015. Chemical composition of the essential oils and volatile fractions from flowers, stems and roots of *Salvia multicaulis* Vahl. by using MAHD, SFME and HS-SPME methods. Journal of Essential Oil Bearing Plants 18(6): 1360–1371.

Mohammadhosseini, M. 2017. Essential oils extracted using microwave-assisted hydrodistillation from aerial parts of eleven *Artemisia* species: Chemical compositions and diversities in different geographical regions of Iran. Records of Natural Products 11(2): 114–129.

Mohammadhosseini, M., Nekoei, M. 2014. Chemical Compositions of the Essential Oils and Volatile Compounds from the Aerial Parts ofFerula ovinaUsing Hydrodistillation, MAHD, SFME and HS-SPME Methods. Journal of Essential Oil Bearing Plants 17(5): 747–757.

Mohammadhosseini, M., Nekoei, M. 2016. Profiling Volatile Natural Compounds from Flowers, Leaves and Stems of Marrubium anisodon Using Headspace Solid Phase Microextraction in Combination with Gas Chromatographic Mass Spectrometric Determination. Journal of Essential Oil Bearing Plants 19(8): 1839–1858.

Morteza-Semnani, K. 2008. The essential oil composition of *Perovskia abrotanoides* from Iran. Pharmaceutical Biology 42(3): 214–216.

Mozaffarian, V., 1996. A Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moaser Press, Iran.

Nekoei, M., Mohammadhosseini, M. 2016. Chemical Compositions of the essential oils from the aerial parts of *Achillea wilhelmsii* using traditional hydrodistillation, microwave assisted hydro-distillation and solvent-free microwave extraction methods: comparison with the volatile compounds obtained by headspace solid-phase microextraction. Journal of Essential Oil Bearing Plants 19(1): 59–75.

Nezhadali, A., Masrornia, M., Solati, A., Akbarpour, M., Nakai Moghaddam, M. 2009. Analysis of the flower essential oil at different stages of plant growth and *in vitro* antibacterial activity of *Perovskia abrotanoides* Karal, In Iran. Der Pharma Chemica 1(1): 146–150.

Olmstead, R. 2005. A synoptical classification of the Lamiales. Synoptical Classification Vers 2.

Oreizi, E., Rahiminejad, M.R., Asghari, G. 2014. Influence of environment on glandular trichomes and composition of essential oil of *Perovskia abrotanoides* Karel. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products 9(4): e16432.

Pasha Zanousi, M.B., Nekoei, M., Mohammadhosseini, M. 2016. Composition of the essential oils and volatile fractions of *Artemisia absinthium* by three different extraction methods: Hydrodistillation, solvent-free microwave extraction and headspace solid-phase microextraction combined with a novel QSRR evaluation. Journal of Essential Oil Bearing Plants 19(7): 1561–1581.

Pourmortazavi, S.M., Sefidkon, F., Hosseini, S.G. 2003. Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from *Perovskia atriplicifolia* Benth. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(18): 5414–5419.

Sadeghi, Z., Alizadeh, Z., Khorrami, F., Norouzi, S., Moridi Farimani, M. 2020. Insecticidal activity of the essential oil of *Perovskia artemisioides* Boiss. Natural Product Research.

Sajjadi, S.E., Mehregan, I., Khatamsaz, M., Asgari, G. 2005. Chemical composition of the essential oil of *Perovskia abrotanoides* Karel. growing wild in Iran. Flavour and Fragrance Journal 20(4): 445–446.

Sardashti, A.R., Valizadeh, J., Adhami, Y. 2013. Variation in the essential oil composition of *Perovskia abrotonoides* of different growth stage in Baluchestan. Middle East Journal of Scientific Research 13(6): 781–784.

Zanousi, M.B.P., Nekoei, M., Mohammadhosseini, M. 2017. Chemical Compositions of the Essential oils from stems, leaves and fruits of *Artemisia tschernieviana* and Exploring quantitative structure-retention relationships (QSRRs) for prediction of corresponding retention indices. Journal of Essential Oil Bearing Plants 20(3): 672–687.

Determination of furfural in the presence of sucrose and high temperature using high-performance liquid chromatography in Urmia red grape var. Shani

Faezeh Ahmadpour, Rashid Jamei[1]*

[1] Department of Biology, Faculty of Basic Science and Chemistry, Urmia University, Urmia, Iran

Abstract:

Anthocyanins are natural pigments that belong to the flavonoid family and are mainly considered by the food industry due to their coloring properties. This study aimed to evaluate the effect of temperature sucrose on the anthocyanin stability of Urmia red grapes at pHs 2 and 3, and different time intervals and furfural measurements. The furfural content was analyzed by HPLC after 20 h of heating at 90 °C. After anthocyanin extraction, the pHs 2 and 3 was adjusted by citrate buffer (0.1M). Extraction was performed at different concentrations of 30 and 60% sucrose at 90 °C for 60 h. Anthocyanin degradation index (DI) was measured based on changes in adsorption at 520 nm. Furfural extraction was performed with 1,2 dichloromethane solvent. The results showed that all samples at both pHs maintained their absorption peak at 520 nm. The furfural content in sucrose-containing anthocyanin samples was higher than sucrose-free samples. The results show that the browning process, which indicates the breakdown of anthocyanins and sugar, depends on factors such as the concentration and pH of sucrose.

Keywords: Anthocyanin, Grape, Furfural, Sucrose, HPLC

*faezeh.ah7596@gmail.com

1. Introduction

Anthocyanins are water-soluble pigments belonging to the group of flavonoids that are widely distributed in plants (Bi et al., 2018). They are responsible for pigments (from red to purple) and in vegetative organs (leaves, Stems and roots) and reproductive (flowers and fruits) are many plant species (Mattioli et al., 2020). In addition, anthocyanins are considered natural pigments for food coloring due to their vibrant color, high water solubility, and safety (Mattioli et al., 2020).There is ample evidence that anthocyanin use can have a protective effect on the brain, heart, liver, and kidneys of humans and animals, and many therapeutic effects may be related to the antioxidant activities of anthocyanins and their metabolites (Kalt et al., 2020).

Anthocyanins are plant and natural compounds that are widely used in the pharmaceutical and food industries due to their effect on human health. However, the low stability of anthocyanins is still a barrier to their use (Tan et al., 2018). Anthocyanins are broad secondary metabolites that play a key role in skin pigmentation of many plant organs and microorganisms (García-Gómez et al., 2020). In addition, except for flower parts, anthocyanins are often present transiently in plant roots, stems, fruits, and tissues, and in response to adverse environmental factors such as : UV, cold temperature and water stress respond. They play an important role in the natural defense mechanism of plants (Mekapogu et al., 2020; Mannino et al., 2021). One of the most important debates in the food industry today is the increasing demand for food colors derived from natural sources, which can be a suitable alternative in terms of safety and health for artificial colors (Munawar and Jamil., 2014).Adherence to a diet that includes fruits and vegetables is associated with fewer patients with various diseases such as obesity, cardiovascular and neurological diseases, diabetes, Alzheimer's, and most importantly cancer due to their high content of phytochemicals such as polyphenols (Koch., 2019; Lage et al., 2020). Grapes contain compounds such as polyphenols (2-6.5%) to which a wide range of biochemical activities are attributed (Ianni et al. 2019). Anthocyanins are also important nutritional compounds with high antioxidants (Oliveira et al., 2019).

Anthocyanins are considered a natural alternative due to their wide range of color expression. However, their use is limited due to their stability (Sigurdson et al., 2017). Anthocyanins are very weak in terms of stability and have a high reactivity due to electron deficiency, which causes the color of these pigments to change color (Turturica et al., 2015). The color stability of anthocyanins is affected by various factors such as: pH , Its chemical structure, concentration, storage temperature, light, oxygen, ascorbic acid, moisture content and the presence of enzymes, flavonoids, proteins and metal ions (Blesso., 2019).

The beneficial effects of anthocyanins depend on their biological health because some of them are absorbed by the human body (Braga et al., 2018). Anthocyanins, as a functional dietary agent, play an important role in the prevention of kidney disease (Popović et al., 2019). It is well known that the color and stability of anthocyanins are strongly dependent on pH (Jiao et al., 2016). Increasing the concentration of anthocyanins leads to greater stability and increased color intensity (multiple) (Su et al., 2016). A clear example of destructive products produced by sugars is furfural. The reaction of anthocyanins with the destructive production of sugars results in the formation of brown polymer pigments.Factors such as temperature, concentration, length of the heating period, and pH are associated with the browning reaction (Cao et al., 2009). Grapes are a rich source of active ingredients, the active ingredients in grapes include: epicatechin, catechin, resveratrol and quercetin. For example, fruits that contain significant amounts of active compounds have antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and anti-tumor activities (Ono et al., 2020). The presence of anthocyanins in fruits and vegetables may enhance medicinal properties for human health and protect plants against oxidative stress (Naing and Kim., 2018; Naing and Kim., 2021). Grape is one of the largest fruit products in the world and its composition and properties have been extensively studied (Khoshroo et al., 2013). Grape varieties grown in Iran, especially in West Azerbaijan province, have not been studied in terms of quantity, quality, and stability of anthocyanins.

Türkyılmaz (2019) reported the degradation of anthocyanins due to the addition of sucrose following the formation of sucrose degradation products such as furfural due to the low pH of the samples at higher pHs (Türkyılmaz et al., 2019).

Koulani (2016) by studying two varieties of Rish Baba and Qara Ghezel Ozum grapes concluded that the furfural content in anthocyanin samples containing sucrose is higher than the samples without sucrose. They studied the effects of temperature on the quality of grapefruit extract and observed that with increasing temperature, the concentration of 5-hydroxymethyl furfural and furfural, which are destructive products of anthocyanins, increases (Koulani et al., 2016).

Prchalová (2016) observed that the rate of formation of furfural and hydroxymethyl furfural (HMF) increases during heating and with increasing temperature in sugary foods such as apples and red fruits (Prchalová et al., 2016).

In this study, anthocyanins were extracted from Urmia red grape var. Shani was heated at pHs 2 and 3 with sucrose at concentrations of 30 and 60% at 90 °C. Degradation index (DI) and anthocyanin absorption were measured at 520 nm to observe discoloration. Furfural value to indicate a change in sucrose was assayed.

2. Materials and methods

2.1. Sample preparation

Fresh grapes were harvested from Urmia orchards in summer 2020 and herbarium sheets were prepared by the herbarium of the Biology Department of Urmia University to identify and determine the scientific name. The grapes were removed from the bunches, washed, and cut open soon after to remove the seeds. The fruits were then frozen and stored in sealed containers at 80 °C until use. All the reagents used were of analytical grade and the experiments were carried out in triplicate.

2.2. Extraction of anthocyanins

To extract anthocyanin, 100 g of grapes was put into a mixer and after adding ethanol solvent (acidified with 0.1% hydrochloric acid) was mixed for 10 minutes. Then the products placed on a magnetic stirrer for 4 hours. After centrifugation, it was filtered by Whatman No. 1 paper for 2 times. Finally, it was rotated by vacuum evaporation at (Buchi-German) at 35℃ to be dried out. The concentrated extract was completely dissolved in distilled water and is used for experiments (Barbero et al., 2008).

Also, for extracting anthocyanins to measure the amount of furfural by HPLC, 30 g of grape was required and the solvent was a mixture of methanol: water: formic acid with ratio of 70: 28: 2. The extraction process was similar to the above procedure (Chen et al., 2013).

2.3. Determination of total monomeric anthocyanin content

The total monomeric anthocyanin content was determined by using a pH differential method (Dini et al., 2020). First, the extracted anthocyanins were adjusted to pH 1.0 and 4.5 with buffers. Agilent Diode Array spectrophotometer was used for spectral measurement at 520 and 700 nm (MW= molecular weight, DF= dilution factor, A= (A520 nm- A700 nm) pH 1.0- (A520 nm- A700 nm) pH 4.5, ε= molar extinction coefficient, 1= pathlength in cm and 103= factor for conversion from g to mg).

$$\text{Anthocyanin content (mg/L)} = \frac{A \times MW \times DF \times 103}{\varepsilon \times 1} \qquad (1)$$

2.4. Anthocyanin treatment with sucrose

Sucrose was treated under temperature and pH conditions. In this study, sucrose concentrations (30 and 60%) in red grape were investigated under pHs 2 and 3. The buffer used was citrate buffer (0.1 M). In this experiment, 30 ml of the extracted anthocyanin was adjusted with citrate buffer (pH 2) and another 30 ml with citrate buffer (pH 3). Then it is placed in a water bath for 20 h at a temperature of 90 °C. It is then scanned by a spectrophotometer from a wavelength of 400-700 nm (Tsai et al., 2005).

2.5. Furfural extraction

After the samples were heated for 20 h, the amount of furfural formed in the samples including anthocyanin, 30% sucrose, and anthocyanin + 30% sucrose was measured by HPLC. Solvent 1, 2 dichloromethane was used to extract furfural from the samples. Then 1 ml of the samples was mixed with 1 ml of solvent by vortex and caused two phases. The upper yellow phase containing furfural was injected into the HPLC (Liu et al., 2014).

2.6. HPLC analysis

HPLC has the advantages of high sensitivity and high detection efficiency and can perform large amounts of detection in a short time (Zhang, 2020).

The furfural value was measured using an HPLC device (KNAUER Germany). Column C 18 with a length of 25 cm, an inner diameter of 4.6 µm, and a particle size of 5 µm (Barreca et al., 2016). The furfural standard was used for comparison. The solvent used for the mobile phase was acetonitrile: water in a ratio of 92: 8. Also, the solvent flow rate was considered 1ml/min, and the indicator was set to 280 nm (Ferrer et al., 2002).

2.7. Statistical analysis

All experiments were performed in three replications. Results were obtained as means and standard deviation (SD) from the means. One-way ANOVA and Tukey test were performed to determine the differences between treatments. Values were considered significant at $p < 0.05$. SPSS 21 and Microsoft Excel were used to plot the charts and analyze the statistics

3. Results

3.1. Wavelength scanning

To investigate the degradation and discoloration of anthocyanins (browning process) at high temperatures, the absorption spectra of the samples were scanned in the range of 400-700 nm. For this purpose, the different effects of 0, 30, and 60% sucrose concentrations in two heating times of 0 and 20 h with two pH 2 and 3 were investigated. According to the graph, unheated samples (0 h) and heated samples (20 h) maintained their absorption peak at 520 nm. The changes observed depended on sucrose concentration and pH.

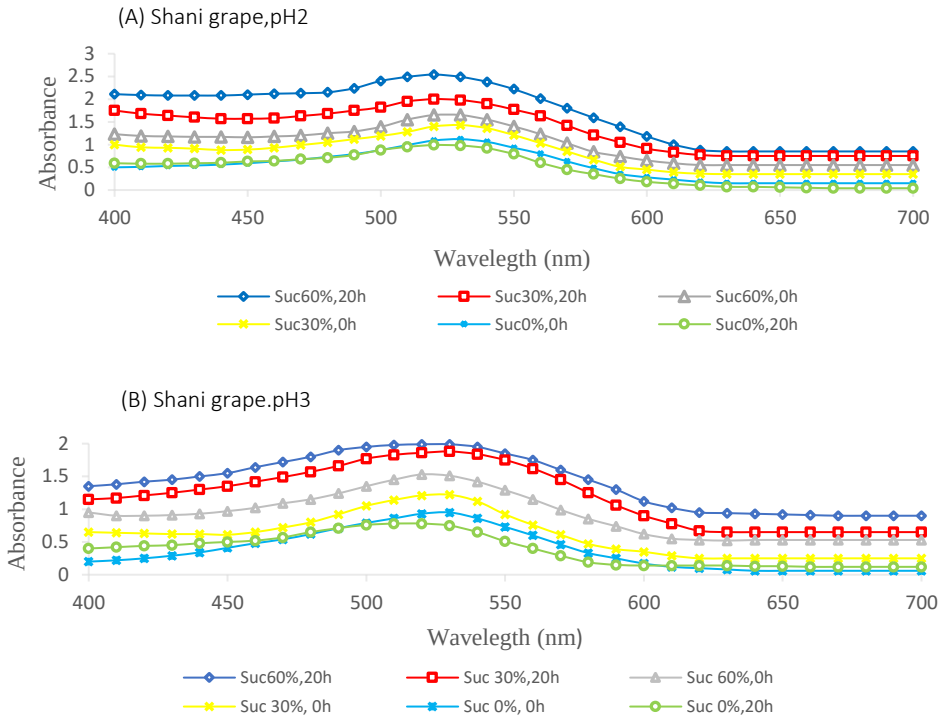


Figure 1. Scanning of the wavelength of anthocyanins of shani grape at 0 and 20 h of heating at 90 °C pHs 2 and 3

3.2. Anthocyanin degradation index (DI)

In this study, the degradation index of anthocyanins in sucrose-free samples increased during heating and the process. But in samples containing sucrose, DI reached its highest value in 20 hours and after this time showed a decreasing trend. The increase in DI is indicated by a significant increase in absorbance at 420 nm (brown / colorless) and a decrease in absorbance at 520 nm (highest red absorption). Ambient pH and heating temperature are factors that can accelerate the degradation of many natural plant pigments during heating, so it is critical to examine the degradation properties (Sui, 2017).

Table1. Anthocyanin degradation index (DI) under the influence of 90 °C at pH 2 and overtime

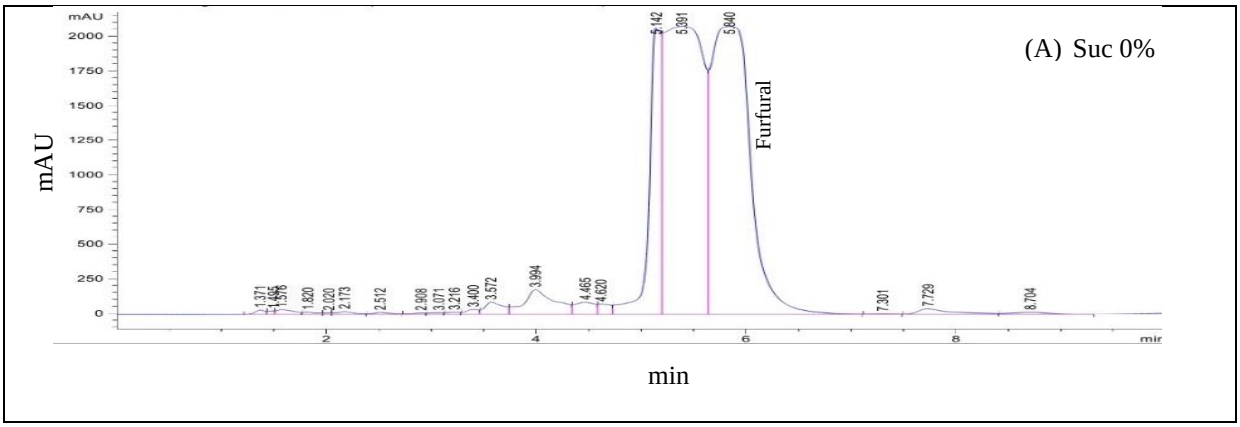
Sample	Time (h)	DI
Anthocyanin	0	0.458
	2	0.559
	4	0.690
	20	1.123
	40	1.897

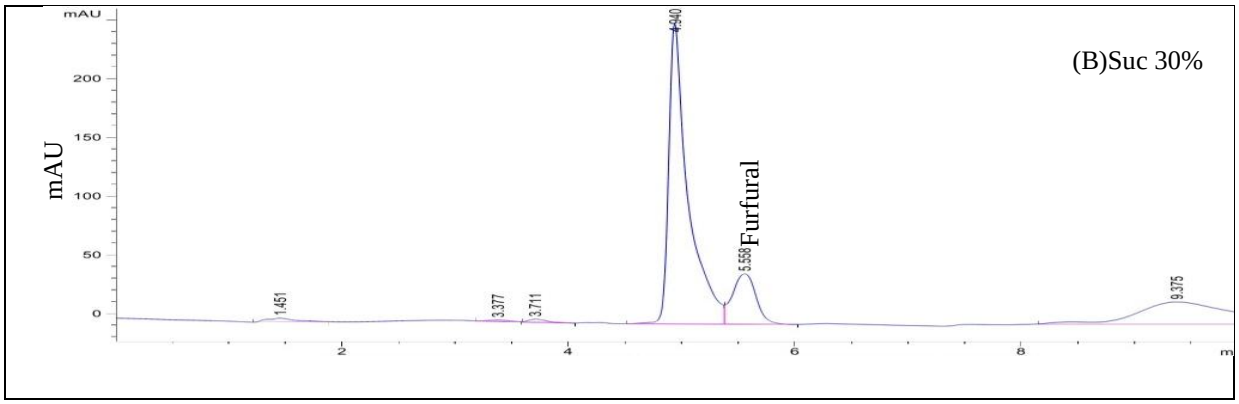
	60	2.243
Anthocyanin + Sucrose 30%	0	0.448
	2	1.102
	4	1.356
	20	1.460
	40	1.388
	60	1.041
Anthocyanin + Sucrose 60%	0	0.481
	2	0.707
	4	0.875
	20	1.454
	40	1.241
	60	1.178

DI= A420nm/A520nm

3.3. HPLC results in furfural production

In this part of the study, the amount of furfural formed in 30% sucrose, anthocyanin + 0% sucrose, and anthocyanin + 30% sucrose samples at pH 2 was measured by HPLC device and furfural standard (Figure 2).





min

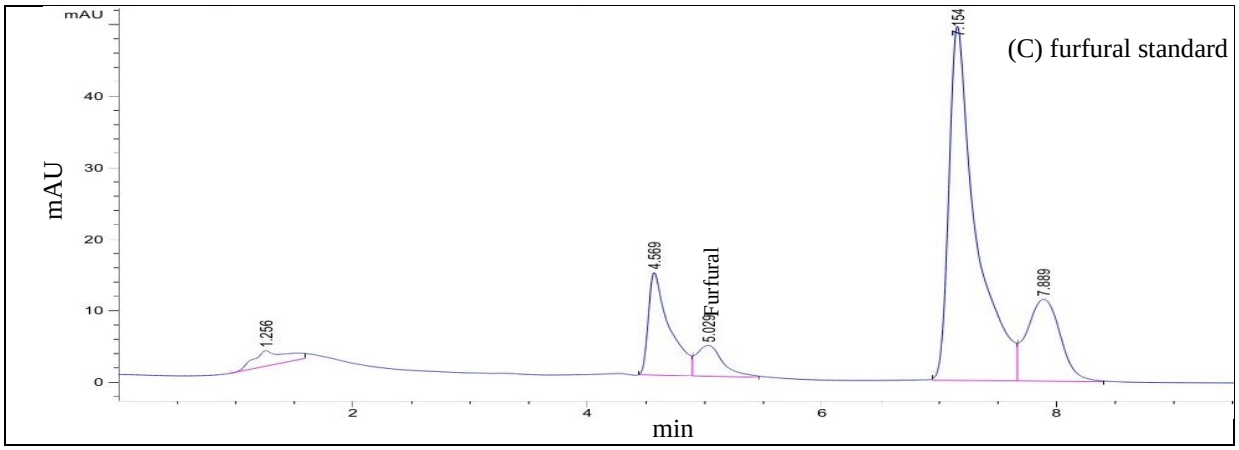


Figure 2. HPLC chromatograms for furfural in 0 and 30% sucrose samples (A and B) and furfural standard (C) after 20 h of heating at 90 °C

According to Table 2, the amount of furfural in anthocyanin samples with sucrose is higher than samples without sucrose.

Table 2. Furfural values formed in 30% sucrose, anthocyanin + 0% sucrose, and anthocyanin + 30% sucrose samples at pH 2 after 20 h at 90 °C

Sample	Furfural value (ppm)	
	Sucrose 0%	Sucrose 30%
Sucrose	_	562
shani grape	225	297

4. Discussion

In the last two decades, there has been a growing interest in the study of anthocyanin mainly due to its potential properties in health and its use as natural food colorants, as well as their appearance in plants cultivars and mutations with colors and shapes. The stability and color of anthocyanins depend on the nature and number of sugars attached to the flavilium ion and the nature and number of glycosylic acid-dependent acids. Grape fruit has a high medicinal value due to the presence of flavonoids such as anthocyanins, the type and percentage of compounds are affected by genotype and environmental conditions (Farida et al., 2016). The results showed that in red grapefruit and in both pH of all samples (heated and unheated samples) after 20 hours of heating at 90 ° C, their absorption peak was at 520 nm. Among the destructive products produced by sugars such as sucrose sugar at high temperatures is furfural. Anthocyanins with the destructive production of sugars cause the formation of brown polymer pigments. Studies have shown that anthocyanins show the highest adsorption at 520 nm and adsorption

in this region indicates red color and decrease in adsorption at this wavelength indicates anthocyanin degradation and furfural production. Comparison of sucrose concentration in both types of red grapes showed that after 20 hours of heating at the mentioned temperature, sucrose has 60% higher absorption than 30% sucrose. Also, the study of adsorption at 520 nm showed that in red grapes, samples with low pH (pH = 2 at 520 nm had higher absorption than samples with high pH (pH = 3). Both pH samples containing anthocyanins of Shani grape had a high hyperchromic shift rate, and samples containing 60% sucrose anthocyanins after 20 hours of heating at 90 ° C compared to the other samples had higher absorption. High concentrations of sugar can contribute to furfural production (Pino and Queris, 2011). The rate of adsorption and browning process at pH equal to 2 was higher than pH equal to 3. Sugars are generally found in fruits and are usually added to various products such as fruit extracts and jams during the food preparation process. Sugars have been shown to reduce anthocyanin stability. In studies, sucrose increased anthocyanin degradation compared to other sugars. In some cases, sugars have been shown to protect anthocyanins. Sucrose protects anthocyanins during frozen storage and also prevents browning and formation of polymer pigments, which may be due to inhibition of enzymatic reactions. Reducing the activity of water by sugars can also prevent the destruction of anthocyanins. Browning and development of polymer dyes are significantly reduced by the addition of sugar. The effect of added sugar on the stability of anthocyanins depends on its structure, concentration and type of sugar. When the sucrose concentration increases to 30%, the stability of red grape anthocyanins also increases. The reason for the increase in anthocyanin degradation with increasing sucrose concentration is the increase in phenolic compounds in high concentrations of anthocyanin, which has increased anthocyanin degradation. Studies by other researchers have also shown that the reaction of anthocyanins with the destructive production of sugars causes the formation of brown polymer pigments. The reason for the increase in anthocyanin degradation with increasing temperature was a sharp increase in browning, which is due to the degradation or polymerization of anthocyanins at high temperatures. They showed that in the presence of sucrose, compared to other sugars, anthocyanins turn brown with a delay and it has been suggested that sucrose helps to destroy anthocyanins during the heating period. Temperature was the factor that had the greatest effect on the decomposition of anthocyanins. During heating, regardless of the added sucrose, the degradation of red grape pigments increased with increasing temperature (Bianca and Luminita, 2020). Anthocyanins show more stability under acidic conditions but under normal processes and storage conditions they quickly turn into colorless derivatives and then into insoluble brown pigments. Finally, according to the results obtained from the study. At present, it is observed that the tested substances in different concentrations have different effects on the stability of anthocyanins, as, in certain concentrations, the presence of sugar causes the stability of anthocyanins. Degradation of anthocyanins occurs at higher pHs. However, not all compounds that bind to anthocyanins support their stability. Examples include sugars and their degradation products. In this study, samples of anthocyanins containing sucrose had a higher amount of furfural formed than samples containing only anthocyanins and sucrose. The reaction between anthocyanins and furfural facilitates the decolorization of anthocyanins, which are masked by-products formed by heat (Tsai et al., 2005). The furfural content of samples containing 30% sucrose is higher than that of samples containing anthocyanins alone 0% sucrose.According to the obtained results of furfural formation as a destructive product of sucrose, a compound that affects the stability of anthocyanins (Cao et al., 2009).

Cao (2009) have shown that the rate of thermal degradation products of sucrose at 90 ° C is more than 70 or 80 ° C. Furfural and hydroxymethyl furfural (HMF) were formed during the browning of sugars (Cao et al., 2009).

Studies by He (2015) showed that sweet potato anthocyanins were unstable at pH 8 and the color of anthocyanins changed due to instability during storage. Due to the presence of hydroxyl groups in the structure of anthocyanins, they are unstable against heat (He et al., 2015).

Ali (2016) showed the accumulation of sucrose-induced anthocyanins in "Mirage Rose" rose petals that overexpress RsMYB1 or B-Peru + mPAP1 (Ali et al., 2016).

Gras (2016) analyzed the color depth and stability of black carrot anthocyanins through intermolecular pigments by adding chlorogenic acid and blue phenolic-rich green coffee bean extract in various ratios of anthocyanin pigments at heat. Which proves the effect of hyperchromic pigments on the concentration of delivered pigments, which is followed by an increase in adsorption of more than one-fifth. After adding anthocyanin versions, the thermal stability is one-fifth. After adding anthocyanin prescriptions, thermal stability was significantly improved (Gras et al., 2016).

De Moura (2018) concluded that the increase in anthocyanin degradation index was proportional to the temperature and heating time. Nevertheless, it is worth noting that the degradation patterns varied at lower and higher pH values. In purple sweet potato extract, after heating at 80 ° C for 48 hours, the decomposition index of anthocyanin is slightly less than / 5. At pH equal to one it increased to 0.68, but from 0.65 at pH equal to nine it reached 1.4. Even the rate of anthocyanin decomposition accelerates with temperature and heating time (De Moura et al., 2018).

Acidic conditions led to the stability of anthocyanins. These pigments are very sensitive and become colorless under storage conditions, and pH is an important factor in stabilizing anthocyanins (Kammerer, 2016). Finally, anthocyanins are valuable biological molecules that have biological effects on human health, and we recommend adding anthocyanin-rich fruits and vegetables to your daily diet.

Acknowledgments

The authors are grateful to Urmia University for its support of this work. We thank Mrs. Neda Farnad for her assistance in advancing this research.

References.

Ali, T.N., Naing, A.H., Arun, M., Lim, S.H., Kim, C.K. 2016. Sucrose-induced anthocyanin accumulation in vegetative tissue of petunia plants requires anthocyanin regulatory transcription factors. Plant Science. 252, 144–150.

Barbero, G., Liazid, A., Palma, M., Barroso, C. 2008. Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. Talanta. 75, 1332–1337.

Barreca, D., Laganà, G., Leuzzi, U., Smeriglio, A., Trombetta, D., & Bellocco, E. 2016. Evaluation ofthe nutraceutical, antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (*pistacia vera* L., variety bronte) hulls. Food Chemistry. 196, 493-502.

Bianca Moldovan and Luminita David. 2020. Influence of Dierent Sweeteners on the Stability of Anthocyanins from Cornelian Cherry Juice. Foods. 9, 1266.

Bi, H.T., Guo, M.L., Wang, J.W., Qu, Y., Du, W.L., Zhang, K.M. 2018. Transcriptome analysis reveals anthocyanin acts as a protectant in *Begonia semperflorens* under low temperature. Acta Physiol. Plant. 40, 10–21.

Blesso, C.N. 2019. Dietary anthocyanins and human health. Nutrients. 11(9):2107.

Braga, A.R.C., Murador, D.C., de, S., Mesquita, L.M., De Rosso, V.V. 2018. Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. Journal Food Composit. Anal. 68, 31–40

Cao, S., Liu, L., Lu Q. 2009. Integrated effects of ascorbic acid, flavonoids and sugars on thermal

degradation of anthocyanins in blood orange juice. Eur Food Res Technol. 228:975–983.

Chen, S., Xiang, Y., Deng, J. 2013. Simultaneous Analysis of Anthocyanin and Non-Anthocyanin Flavonoid in Various Tissues of Different Lotus (*Nelumbo*) Cultivars by HPLC-DAD-ESI-MSn. PLoS One. 8(4): e62291.

De Moura, S.C., Berling, C.L., Germer, S.P., Alvim, I.D., Hubinger, M.D. 2018. Encapsulating anthocyanins from Hibiscus sabdari_a L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. Food Chemistry. 241, 317–327.

Dini, C., Zaro, M.J., Rolny, N., Caputo, M., Boido, E., Dellacassa, E., and Viña, S.Z. (2020). Characterization and stability analysis of anthocyanins from *Pachyrhizus ahipa* (Wedd) Parodi roots. *Food Bioscience*.. 34, 100534.

Farida, B., Cadot ,Y., Djamai, R., Djermoun, L. 2016. Determination of major anthocyanin pigments and flavonols in red grape skin of some table grape varieties (*vitis vinifera SP*.) by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection (HPLC-DAD). OENO One. 50.

Ferrer, E., Alegría, A., Fané, R. 2002. High-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in infant formulas: Changes during heat treatment and storage. Journal chromatogr A. 947:85–95.

García-Gómez, B.E., Salazar, J.A., Nicolás-Almansa, M., Razi, M., Rubio, M., Ruiz, D., Martínez-Gómez, P. 2020. Molecular bases of fruit quality in prunus species: an integrated genomic, transcriptomic, and metabolic review with a breeding perspective. International Journal of Molecular Sciences. 22, 333.

Gras, C.C., Bogner, H., Carle, R., Schweiggert, R.M. 2016. Effect of genuine non-anthocyanin phenolics and chlorogenic acid on color and stability of black carrot (Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens Alef.) anthocyanins. Food Research International. 85, 291–300.

He, X.L., Li, X.L., Lv, Y.P., He, Q. 2015. Composition and color stability of anthocyanin-based extract from purple sweet potato. Food Science Technology. 35:468–473.

Ianni, A., Di Luca, A., Martino, C. 2019. Dietary supplementation of dried grape pomace increases the amount of linoleic acid in beef, reduces the lipid oxidation and modifies the volatile profile. Animals. 9(8):578.

Jiao, Y.; Zhang,Y.; He, Z.; Zhai, W.; Gong, H.; Yang, Z. (2016).Effect of ferulic acid on the formation of pyrano anthocyanins from Purple corn (*zea mays l.*) Cob in a model system and their effects on Color. *International Journal of Food Properties* . 19, 847–858.

Kalt, W., Cassidy, A., Howard, L.R., Krikorian, R., Stull, A.J., Tremblay, F., Zamora-Ros, R. 2020. Recent research on the health benefits of blueberries and their anthocyanins. Advances in Nutrition. 11, 224–236.

Kammerer, D.R. 2016. Anthocyanins. In handbook on natural pigments in food and beverage; schweigger, R.C.R., Ed.; Woodhead publishing: Boston, MA, USA, pp. 61–80.

Khoshroo, A., Mulwa, R., Emrouznejad, A., Arabi, B. 2013. A non-parametric Data Envelopment Analysis approach for improving energy efficiency of grape production. Energy. 63, 189-194.

Koch, W. 2019. Dietary polyphenols-important non-nutrients in the prevention of chronic noncommunicable diseases. A systematic review. Nutrients. 11:1–35.

Koulani, M., Jamei, R., Marjani, A. 2016. Influence of sucrose and high temperature on grape anthocyanin stability and furfural formation. Journal *food safety* and *hygiene*. 2:54–62.

Lage, N.N., Layosa, M.A.A., Arbizu, S. 2020. Dark sweet cherry (*Prunus avium*) phenolics enriched in anthocyanins exhibit enhanced activity against the most aggressive breast cancer subtypes without

toxicity to normal breast cells. Journal Funct Foods .64:103710.

Liu, F., Sivoththaman, S., Tan, Z. 2014. Solvent extraction of 5-HMF from simulated hydrothermal conversion product. Sustain Environ Res. 24:149–157.

Mannino, G., Gentile, C., Ertani, A., Serio, G., Bertea, C. 2021 .Anthocyanins biosynthesis, distribution, ecological role, and use of biostimulants to increase their content in plant foods. A Review Agriculture . 11, 212.

Mattioli, A., Francioso, L., Mosca, P., Silva. 2020. Anthocyanins: A Comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. Molecules. 25 (17) , p. 3809.

Mekapogu, M., Vasamsetti, B.M.K., Kwon, O.K., Ahn, M.S., Lim, S.H., Jung, J.A. 2020. Anthocyanins in floral colors: biosynthesis and regulation in chrysanthemum flowers. International Journal of Molecular Sciences.21, 6537.

Munawar N and Jamil HMT. 2014. The Islamic perspective approach on plant pigments as natural food colourants. Procedia Social and Behavioral Sciences .121: 193-203.

Naing, A.H., Kim, C.K. 2021 .Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses. Physiologia Plantarum. 172, 711–1723.

Naing, A.H., Kim, C.K. 2018. Roles of R2R3-MYB transcription factors in transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in horticultural plants. Plant Molecular Biology. 98, 1–18.

Oliveira, H., Perez-Gregório, R., de Freitas, V. 2019. Comparison of the in vitro gastrointestinal bioavailability of acylated and non-acylated anthocyanins: Purple-fleshed sweet potato vs red wine. Food Chemistry. 276:410–418.

Ono., Daisy Zhao., Qingli Wu., James Simon., Jun Wang., Aurelian Radu., Giulio Maria Pasinetti. 2020. Pine bark polyphenolic extract attenuates amyloid-β and tau misfolding in a model system of alzheimer's disease neuropathology .Journal of Alzheimer's Disease. 77 (1) , p. 457.

Pino, O., Queris. 2011. Analysis of volatile compounds of mango wine. *Food Chemistry*.125,pp.1141-1146.

Popović, D., Kocić, G., Katić, V. 2019. Protective effects of anthocyanins from bilberry extract in rats exposed to nephrotoxic effects of carbon tetrachloride. Chemico-*Biological Interactions.* 304:61–72.

Prchalová, J., Čížková, H., Ševčík, R. 2016. Evaluation of shelf-life of fruit baby food. International Journal of Agronomy and Agricultural *Research* .14:556–568.

Sigurdson, G.T.,Tang, P., Giusti, M.M. 2017. Natural colorants: Food colorants from natural sources. Review of Food Science and Technology. 8, 261–280.

Su, G., Zhu, S., Xu, M., Ramaswamy, H.S., Lin, Y., Yu, Y. 2016. Pressure Degradation Kinetics of Anthocyanin Pigment and Visual Color of Chinese Bayberry Juice. International Journal of Food Properties. 19, 443–453.

Sui, X. 2017. Changes in the color, chemical stability and antioxidant capacity of thermally treated anthocyanin aqueous solution over storage. In Impact of Food Processing on Anthocyanins; Springer. Singapore; pp. 49–65.

Tan, C., Selig, M.J., Lee, M.C., Abbaspourrad, A. 2018. Polyelectrolyte microcapsules built on $CaCO_3$ scaffolds for the integration, encapsulation, and controlled release of copigmented anthocyanins. Food Chemistry. 246, 305–312.

Tsai, P.J., Delva, L., Yu, T.Y. 2005. Effect of sucrose on the anthocyanin and antioxidant capacity of mulberry extract during high temperature heating. *Food Research International.* 38:1059–1065.

Türkyılmaz, M., Hamzaoğlu, F., Özkan, M. 2019. Effects of sucrose and copigment sources on the major anthocyanins isolated from sour cherries. Food Chemistry. 281:242–250.

Turturica, M., Oancea, A.M., Rapeanu, G., Bahrim, G. 2015. Anthocyanins: naturally occuring fruit pigments with functional properties. Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI-Food Technology. 39, 9–24.

Zhang, Q. 2020. Application of high performance liquid chromatography in food safety detection. Mod Food. 10:111– 112.

Effects of *Onosma dichroanthum* Boiss. root extract on AGS human gastric cancer cell-line

Mohammad Mostakhdem Hashemi[1*], Zahra Khoshgoftar Moghaddam[1]

[1] Nutrition improvement office, Deputy of health, Qom university of medical sciences and health services, Qom, Iran

Abstract

Gastric cancer is one of the most cancer-related death causes in Golestan province, Iran. In traditional approaches, Onosma dichroanthum Boiss. roots have been used as an antiseptic and anti-inflammatory for wound healing treatment within long times. The aim of this study was to assess the in vitro cytotoxic and anticancer effects of O. dichroanthum Boiss. roots from the Golestan province of Iran. After taxonomical identification of O. dichroanthum Boiss., different concentrations of the hydroalcoholic root extract were used. Three different time periods (24, 48, and 72 h) were used to treat AGS gastric cancer and L-929 normal fibroblasts cell lines. The evaluation of different concentrations of root extract was performed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The 48 h treatment affected cell survival, while the concentration of 64 µg/mL was determined as IC50 concentrations at 48 h incubation time. The 48 h incubation time with 64 µg/mL showed the best effectiveness on cancerous cell-line while being safe for normal cell-line. Our results show that O. dichroanthum Boiss. roots extract may have cytotoxic and safe effects on gastric cancer cell-line and normal cells in 48 h treatment periods, respectively. The results indicated the O. dichroanthum Boiss. may be as an effective anticancer agent in gastric cancer cases.

Keywords: AGS cancer cell-line; L-929 normal cell-line; Onosma dichroanthum Boiss; hydroalcoholic extract

Introduction

Cancer is one of the main reasons for mortality and morbidity around the world. Many studies have been carried out by different researchers on anti-cancer drugs [1-4]. Studies by Badmus et al. have shown that 60% of anticancer drugs are plant-derived compounds [5]. Many of these plants are recognized as a potential anticancerous compound. Because of high cancer mortality, the use of different anticancer chemical drugs and their side effect on the human body, many scientists are working on anticancer drugs with fewer side effects. Plants may have an important role in the finding of new drugs. For many years, medicinal plants were the basis and the only treatment for some diseases. Studies have shown that medicinal plants are affected by environmental factors. These factors may change the growth of medicinal plants, the quantity, and quality of their active ingredients (alkaloids, glycosides, steroids, and essential oils) [6]. Some other findings indicated that some other factors such as water, air, and differences between species influence the amount of secondary metabolites in plants (phenol and flavonoids) [7]. Each of these factors may change the quantity and quality of plant effectiveness [8]. In our country, there is much different vegetation. The effects of some of these plants did not study pharmacologically and toxicologically. Some studies have indicated that more than 80% of the people in the world prevent and treat their diseases by using traditional medicine [9]. At this moment, there is more attention to use traditional medicinal plants. Many experimental studies on animals reveal that plants as a traditional medicine have lower toxicities than those chemical drugs [10, 11]. Studies in Iran revealed that different plants are used as traditional medicine for the treatment of burns and wounds. Onosma is a plant in the family Boraginaceae that can be found with 150 species in Asia, Mediterranean regions, and Europe. Onosma species are utilized as herbs, folk medicines, and dyes [12]. Onosma dichroanthumBoiss. locally known as “Hava Chobeh” (is the most used medicinal plant in the north of Iran) has been utilized as a traditional medicine for wound healing and inflammation in ulcer treatment. Some studies also have revealed that Onosma is used traditionally for rheumatism, bladder pain, kidney irritation, palpitation of the heart, burn wound healing [12], and hemorrhoids and stomach ulcers [9] as well as anticancer effects [14]. It is reported that the main metabolites of the Onosma roots are rich in naphthoquinone, includes alkannin-shikonin and their derivatives [15, 16]. Many studiesindicated that shikonin and alkannin derivatives of root extract ofArnebia euchroma and Alkanna tinctoria show the same effect on wound healing as O. dichroanthum Boiss. (members of the same family) [17–19]. It was reported that Onosma echioides extract helps to decrease the growth of tumors and oxidative stress [20]. The novelty of this study is that the anticancer effect of O. dichroanthum Boiss. root is not exactly clear. Thus, the aim of the present study was to evaluate the anticancer effects of O. dichroanthum Boiss. roots extract on (the gastric cancer cell-line) AGS human gastric cancer cell line.

1. Material and methods

O. dichroanthum Boiss. was provided from an apothecary shop in Gorgan, Iran. After taxonomical identification of O. dichroanthum Boiss., the hydroalcoholic root extract of the plant was made ready according to the maceration method. According to this method, plant materials were left in a fade to be well-dried. Then, an electric blender was used to provide powder of plant and 100 g of grounded plant material was put in a 1,000 mL beaker. 500 mL of alcohol (30%)/ distilled water (70%) solution was added to the dish and mixed well and left it

at room temperature for 72 h. The solvent was separated after 72 h and Wathman filter paper (0.2 µm) was used to filter the remained solution. A rotary evaporator was used to concentrate the crude extract. The extraction procedures were performed at the faculty of plant production, Gorgan university of natural resources and the next cell culture and cell treatment experiments were done in the laboratories of metabolic disorders center, Golestan university of medical sciences. The cell lines were a friendly gift from Dr. Zahra Arab-bafrani. Different concentrations of extract were made to use in our study. The extract was suspended in dimethylsulfoxide (DMSO)/medium (1:9) and the different concentrations of 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, and 128 ppm were provided. All of the concentrations were centrifuged at 1,000 × g for 5 min for the elimination of nondissolved fragments. DMEM and RPMI-1640 media (Bio-idea, IR Iran, lot numbers: BI-1004 and BI-1007) were used to culture the gastric cancer cell-line AGS (as case cell-line) and mouse fibroblasts normal cell-line (as the control normal cell-line), respectively, supplemented with heat-inactivated fetal bovine serum (10%) (Bio-idea, IR Iran, lot number: BI-1201) penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) (Bio-idea, IR Iran, lot number: BI-1203) and incubated under humidified environment (at 37 °C and 5% CO2) according to Urueña C et al. method [21]. The mycoplasma-free conditions of the cell lines were tested with a MycoProbe Mycoplasma Detection Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN). The MTT assay was carried out according to the Wang Z et al. Method [22]. A concentration of 1×10^4 cells/mL was used to seed the cells in a 96-well plate. Different concentrations of extract (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, and 128 µg/mL) and DMSO/medium (1:9) were added after 24 h and incubated at temperature of 37 °C. AGS and L-929 cell lines were treated with mentioned concentrations of plant extracts in triple. The cells were incubated in a condition of 5% CO_2 at 37 °C for the times of 24, 48, and 72 h in different plates. The new medium was used daily 20 µL MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich) solution. The concentration of 4.14 mg/mL was added to each well after washing with phosphate-buffered saline.

2. Results

In the present study, the effect of cytotoxicity of different concentrations of hydroalcoholic extracts of O. dichroanthum Boiss. root (airflow root) on AGS gastric cancer cells was investigated. After treatment of cancer cells and normal fibroblast cells L-929 as a control group in three different time intervals of 24, 48, and 72 h, an MTT test was performed on them. As can be seen in Figure 1, 24 h treatment with this extract did not show a significant lethal effect at any of the concentrations (especially low concentrations). However, the same low cell toxicity and lethality in cancer cells were more than normal cells. The effect of even a small lethality of 24 h of treatment with this extract on cancer cells was more than normal cells in the control group (of course, it is statistically insignificant, p-value>0.05). Therefore, in general, it can be claimed that the duration of 24 h of treatment with the present extract does not have a significant lethal effect on cancer cells and cannot be considered as the time of choice for treatment. But, in the 48 h treatment with the considered extract (Figure 2), the survival percentage of cancer cells after exposure to concentrations of 16, 32, and 64 µg/mL significantly decreased so that at a concentration of 64 µg/mL of treatment, the survival rate fell below 50% (it was 48%). Therefore, a concentration of 64 µg/mL can be considered as IC50 in 48 h treatment. It should be noted that in the 48 h treatment at a concentration of 64 µg/mL of normal cells in the control group, the survival rate was 83%, which was statistically significant (p-value<0.05) and showed relatively low toxicity and safety is acceptable for normal cells. This rate indicates achieving the potential

concentration of treatment in 48 h (high toxicity for cancer cells and low toxicity for normal cells). Regarding the 72 h treatment cells with the considered extract (figure 3), interesting and significant observations were obtained, so that doubling the concentration of the treatment from 16 to 32 µg/mL, led to a decrease of 24% survival of cancer cells (from 54 to 30%). However, normal cells in the control group at a concentration of 32 µg/mL (which was considered as a highly lethal concentration for cancer cells) had a survival of 76%, which shows a statistically significant difference between the two groups, cancer cells and normal cells (p-value<0.05). The reduction in cancer cell survival also in the 72 h treatment with an increase from 32 to 64 µg/mL was very small (from 30 to 25% and this means only 5%), while in this period the concentration increased, normal cells in the control group showed a sharp reduction in survival rate from 76 to 50% (it was 26%). This sharp decreasing slope indicates that we should consider the optimal dose of treatment for 72 h to be 32 µg/mL because the subsequent increase in treatment concentration has no significant effect on cancer cell mortality, but it causes severe lethality in normal cells. Finally, Figure 1 compares the survival rate of normal and cancer cells at a concentration of 32 µg/mL at three different times of 24, 48, and 72 h (Figure 4).

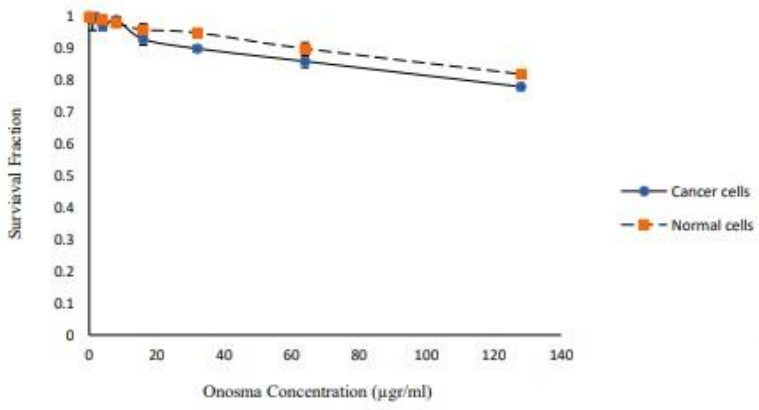


Figure 1: Changes in the survival rate of AGS cancer cells and normal L-929 fibroblasts in 24 h treatment.

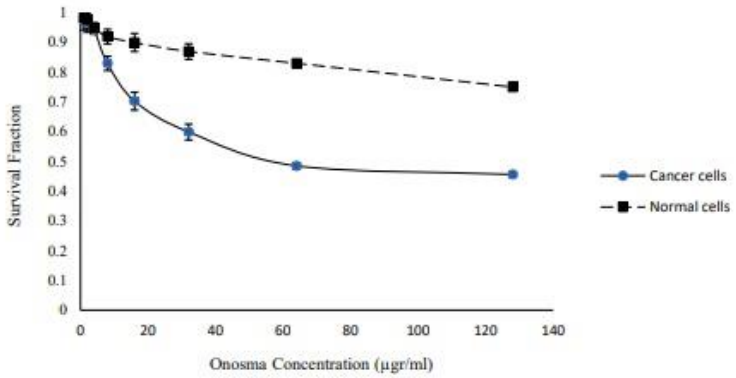


Figure 2: Changes in the survival rate of AGS cancer cells and normal L-929 fibroblasts in 48 h treatment.

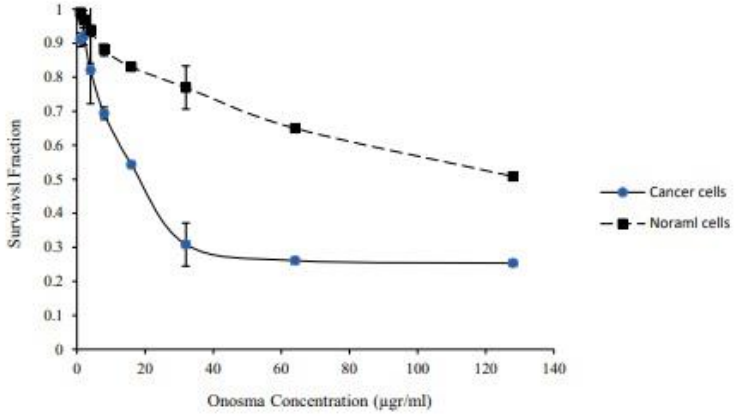


Figure 3: Changes in the survival rate of AGS cancer cells and normal L-929 fibroblasts in 72 h treatment.

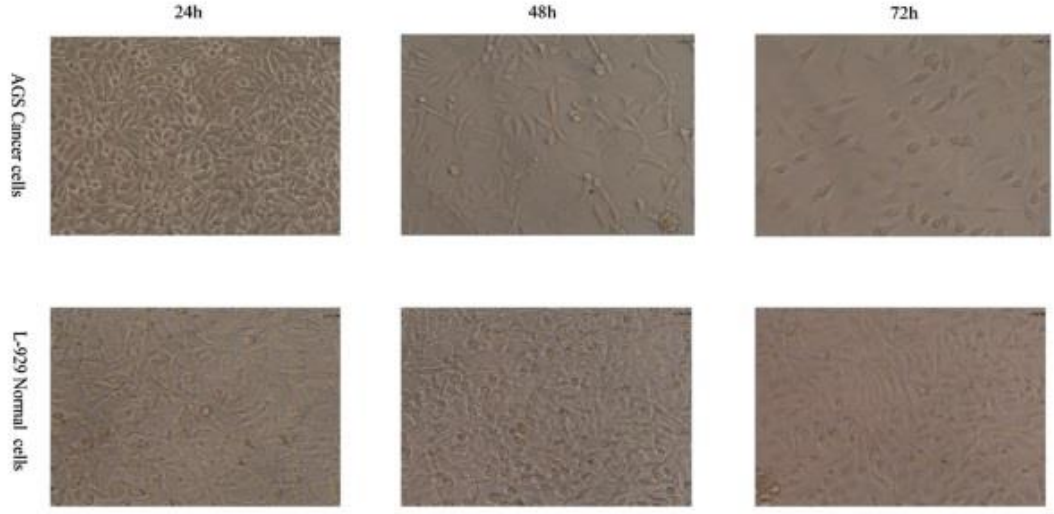


Figure 4: Image of cell plates treated with a concentration of 32 µg/mL of the extract at 24, 48, and 72 h.

3. Discussion

Cancer is one of the reasons for mortality and morbidity around the world. Plants have been utilized as a new therapy method for many years. Some studies showed that the use of any plant products as medicine could corroborate the cytotoxicity of cancer cells [23]. Many natural plants that

have been investigated as anticancer drugs are plant-derived with different types of compounds [5]. Many plants also have been indicated that they have a chemo-preventive effect on some kinds of cancer such as lung cancer, breast cancer, and prostate cancer [24, 25]. In traditional medicine, some Boraginaceae species have been utilized for the treatment and prevention of many diseases. The plants have been used as an important compound for the development of new drugs [26, 27]. Many species of the Boraginaceae family are grown in our country (Iran) and some of these plants are utilized as traditional medicine [28]. Flavonoids and other phenolic compounds of the Boraginaceae family show many biological activities such as antioxidative, antidiabetic, anticarcinogenic, antimicrobial, antiallergic, antimutagenic, and anti-inflammatory properties [29]. A study on Onosmo bracteatum (the same family of Boraginaceae) has been shown its effect and implication in cancer cells [30]. Their findings showed an antiproliferative activity of O. bracteatum on lung cancer, breast cancer, and prostate cancer cell lines [31]. However, there were insufficient studies about O. dichroanthum Boiss. anticancer effect. The study of the plant Onosma limitaneum showed that it may responsible for anticancer activity [32]. The root extract of Onosma arenaria showed cytotoxicity on human cervix adenocarcinoma cells and leukemia cells. Another finding showed that O. arenaria indicated high cytotoxicity on nonmalignant peripheral blood mononuclear cells [33]. In a study, the Onosma armeniacum K. has shown antiulcer and antioxidative effects [34]. The antioxidant activity was also investigated in O. dichroanthum Boiss. shows spasmolytic activity [35], and root extract of O. dichroanthum Boiss. leads to produce a potent free radical scavenging effect [36]. Some studies showed genotoxic effects of Onosma stellulata in-vitro conditions with the observation of chromosome abnormalities, causing genotoxic effects in mitosis at meristematic cells of the Onion [37, 38]. In the present study, the effect of O. dichroanthum Boiss. root extract was determined on the gastric cancer AGS and normal fibroblasts L-929 cell lines. Our study showed that after treatment of cancer cells and normal fibroblast cells L-929 as a control group in three different time intervals of 24, 48, and 72 h, 24 h treatment with O. dichroanthum Boiss. root extract did not show a significant lethal effect at any of the concentrations and times. In the 48 h treatment with the considered extract, the survival percentage of cancer cells after exposure to concentrations of 16, 32, and 64 µg/mL significantly decreased so that at a concentration of 64 µg/mL of treatment, the survival rate fell below 50% (it was 48%). In the 72 h treatment of cells with the considered extract (Figure 3), doubling the concentration of the treatment from 16 to 32 µg/ mL, led to a decrease of 24% survival of cancer cells (from 54 to 30%). Normal cells at a concentration of 32 µg/mL had a survival of 76%, which shows a statistically significant difference between cancer cells and normal cells (p-value<0.05). In order to optimize the best and the most effective dose of O. dichroanthum Boiss. root extract, we treated AGS gastric cancer and L-929 fibroblastic normal cell lines by different doses and various incubation times. We found that 64 µg/mL for 48 h treatment is the most effective dose. Our study results showed that Onosma in 64 µg/mL concentration and 48 h period of time has more effect on the gastric cancer AGS than other studied conditions. The reason why we have chosen 16, 32, and 64 µg/mL doses for AGS gastric cancer is to assess whether anticancer effects of O. dichroanthum Boiss. roots. extract variation in a related dose-dependent. The results of our study showed that O. dichroanthum Boiss. roots extract anticancer effect elevates in a dose dependent pattern.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Research Deputy of the Golestan University of Medical Sciences for financial support.

References

1. Ahmad A, Ali N, Bashir S, Choudhary MI, Azam S, Khan I. Parasiticidal, antifungal and antibacterial activities of Onosma griffithii Vatke. Afr J Biotechnol 2009;8:5084–7.
2. Khan M, Shamim S. Anisi stellati fructus, a significant traditional Chinese medicine (TCM) herb and its bioactivity against gastric cancer. Evid Based Complement Alternat Med (2022) 2022:4071489. doi: 10.1155/2022/4071489
3. Lee HS, Lee IH, Kang K, et al. A network pharmacology perspective investigation of the pharmacological mechanisms of the herbal drug FDY003 in gastric cancer. Nat Prod Commun. 2022;17(1):1-12.
4. Liu, X.; Wang, S.; Li, J.; Zhang, J.; Liu, D. Regulatory effect of traditional Chinese medicines on signaling pathways of process from chronic atrophic gastritis to gastric cancer. Chin. Herb. Med. 2022, 14, 5–19.
5. Assimopoulou AN, Boskou D, Papageorgiou VP. Antioxidant activities of alkannin, shikonin and Alkanna tinctoria root extracts in oil substrates. Food Chem 2004;87:433–8.
6. Aung TN, Qu Z, Kortschak RD, Adelson DL. Understanding the effectiveness of natural compound mixtures in cancer through their molecular mode of action. Int J Mol Sci 2017;18:656.
7. Aliasl J, Barikbin B, Khoshzaban F, Naseri M, Sedaghat R, Kamalinejad M, et al. Effect of Arnebia euchroma ointment on postlaser wound healing in rats. J Cosmet Laser Ther 2015;17:41–5.
8. Badmus JA, Ekpo OE, Hussein AA, Meyer M, Hiss DC. Antiproliferative and apoptosis induction potential of the methanolic leaf extract of Holarrhena floribunda (G. Don). Evid Base Compl Alternative Med 2015;2015:756482.
9. Dukas R, Dafni A. Buzz-pollination in three Nectariferous Boraginaceae and possible evolution of buzz-pollinated flowers. Plant Systemat Evol 1990;169:65–8.
10. El-shazly A, Ghani AA, Wink M. Pyrrolizidine alkaloids from Onosma arenaria (Boraginaceae). Biochem Systemat Ecol 2003; 31:477–85.
11. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. Am J Cancer Res 2017;7:1016–36.
12. Fadeyi SA, Fadeyi OO, Adejumo AA, Okoro C, Myles EL. In vitro anticancer screening of 24 locally used Nigerian medicinal plants. BMC Compl Alternative Med 2013;13:79.
13. Gairola S, Shariff N, Bhate A, Prakashkola C. Influence of climate change on production of secondary chemicals in high altitude medicinal plants. J Med Plants Res 2013;4:1825–9.
14. Ghahremanitamadon F, Shahidi S, Zargooshnia S, Nikkhah A, Ranjbar A, Soleimani Asl S. Protective effects of Borago officinalis extract on amyloid β-peptide (25-35)-induced memory impairment in male rats: a behavioral study. Biomed Res Int 2014; 2014:798535.
15. Kim SH, Kang IC, Yoon TJ. Antitumor activities of a newly synthesized shikonin derivative, 2-hyim-DMNQS-33. Canc Lett 2001;172:171–5.
16. Kandemir A, Turkmen Z. The flora of Uzumlu-Sakaltutan (Erzincan-Gumuflhane). Turk J Bot 2008;32:265–304.
17. Lebaschi MJ, Sharifi Ashoorabadi A. Changes in hypericin in different habitats of Goli. Research of Iranian medicinal plants and herbs. Res Inst Fore Rang 2001;11:100–87.
18. Li L, Li MH, Xu LJ, Guo N, Wu-Lan TN, Shi RB, et al. Distribution of seven polyphenols in several medicinal plants of Boraginaceae in China. J Med Plants Res 2010;4:1216–21.
19. Martonfi P, Martonfiova L, Kolarcik V. Karyotypes and genome size of Onosma species from northern limits of the genus in Carpathians. Caryologia 2008;61:363374.

20. Mehta T, Vercruysse K, Johnson T, Ejiofor AO, Elbert Myles E. Violacein induces p44/42 mitogen-activated protein kinasemediated solid tumor cell death and inhibits tumor cell migration. Mol Med Rep 2015;12:1443–8.
21. Omidbeigy R. Approaches to the production and processing of medicinal plants. Tehran, Iran: Publishers Designers Publishing; 1995, II:424 p.
22. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, et al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. J Ethnopharmacol 2006;103:59–65.
23. Ozgen U, Ikbal M, Hacimuftuoglu A, Houghton PJ, Gocer F, Dogan H, et al. Fibroblast growth stimulation by extracts and compounds of Onosma argentatum roots. J Ethnopharmacol 2006;104:100–3.
24. Paul A, Das S, Das J, Samadder A, Bishayee K, Sadhukhan R, et al. Diarylheptanoid-myricanone isolated from ethanolic extract of Myrica cerifera shows anticancer effects on HeLa and PC3 cell lines: signalling pathway and drug-DNA interaction. J Integr Med 2013;11:405–15.
25. Platt D, Amara S, Mehta T, Vercuyssee K, Myles EL, Johnson T, et al. Violacein inhibits matrix metalloproteinase mediatedCXCR4 expression: potential anti-tumor effect in cancer invasion and metastasis. Biochem Biophys Res Commun 2014;455: 107–12.
26. Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Couladouros EA, Hepworth D, Nicolaou KC. The chemistry and biology of Alkannin, Shikonin, and related Naphthazarin natural products. Angew Chem Int Ed 1999;38:270–300.
27. Shanmuga Priya A, Gnanamani A, Redhakrishnan N, Babu M. Healing potential of Datura albo on burn wounds in albino rats. J Ethnopharmacol 2002;83:193–9.
28. Suleyman H, Demirezer LO, Kuruuzum A, ZBanoglu ZN, Gocer F, Ozbakir G, et al. Antiinflammatory effect of the aqueous extract from Rumex patientia L. roots. J Ethnopharmacol 1999;65:141–8.
29. Salman S, Kumbasar S, Ozgen U, Erdogan F, Suleyman H. Contraceptive effects of Onosma armeniacum on embryo implantation in rats. Cell Membr Free Radic Res 2009;1:90–4.
30. Sekine T, Masumizu T, Maitani Y, Nagai T. Evaluation of superoxide anion radical scavenging activity of shikonin by electron spin resonance. Int J Pharm 1998;174:133–9.
31. Sharma S, Khan K, Sultana S. Effect of Onosma echiodes on DMBA/croton oil mediated carvcinogenic response, hyperproliferation and oxidative damage in murine skin. Life Sci 2004;75:2391–410.
32. Sousa C, Moita E, Valentão P, Fernandes F, Monteiro P, Andrade PB. Effects of colored and non-colored phenolics of Echium plantagineum L. bee pollen in Caco-2 cells under oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. J Agric Food Chem 2015;63: 2083–91.
33. Salem N, Msaada K, Hammami M, Jday A, Salem S, Limam F, et al. Variations in Tunisian borage essential oil profiles and their antioxidant activities during flowering. Nat Prod Res 2014;28: 1919–22.
34. Soueges R. Embryogeny of the Boraginaceae; development of the embryo in Onosma nanum DC (O. decipiens Schott et Kotschy). C R Hebd Seances Acad Sci 1951;232:2164–7.
35. Teppner H, Tuzlaci E. Onosma propontica aznavour (Boraginaceae-Lithospermeae). Landesmus NF 1994;76:77–83.
36. Urueña C, Mancipe J, Hernandez J, Castañeda D, Pombo L, Gomez A, et al. Gallotannin-rich Caesalpinia spinosa fraction decreases the primary tumor and factors associated with poor prognosis in a murine breast cancer model. BMC Compl Alternative Med 2013; 13:74.

37. Wang Z, Zhou J, Ju Y, Zhang H, Liu M, Li X. Effects of two saponins extracted from the polygonatum Zanlanscianense pamp on the human leukemia (HL-60) cells. Biol Pharm Bull 2001;24:159–62.
38. Yavari A, Shahgolzari SM. Floristic study of Khan-Gormaz protected area in Hamadan Province, Iran. Int J Agric Biol 2010;12: 271–5.

Effects of Organic Fertilizers on EO Yield and EO chemical compounds of white Savory under Dry Farming

Borzou Yousefi[1*], Faridon Bolandbakhat[2]

[1] Department of Natural Resources, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Research Institute of Forest and Rangelands (RIFR), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kermanshah, Iran, Tel: +989189315218

[2] Department of Natural Resources, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Research Institute of Forest and Rangelands (RIFR), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kermanshah, Iran.

Abstract

White savory (*Saturejamutica* Fisch. & C. A. Mey.) grows in the rocky areas of the north and northwest of Iran. The use of organic fertilizers (O. Fs.) increases the organic matter and essential nutrients of the soil, and improves the maintenance of soil moisture and finally improves the stability of agricultural systems. To investigate the effect of different organic fertilizer (O. F.) on essential oil in white savory under dry farming, a RCBD design with three replications was conducted. Three Fertilizer treatments (cow manure 30 tons / ha, enriched straw by sulfate ammonium 10 ton / ha and farm soil) applied during 2017- 2018 and 2018-2019 crop years. The highest EO percentage (2.02%) was found in the farm soil treatment (control) and the highest EO yield (22.13 kg / ha) was obtained in the treatment of enriched wheat straw. The highest thymol and carvacrol percentages were obtained in 30 tons×ha^{-1}rotten cow manure treatment.

Keywords: Carvacrol, Essential oil, PCA, Savory, Thymol

* Email: b.yousefi@areeo.ac.ir, borzooyoosefi@yahoo.com

Introduction

*Saturejamutica*Fisch. & C. A. is An Iranian native plant used in medicinal and health industry (Gohari et al., 2011), which grow in northern Iran, Caucasus, and Turkmenistan (Jamzad, 2012). The white savory has a little Water requirement and can be cultivated in dry farming (Karimi et al., 2022).

Organic fertilizers contain plant- or animal-based materials such as animal manure and composted organic materials (Hitha et al., 2021). The organic fertilizers such as manure, plant remains and straw can improve soil amendment (Sun et al., 2022; Askary et al., 2018) and the plant productivity (Degueurce et al., 2016) with rarely environmental concerns.

The use of organic fertilizers, while improving the physical, chemical and biological properties of the soil (Adekiya et al., 2020; Gene et al., 2019), can increase access to nutrients (Han et al., 2016), and ultimately increase the quantitative and qualitative plant efficiency (AghhavaniShajari et al., 2015). O. F. is beneficial to the soil nutrient balance, improve soil structure, increase of moisture-holding capacity (Han et al., 2016). The findings of many researchers confirm that the use of organic fertilizers in different sustainable agriculture systems can create a platform appropriate and optimal access of the plant to the nutrients, and increase the plant growth and biomass (Soni et al., 2022; Beeby et al., 2020; Miao et al., 2010).

The plants needs to balanced values of essential elements for the optimal growth and development. The enriched biomanure residues act as excellent sources of essential nutrients for plant growth (Jacob and Banerjee, 2016). The O. Fs. contains NPK and trace elements, which releases them gradually and peacefully, that lead to sustainable plant growth. The soil health and dynamics and plant access to micronutrients (Zn, Cu, Fe, Mn, B and Mo) are strongly associated with the accumulation of organic matter in the farm soil (Dhaliwal et al., 2019). Manure contains substantial amounts of essential plant nutrients, in particular N in the form of NH4-N, NO3-N and urea, as well as P, S, Ca, Mg, B, Cu, Fe, Mn, Mo, and Zn. (Thiele-Bruhn and Ngigi; 2021). Of course, O. Fs. maybe sometimes cannot meet all the nutritional needs of plants so the combination or replace of chemical fertilizers with a variety of organic fertilizers is important in order to achieve to sustainable production in agriculture (Roussos et al., 2017).

4. Material and methods

2.1. Experimental Designs and Treatments

This experiment was performed as a randomized complete block design (RCB), with three fertilizer treatments and three replications during two crops years (2017-2018 and 2018-2019). The organic fertilizer treatments were rotten cow manure 30 tons ha-1, straw enriched with ammonium sulfate 10 tons ha-1, and the control without fertilizer (farm soil). The plants cultivated in the six rows with 50 × 50 cm row spacing (4 plants per m2). The area of each plot was 3 × 4 = 12 m2. In the autumn, the field was plowed, leveled and rows done at 50 cm intervals. To implement the treatments, before the main sowing and in early autumn, 36 kg of rotten cow manure or 12 kg of wheat straw enriched by 240 g of ammonium sulfate (dissolved in 20 liters of water) were evenly distributed on the furrows in each plot. Then, the fertilizers were covered with farm soil. The seeds were provided from the Forests and Rangelands Research Institute of Iran. The seeds disinfected with 5% sodium hypochlorite for 2 minutes and dried, then planted in trays and a peat moss bed, in a greenhouse at a temperature of 18-24 C° and a humidity of 35%.

2.2. Experimental Conditions and Plant Material

The seedlings of white savory, in early April, and before the effective rain, transferred to the field in Mehregan Research Station of Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center. The experimental field was situated at 34°.9≠ latitude, 47°.9≠ longitude, at 1270 m altitude. The results of fertilizer treatments analyses and farm soil analyses were provided in Table 1. The meteorological statistics for two experimental crop years and monthly and annual rainfall (Table 2) were derivate from the Kermanshah weather station. A semi-arid steppe climate class dominated the region. Mechanical methods were used for controlling weeds and no herbicides or pesticides were used during the project.

Table 1. Physical and chemical characteristics of fertilizers treatment and control

Fertilizer treatment	Soil Texture	EC (ds/m)	PH	Absorbable P (ppm)	Absorbable K (ppm)	O.C. (%)
Farm soil (without fertilizer)	Silty-Clay	0.70	7.03	12.20	520	1.13
Enriched wheat straw	-	-	-	26	860	22.03
Rotten cow manure	-	-	-	138	6800	1.75

Table 2. Metrological statistics in Kermanshah weather station during two crop years of project implementation *

Crop years	Absolute Max. temperature (°C)	Absolute Min. temperature (°C)	Ave. annual temperature (°C)	Ave. humidity (%)	Ave. annual evaporation (mm)	Annual precipitation (mm)
2016-2017	40.8	8.2	16.6	37	1931	394.5
2017-2018	43.5	10.6	16.74	45	162.6	434

* Ave. = average, Max. = maximum, Min. = minimum

Essential Oil Extraction

After 50% of flowering, in late August, savory plants were collected and dried. Seventy grams of crushed plant powder in each plot were used for EO extraction. The EO was extracted by water distillation using the Clevenger system according to British Pharmacopoeia (1993). The Clevenger apparatus operated for 3 hours. The EO samples were dehydrated with dry sodium sulfate (Na_2So_4) weighed and kept in a refrigerator (4 °C).

EO percent and EO yield calculation

The EO percentage was calculated by W/W method from the following formula:

EO% = EO weight (g) / plant dry weight (g) × 100 (Khademi Doozakhdarreh et al., 2022). The EO yield was obtained by multiplying the EO percentage by dry plant yield per hectare (Yousefi et al., 2021).

GC and GC/MS Analysis

After diluting 1 µL of essential oil in 2 µL of dichloromethane, samples analysed by a gas chromatograph with specifications (Ultra Fast Model) Thermo - UFM and with Chrom - Card A / D data processor, cap-column Ph-5 (non - polar) made by thermo company with a length of 10m and an inner diameter of 0.1 and 0.4 µm thickness, when the inner surface of the device was coated with a stationary phase of 5% dimethyl siloxane phenyl made by thermo company, Italy. Column temperature program: Initial temperature 60 °C, start to final temperature 285 °C, which added every minute 80 °C to them, then stopped at this temperature for 3 minutes, detector type was FID with 290 °C. The temperature of the injection chamber is was 280°C, carrier gas was helium and inlet pressure to the column is set at 0.5 kg cm^{-2} (Zakerian et al., 2020).
GC/MS device was Varian 3400 connected to mass spectrometer (Saturn II), with ion telephoto system and ionization energy of 70 electron volts. It has a semi - polar DB-5 column (length 30 m, inner diameter 0.25 mm and thickness of static phase layer equal to 0.25 microns). Column head gas pressure is set at 35 pounds per square inch, temperature 40 °C to 250 °C with increasing speed of 4 °C per minute, injection chamber temperature 260 °C and line transfer temperature 270 °C. The retention indexes were calculated by injection of normal hydrocarbons (C_7 - C_{25}) under the same conditions as essential oil injection, by computer program and in BASIC language. Chemical compounds in EO identified by comparison of spectra with different sources (Adams, 2017).

2.6. Data Analysis

Data were entered in EXEL software. The analysis of variance and Duncan's mean values were compared by SPSS (ver.16) software's .The PC analysis was performed by Minitab (ver.16) software's.

5. Results

In total, the nine chemical compounds were identified from EO samples (Table 3). The main compounds of EO were Carvacrol, thymol, γ- terpinene and ρ- cymene. According to Figure 1 (a and b) the highest percentage of ρ- cymene (12.48%) was observed in rotten cow manure treatment. The highest percents of carvacrol (9.21%) and γ- terpinene (21.95%) were obtained from enriched wheat straw treatment. The highest amounts of thymol (53.15%) and total percentage of thymol + carvacrol (58.95%) were obtained in rotten cow manure treatment.

The results of analysis of variance (Table not presented) showed that there are significant differences between the years for essential oil yield and chemical compounds at the level of 1 %, and for plant survival percentage at the level of 5 %. The EO percentage had not significant difference between the years. Also, there were significant differences among fertilizer treatments for the traits of EO percent, EO yield and some EO chemical compounds at the level of 1 %. The interaction effect of year × fertilizer treatments was significant for EO percentage and EO yield.

Table 3. Specification of EO chemical compounds identified in *S. spicigera* under dry farming and different O. Fs. treatments

Classification	Chemical name	RT	RI	Formula
Phenol monoterpenoids	Carvacrol	4.07	1289.96	$C_{10}H_{14}O$
	Thymol	3.96	1281.22	$C_{10}H_{14}O$
Bicyclic monoterpenes	α-pinene	0.87	931.13	$C_{10}H_{16}$
	β- pinene	0.87	931.13	$C_{10}H_{16}$
	Trans-caryophyllene	5.33	1376.02	$C_{15}H_{24}$
	Camphene	1.16	953.1	$C_{10}H_{16}$
Isometric monoterpenes	γ-terpinene	1.63	1051.59	$C_{10}H_{16}$
	α- terpinene	1.63	1051.21	$C_{10}H_{16}$
Benzene alkyl	ρ-cymene	1.36	1014.15	$C_{10}H_{14}$

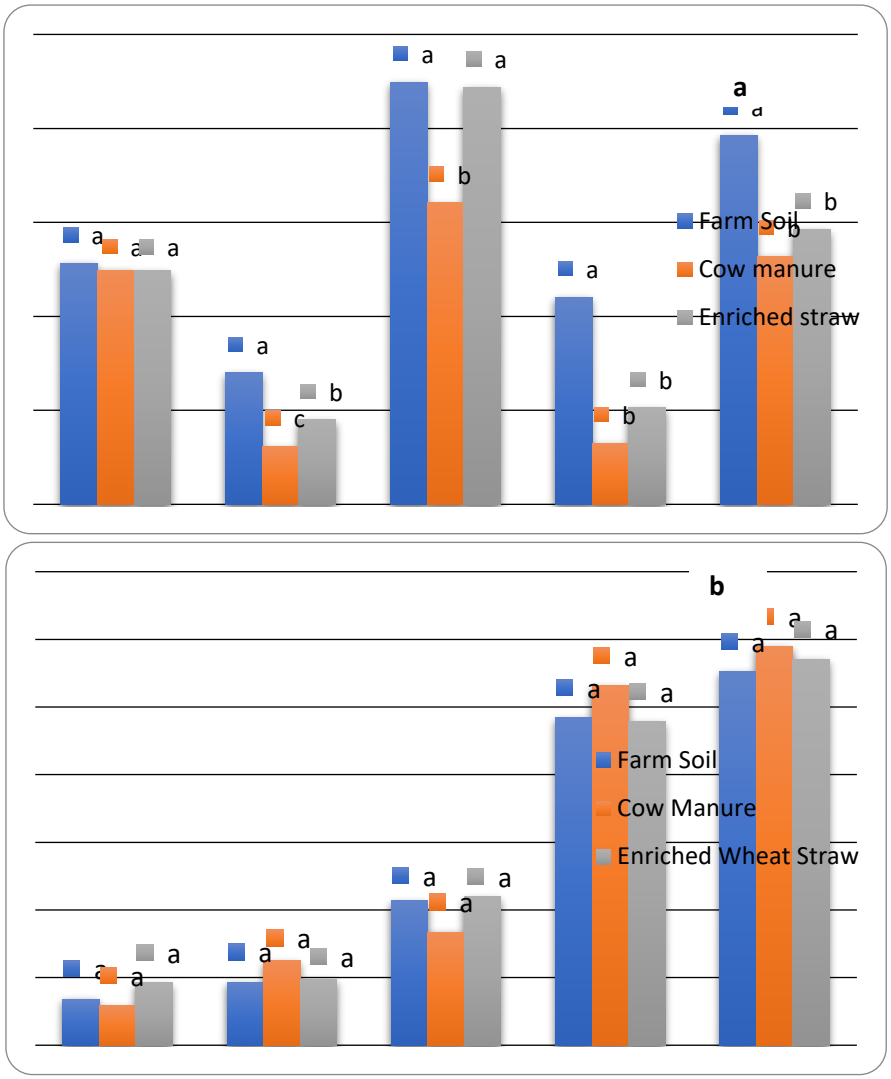


Figure 1. (a): Means comparison of EO chemical compounds in *S.mutica* planted under dry farming conditions and different O. Fs. Treatments. **(b):**Means comparison of EO chemical compounds (%) in *S.mutica* planted under dry farming conditions and different O. Fs. Treatments

Results of PC analysis showed that the PC1 and PC2 had the Eigenvalues more than 1 and in total represented the 100% of cumulative variances (Fig. 2). The compounds of camphene (0.38), α-pinene(0.37), β- pinene (0.36), α- Terpenine (0.35), γ-Terpinene (0.32) and Trans– caryophyllene (0.32) had the highest positive contributions; and the ρ-cymene (-0.27) and Thymol (-0.32) had the highest negative share in the PC1. The compounds of Trans- caryophyllene (0.36) and thymol (0.36) had the highest positive share, and carvacrol (-0.60), γ- terpinen (-0.32) and α- Terpenine (-0.28) had the highest negative share in the PC2.

The PCA diagram (Fig. 2) showed that the compounds of Trans – caryophyllene, α- pinene, β-pinene and camphene had the same trends. These compounds correlated to the farm soil treatment and the highest percentages of these compounds were obtained from the farm soil treatment (control). Thymol and ρ- cymene had the same trend (second quarter) and were correlated to rotten cow manure treatment. The highest percentages of thymol and ρ- cymene were obtained from rotten cow manure treatment (30 tons / ha). The compounds of α- terpinene, γ- terpinen and carvacrol showed same trend and they were correlated to enriched wheat straw treatment. The highest amounts of α-terpinene, γ- terpinen and carvacrol were obtained from enriched wheat straw (10 tons / ha).

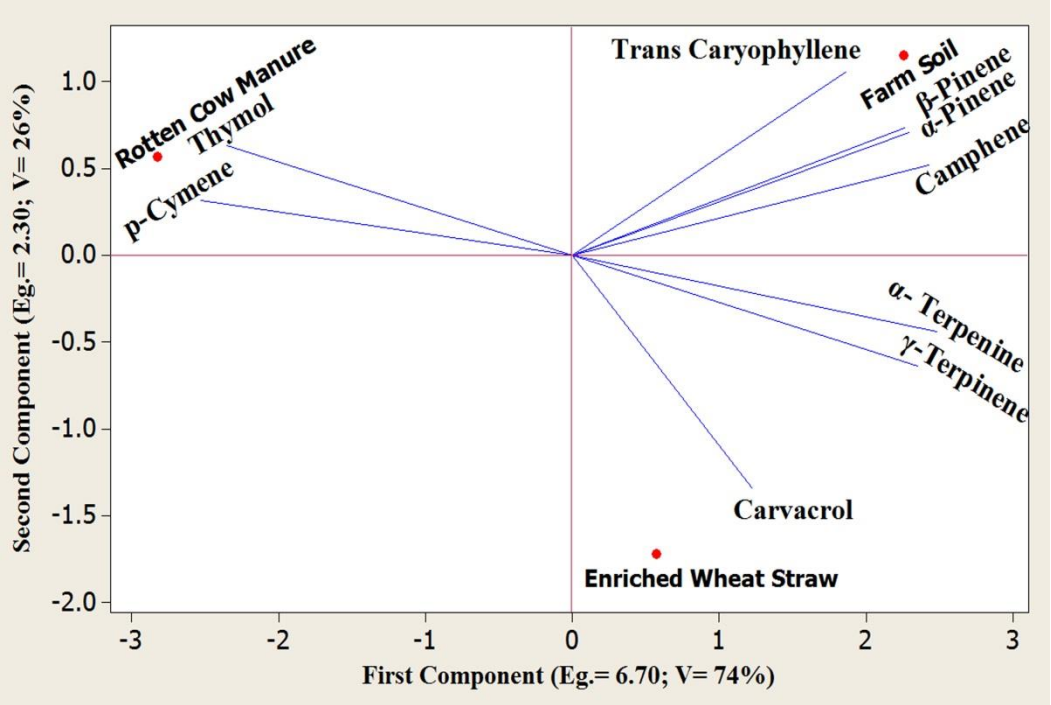


Figure 2. The Biplot of EO chemical compounds in *s. mutica* plants cultivated under dry farming and different O. Fs. treatments

6. Discussion

The organic fertilizer treatments had a significant positive effect on EO yield, and EO chemical compounds, but no on EO percentage. The highest EO yield was obtained in the enriched wheat straw, and the highest EO percentage was obtained in the farm soil (control).

Saki et al. (2019) reported that in *S. mutica* plants under irrigation conditions, the use of cattle manure leads to higher plant production. In *S. mutica* cultivation, under irrigated condition, the highest EO percentage (2.11 %), and the highest EO yield (79.27 kg / ha) were obtained from N50P25K25 + cow manure 60 tons / ha (Asadollahi et al., 2022). In *Saturejabachtiarica* plants, under irrigation conditions, the highest EO yield was observed in plants supplied with 30 tons× ha^{-1} manure (Mirjalili et al., 2022). In some other medicinal plants, the use of O. Fs. has had a significant impact on growth, yield and quality. The use of organic fertilizers has improved the quantitative and qualitative yield in purple basil plants (Tehrani Sharif et al., 2015).

In our study, the organic fertilizers had not a positive significant effect on EO percentage. Under irrigation conditions, Akraminejad et al. (2016) has reported that organic fertilizers had no effect on EO percentage in *S. hortensis* plants. Unlike, Esmaielpour et al. (2018) reported that cow manure has led to a significant increase in EO percentage in summer savory. Also, organic fertilizers have affected EO content and EO yield in some medicinal plants (Keshavarz et al., 2019; Giovannini Costa et al., 2013; Anwar et al., 2005).

In our study, the cow manure treatment increased the percentage of Thymol and the enriched straw treatment increased the percentage of carvacrol. Alizadeh et al. (2009) reported that in *Saturejahortensis* L. the amounts of carvacrol and terpinene were increased with using mixture of soil and chicken manure. The organic manure has increased the percent of α-phellandrene and ρ-cymene in *Anethumgraveolens* (Rostaei et al., 2018).

EO percent, EO yield and EO chemical compounds are affects by genetic structure, environmental factors and plant feeding conditions. Under special conditions, Water and nutrients deficiency or availability lead to changes in EO production. EO accumulation has significantly increased under severe water stress in *S. hortensis* (Baher et al., 2002). The total EO percentage in *Menthaspicata* L. has increased in deficit irrigation conditions, but has decreased under nutrient deficit treatments (Chrysargyris et al., 2021). The availability or deficiency of some low or high - consumption nutrients is very effective for enzyme activity to produce essential oil (SeifSahandi et al., 2019; Poshtdar et al., 2016; Nejatzadeh, 2015; Said -Al Ahl et al., 2010).

References

Adams, R.P. 2017. Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy.Academic Press.San Diego, CA., USA.

Adekiya, A.O., Ejue, W.S., Olayanju, A., Dunsin, O., Aboyeji, C.M., Aremu, C., Adegbite, K., Akinpelu, O. 2020. Different organic manure sources and NPK fertilizer on soil chemical properties, growth, yield and quality of okra.Scientific Reports. 10(1): 1-9.

AghhavaniShajari, M., RezvaniMoghaddam, P., Koocheki, A., Fallahi, H.R., TaherpourKalantari, R. 2015.Evaluation of the effects of soil texture on yield and growth of saffron (*Crocus sativus*L.).Saffron Agronomy and Technology. 2(4): 311-322.

Akraminejad, O., Saffari, M., Abdolshahi, R. 2016. Effect of organic and chemical fertilizers on yield and essential oil of two ecotypes of savory (*Saturejahortensis* L.) under normal and drought stress conditions. Iranian Journal of Field Crops Research. 13(4): 675-686.

Anwar, M., Patra, D.D, Chand, S., Khanuja S.P.S. 2005. Effect of organic manures and inorganic fertilizer on growth, herb and oil yield, nutrient accumulation, and oil quality of French Basil.Communication in Soil Science and Plant Analysis. 36: 1737-1746.

Asadollahi, A., Abbaszadeh, B., MohammadiTorkashvand, A., GhanbariJahromi, M. 2022. Effect of levels and types of organic, biological, and chemical fertilizers on morphological traits, yield, and uptake rate of elements in *Saturejamutica*.Industrial Crops and Products. 181: 114763.

Askary, M., Behdani, M.A., Parsa, S., Mahmoodi, S., Jamialahmadi, M. 2018. Water stress and manure application affect the quantity and quality of essential oil of *Thymus daenensis* and *Thymus vulgaris*. Industrial Crops and Products. 111: 336-344.

Beeby, J., Moore, S., Taylor, L., Nderitu, S. 2020. Effects of a One-Time Organic Fertilizer Application on Long-Term Crop and Residue Yields, and Soil Quality Measurements Using Biointensive Agriculture.Frontiers in Sustainable Food Systems.p.67.

British Pharmacopoeia. 1993. (Vol. I), HMSO, London, Great Britain, 835 p.

Chrysargyris, A., Koutsoumpeli, E., Xylia, P., Fytrou, A., Konstantopoulou, M., Tzortzakis, N. 2021.Organic Cultivation and Deficit Irrigation Practices to Improve Chemical and Biological Activity of *Menthaspicata*Plants.Agronomy. 11(3): 599.

Degueurce, A., Tomas, N., Le Roux, S., Martinez, J., Peu, P. 2016. Biotic and abiotic roles of leachate recirculation in batch mode solid-state anaerobic digestion of cattle manure. Bioresource Technology. 200: 388-395.

Dhaliwal, S.S., Naresh, R.K., Mandal, A., Singh, R., Dhaliwal, M.K. 2019. Environmental and sustainability indicators dynamics and transformations of micronutrients in agricultural soils as influenced by organic matter build-up: A review. Environmental and Sustainability Indicators. 1(2): 1-14.

Esmaielpour, B., Rahmanian, M., Khorramdel, S., Gharavi, H. 2018.Effect of organic fertilizers on nutrients content and essential oil composition of savory (*Saturejahortensis*L.).Agritech. 38(4): 433-441.

Giovannini Costa, G., Kelly Vilela, S., Bertolucci, S.K.W., Chagas, J.H., Oliveira Ferraz, E. 2013.Biomass production, yield and chemical composition of peppermint essential oil using different organic fertilizer sources.Agricultural Sciences. 37(3): 202-210.

Gohari, A.R., Hadjiakhoondi, A., Shafiee, A., Ebrahimi, E.S., Mozaffarian, V. 2011. Chemical composition of the essential oils of *Saturejaatropatana* and *Saturejamutica* Growing Wild in Iran.Journal of Essential Oil Research. 17: 117-118.

Han, S.H., An, J.Y. Hwang, J., Kim, S.B., Park, B.B. 2016. The effects of organic manure and chemical fertilizer on the growth and nutrient concentrations of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera* Lin.) in a nursery system.Forest Science and Technology. 12(3): 137-143.

Hitha, Sh., Vinaya, Ch., Linu, M. 2021. Organic fertilizers as a route to controlled release of nutrients. In: Lewu, F.B., Tatiana Volova, Sabu Thomas, Rakhimol K.R. (eds.). Controlled Release Fertilizers for Sustainable Agriculture.Academic Press. pp. 231-245.

Jacob, S., Banerjee, R. 2016. Modeling and optimization of anaerobic codigestion of potato waste and aquatic weed by response surface methodology and artificial neural network coupled genetic algorithm. BioresourceTechnology. 214: 386-395.

Jamzad, Z. 2012. Flora of Iran, No. 76, (*Lamiacea*).Research Institute of Forests and Rangelands Publication, Iran. pp. 696-697.

Karimi, E., Ghasemnezhad, A., Ghorbanpour, M. 2022. Selenium- and Silicon-Mediated Recovery of *Satureja* (*Saturejamutica*Fisch.& C. A. Mey.)Chemotypes Subjected to Drought Stress. GesundePflanzen. 74(2): https://10.1007/s10343-022-00654-x

Keshavarz, H., Modarres-Sanavy, S.A.M., Mahdipour-Afra, M. 2019. Organic and chemical fertilizer affected yield and essential oil of two mint species. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 21: 1674-1681.

KhademiDoozakhdarreh, S.F., Khorshidi, J., Morshedloo, M.R. 2022. Essential oil content and components, antioxidant activity and total phenol content of rosemary (*Rosmarinusofficinalis* L.) as affected by harvesting time and drying method. Bulletin of the National Research Centre. 46: 199.

Miao, Y., Stewart, B.A., Zhang, F. 2010. Long-term experiments for sustainable nutrient management in China.Agronmy Sustainable Development.31: 397- 414.

Mirjalili, A., Lebaschi, M.H., Ardakani, M.R., HeidariSharifabad, H., Mirza, M. 2022. Plant density and manure application affected yield and essential oil composition of Bakhtiari savory (*Saturejabachtiarica* Bunge.). Industrial Crops and Products. 177: 114516.

Nejatzadeh, F. 2015. Effect of Biological and Chemical Nitrogen Fertilizers on Growth, Yield and Essential Oil Composition of Dill (*Anethumgraveolens* L.).New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 5(19): 77–84.

Poshtdar, A., AbdaliMashhadi, A., Moradi, F., Siadat, S.A., Bakhshandeh, A. 2016.Effects of different sources of nitrogen fertilizer and applied rates on essential oil content and composition of peppermints.Journal of Herbal Drugs. 7(1): 51-57.

Roussos, P.A, Gasparatos, D., Kechrologou, K., Katsenos, P., Bouchagier, P. 2017. Impact of organic fertilization on soil properties, plant physiology and yield in two newly planted olive (*Oleaeuropaea* L.) cultivars under Mediterranean conditions.ScientiaHorticulturae. 220: 11–19.

Said-Al Ahl, H., Wahby, M.S., Abd El-Kader, A. 2010. Effect of nitrogen fertilizer and/or some foliar application on growth, herb yield, essential oil and chemical composition of dragonhead.Journal of Medicinal Food Plants. 2(1): 12-28.

Saki, A., Mozafari, H., Karimzadeh-Asl, K., Sani, B. 2019. Plant yield, antioxidant capacity and essential oil quality of *Saturejamutica* supplied with cattle manure and wheat straw in different plant densities. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 50(1): 1-11.

SeifSahandi, M., NaghdiBadi, H., Mehrafarin, A., Khalighi-Sigaroodi, F., Sharif, M. 2019.Changes in Essential Oil Content and Composition of Peppermint (*Menthapiperita* L.) in Responses to Nitrogen Application.Journal of Medicinal Plants. 18(72): 81-97.

Soni, R., Gupta, R., Agarwal, P., Mishra, R. 2022. Organic Farming: A Sustainable Agricultural Practice. Journal of Thematic Analysis. 3(1): 21-44.

Sun, Y., Tao, Ch., Deng, Xu., Liu, H., Shen, Z., Liu, Y., Li, R., Shen, Q., Geisen, S. 2022. Organic fertilization enhances the resistance and resilience of soil microbial communities under extreme drought. Journal of Advanced Research. In Press.https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.07.009

Tehrani Sharif, H., SharifiAshoorabadi, E., Tajali, A.A., MakizadehTafti, M. 2015. Effect of plant nutrition systems on qualitative and quantitative yield of purple basil (*Ocimumbasilicum* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research. 31(2): 283-306.

Thiele-Bruhn, S., Ngigi, A.N. 2021.Biochar: Fundamentals and applications in environmental science and remediation technologies, in advances in chemical pollution. Environmental Management and Protection. 7:1–313.

Yousefi, B., Sefidkon, F., Lebaschy, M.H., Mirza, M. 2021. Effects of different densities and feeding with organic fertilizers on percent, yield and chemical composition of essential oil in *Saturejamutica* under rain fed conditions. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plant Research. 38(1): 102-118.

Zakerian, F., Sefidkon, F., Abbaszadeh, B., KalateJari, S. 2020. Effects of water stress and mycorrhizal fungi on essential oil content and composition of *Saturejasahendica* Bornm. Journal of Agricultural Sciences and Technology. 22(3): 789-799.

Zhang, Z., Dong, X., Wang, S., Pu, X. 2020. Benefits of organic manure combined with biochar amendments to cotton root growth and yield under continuous cropping systems in Xinjiang, China. Scietific Reports. 10(1): 4718.

GC-MS analysis of the hydrodistilled essential oils from the aerial parts of (*Cannabis sativa* L.), a plant growing wild in Bandar Torkaman, Golestan Province, Iran

Mohammad Reza Kianasab[1], Mehdi Nekoei[1], Behnam Mahdavi[2] and Majid Mohammadhosseini[1*]

[1]Department of Chemistry, College of Basic Sciences, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran
[2]Department of Chemistry, Faculty of Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

Abstract

The current report concerns with the quantitative and qualitative analysis of the hydrodistilled essential oils from the fresh aerial parts of *Cannabis sativa* L.using by gas chromatography combined with mass spectrometric (GC-MS) analysis. In this sense, a total of 14 constituent components were detected, among which only one component remained unidentified. The chromatographic screening of the obtained chemical profile revealed the presence of high quantities of cannabidiol (31.3%), followed by (*Z*)-caryophyllene (24.7%), caryophylla-4(12),8(13)-dien-5β-ol (9.3%), α-humulene (9.3%), 14-hydroxy-(*Z*)-caryophyllene (5.9%) and caryophyllene oxide (4.1%). In terms of general categories of natural compounds constituting groups, oxygenated sesquiterpenes (OS) (58.8%) were found to possess the highest frequencies followed by sesquiterpene hydrocarbons (SH) (39.7%).

Keywords: *Cannabis sativa* L., Cannabidiol, Essential oil, GC-MS, Hydrodistillation, Oxygenated sesquiterpenes

* e-mail for the corresponding author: majidmohammadhosseini@yahoo.com

1. Introduction

For many years, *Cannabis sativa* L. (hemp) has been used on a large scale as an important medicinal plant and cultivated in many regions for commercial values of its fibre and seeds. Despite the prohibition of the hemp cultivation due to its psychotropic components, particularly tetrahydrocannabinol (THC), it has found some remarkable therapeutic properties to relive a number of pains and diseases. Therefore, some countries have legalized the potential use of this plant and its relevant derivatives as a sedative, pain killer and a useful remedy. Besides, from 2001, the Euro-pean Commission allowed the hemp cultivation with less than 0.2% THC. All these facts determined an increasing interest in hemp cultivation and in the use of the plant-derived raw materials such as the hemp fibre, that can be used in the production of specialty papers, and the hemp seeds that can be used as a food and feed and contain an oil useful for manufacturing printer ink, for wood preservation, and production of soaps and detergents (Callaway et al., 2004). Moreover, hemp flowers and upper leaves also contain an essential oil (EO) used as a scent in perfumes cosmetics, soaps, candles and as flavouring in foods. Interestingly, hemp EO has also been shown to be toxic to mosquitoes larvae (Thomas et al., 2000) and recently, to have antimicrobial (Verma et al., 2014) and nematicidal (Mukhtar et al., 2013), insecticidal (Soares et al., 2023) properties. Some recent papers have also argued about valuable and promising nutraceutical potential (Zheng et al., 2022), phytochemical (Chang et al., 2021; Dudley et al., 2022; Giselle et al., 2023; Haddou et al., 2023), biosynthesized Ni nanoparticles (Suman et al., 2022), anti-tumor (Esfandiary et al., 2023), cytotoxicity (Chang et al., 2021), anti-acute leukemia (Chang et al., 2021), anti-inflammation (Kongkadee et al., 2022), gingival wound healing (Kongkadee et al., 2022) uses of the *C. sativa* L. extracts. The extracts have also been characterized as resources of natural compounds, e.g., *p*-coumaric acid and ethyl *p*-coumarate (Oh et al., 2022), alkaloids (Fasakin et al., 2022), terpenes (Elsohly et al., 1977), phenolic (Matešić et al., 2021) and flavonoid compounds (Cui et al., 2023).

The current paper aims at characterizing of the chemical profiles of the essential oils from the aerial parts of *C. sativa* L. using traditional water-distillation (hydrodistillation: HD).

2. Material and methods

2.1. Plant material

The whole plant material samples (*C. sativa* L.) were collected during the full flowering stage on 28 May 2020 from the mountainous regions of Bandar Torkaman, Golestan Province with the general geographical coordinates of 36°54′06″N 54°04′15″E. Due to the fact that this plant is a narcotic drug, the necessary permits were taken from the anti-narcotics police of Golestan province, Iran. The plant material was first recognized by a local botanist and a Voucher specimen of a representative sample of *C. sativa* L. was then deposited at the herbarium of Shahrood University of Technology (JDSUT325jk).

2.2. Extraction of the essential oils from the aerial parts of *C. sativa* L.

2.2.1. Hydrodistillation

To extract the essential oils using the traditional hydrodistillation method, a modified Clevenger glassware set up was used. Accordingly, 100-g portions of the pulverized air–dried plant aerial parts of *C. sativa* L. were immersed in an appropriate amount of distilled water in a 2 L round bottom flask and the hydrodistillation process was continued for 2.5 h, after which no increase in the volume of the extracted oil was observed. The oil was then immediately dehydrated using appropriate amounts of sodium sulfate and then stored at the refrigerator at 4 °C till being analyzed. The mean yields of the obtained oils using the hydrodistillation technique from the plant material based on three replicate analyses were found to be respectively as: 0.19 ± 0.05 (%w/w) based on the weight of the plant fresh sample.

3. Results

3.1. General chromatograms of the essential oils of *C. sativa* L. aerial parts

Using the HD approach, 13 constituent components were identified in the chemical profile of the essential oil from the aerial parts of *C. sativa* L. (see Figure 1) accounting for 98.5% of the entire profiles, respectively.

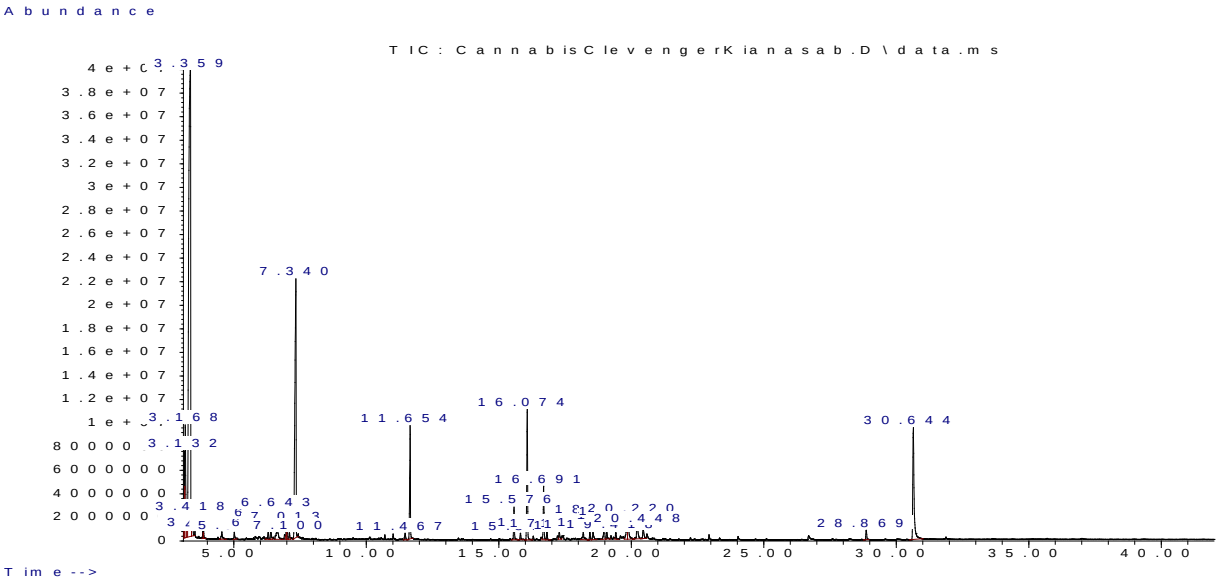


Figure 1. Chromatogram of the essential oil from the flowers of *C. sativa* L. using hydrodistillation (HD) in combination with GC/MS (HD–GC/MS).

4. Discussion

4.1. Major constituent components of the characterized profile of *C. sativa* L. essential oil

As can be seen in Figure 1 and Table 1, five sesquiterpene hydrocarbons along with eight oxygenated sesquiterpenes have been characterized in the volatile oil separated from the aerial parts of *C. sativa* L.. Accordingly, the following rank for the SH components was observed from the frequency point of view: (*Z*)-Caryophyllene (24.7%) > α-humulene (9.3%) > *trans*-α-bisabolene (2.2%) > alloaromadendrene (1.8%) > β-selinene (1.7%). Moreover, oxygenated sesquiterpenes were identified to be the major natural compounds constituting groups contributing to the relevant chemical profile of the isolated essential oil. In this relation, cannabidiol (31.3%) was characterized as the most abundant constituting component followed by caryophylla-4(12),8(13)-dien-5β-ol (9.3%), 14-hydroxy-(*Z*)-caryophyllene (5.9%), caryophyllene oxide (4.1%), β-bisabolol (2.9%), (*E*)-nerolidol (2.0%), cannabicyclol (1.8%) and humulene epoxide II (1.5%).

Table 1. Chemical compositions of the essential oils from the aerial parts of *C. sativa* L. using hydrodistillation (HD) combined with GC/MS (HD-GC/MS) method.

Sr. No.	Compound	Class	RI	(%)
1	(*Z*)-Caryophyllene	SH	1408	**24.7**
2	α-Humulene	SH	1452	**9.3**
3	Alloaromadendrene	SH	1458	1.8
4	β-Selinene	SH	1489	1.7
5	*trans*-α-Bisabolene	SH	1540	2.2
6	(*E*)-Nerolidol	OS	1561	2.0
7	Caryophyllene oxide	OS	1582	**4.1**
8	Humulene epoxide II	OS	1608	1.5
9	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5β-ol	OS	1639	**9.3**
10	14-hydroxy-(Z)-Caryophyllene	OS	1666	**5.9**
11	β-Bisabolol	OS	1685	2.9
12	Cannabicyclol	OS	NR	1.8
13	Cannabidiol	OS	NR	**31.3**
Total				98.5

This study also revealed the presence of high quantities of oxygenated sesquiterpenes (OS) as the first rank as well as sesquiterpene hydrocarbons (SH) in the oils obtained by water distillation from the aerial parts of *C. sativa* L. (see Figure 2). However, there was no monoterpene hydrocarbons (MH) or oxygenated monoterpenes (OM) and non-terpene hydrocarbons (NH) in the characterized chemical profile of this narcotic plant oil.

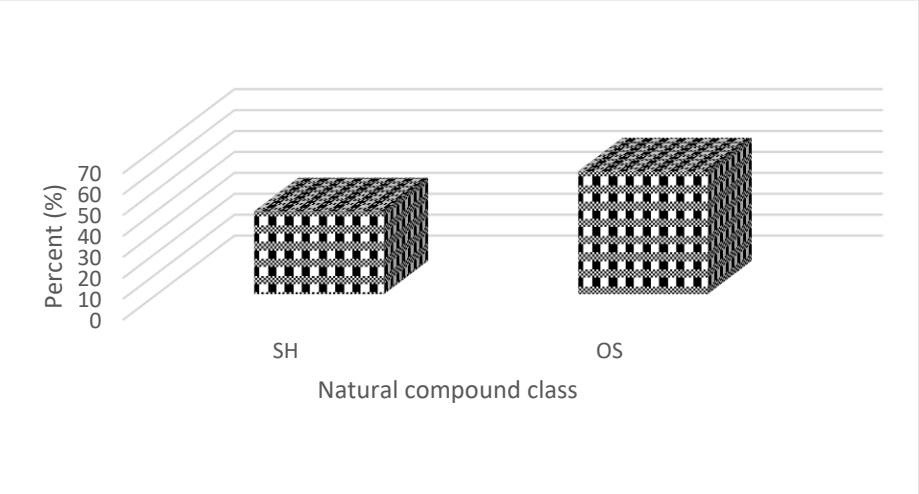


Figure 2. Comparative representation of the different natural compound constituting groups characterized in the essential oil from the aerial parts of *C. sativa* L..

4.1. Comparison of the chemical profile of this study with the previously published papers on *C. sativa* L.

Sporadic reports over a long period of time (1965 to present) are found in the literature dealing with the analysis of the essential oils of *C. sativa* L. in different parts of the globe. Accordingly, The essential oil obtained by hydrodistillation of freshly harvested Indian *C. sativa* L. was found to contain some monoterpene hydrocarbons, *e.g.*, α-pinene, camphene, β-pinene, α-terpinene, β-phellandrene, γ-terpinene, linalool, oxygenated monoterpenes, *e.g.*, *trans*-linalool oxide, sabinene hydrate, terpinene-4-ol and α-terpineol, some sesquiterpene hydrocarbons, *e.g.*, α-bergamotene, β-farnesene, α-selinene, curcumene, and one oxygenated sesquiterpenes *e.g.*, caryophyllene oxide. The presence of trace amounts of two alcohols and of an α,β-unsaturated ketone, for which gas chromatographic and spectral characteristics are recorded, was also detected (Nigam et al., 1965).

In a similar study on the characterization of the essential oils of five different cultivars of *C. sativa* L., α-pinene, myrcene, trans-β-ocimene, α-terpinolene, *trans*-caryophyllene and α-humulene were recognized as the main constituent components. The content of α-terpinolene divided the cultivars in two distinct groups, an Eastern European group of cultivars of approximately 8% and a French group of cultivars of around 16%. Therefore, this compound might be suitable as a genetic marker for the two breeding centres for the fibre types of *C. sativa* L.. The content of *trans*-caryophyllene was up to 19%. However, the content of caryophyllene oxide did not exceed 2% (Novak et al., 2001).

The same research group (Novak and Franz, 2003) have also reported and quantitatively compared the composition of the essential oil and the solvent extract of two populations of *C. sativa* L. ssp. *spontanea* growing wild in Austria. In the essential oil, myrcene (31% and 27%, respectively), (*E*)-β-ocimene (13% and 3%, respectively) and β-caryophyllene (11% and 16%, respectively) were found, while in the solvent extract the non-hallucinogeneous cannabidiol (77% and 59%, respectively) dominated. The hallucinogeneous δ-9-tetrahydro-cannabinol (THC) was also found in the solvent extract at a level of less than 1%, as well.

Finally, Iseppi et al. (2019), have successfully characterized seventeen essential oils from different fibre-type varieties of *C. sativa* L. viz. industrial hemp or hemp by means of GC-MS and GC-FID techniques. In accordance with this study, the authors have implied that volatile terpenes

represent the largest group of plant oil and are responsible for the relevant observed aromatic properties. Accordingly, 71 compounds were identified, and the semi-quantitative analysis revealed that α- and β-pinene, β-myrcene and β-caryophyllene are the major components in all the essential oils analysed. In addition, a GC-MS method was developed here for the first time, and it was applied to quantify cannabinoids in the essential oils.

Acknowledgements

The financial supports of Islamic Azad University of for the performance of this study is highly appreciated.

References

Callaway, R.M., Thelen, G.C., Barth, S., Ramsey, P.W., Gannon, J.E. 2004. Soil fungi alter interactions between the invader *Centaurea maculosa* and North American natives. Ecology 85(4): 1062–1071.

Chang, Y., Zheng, C., Chinnathambi, A., Alahmadi, T.A., Alharbi, S.A. 2021. Cytotoxicity, anti-acute leukemia, and antioxidant properties of gold nanoparticles green-synthesized using *Cannabis sativa* L leaf aqueous extract. Arabian Journal of Chemistry 14(4), doi: 10.1016/j.arabjc.2021.103060.

Cui, Q., Li, J., Yu, C. 2023. Extraction and purification of total flavonoids from *Cannabis sativa* fibers and their evaluation for antioxidant and antibacterial activities. Textile Research Journal 93(1–2): 56–69.

Dudley, A., Kassama, L., Jackson-Davis, A., Kuang, X., Cebert, E., Antimicrobial and antioxidative activity of ethanolic extract from two hemp (*Cannabis sativa* L) cultivars grown in Northern Alabama. 2022. American Society of Agricultural and Biological Engineers.

Elsohly, M.A., El-Feraly, F.S., Turner, C.E. 1977. Isolation and characterization of (+)-cannabitriol and (-)-10-ethoxy-9-hydroxy-delta 6a[10a]-tetrahydrocannabinol: Two new cannabinoids from *Cannabis sativa* L. extract. Lloydia 40(3): 275–280.

Esfandiary, F., Rajabzadeh, A., Mojarrad, M., Delavar, A., Soukhtanloo, M. 2023. *Cannabis sativa* ethanolic extract demonstrated significant anti-tumor effects associated with elevated expression of AXIN1 protein in glioblastoma U87-MG cell line. Gene Reports 30, doi: 10.1016/j.genrep.2022.101715.

Fasakin, O.W., Oboh, G., Ademosun, A.O. 2022. Alkaloids-rich extracts from *Cannabis sativa*, *Datura stramonium*, and *Nicotiana tabacum* modulate sexual behavior and key enzymes relevant to sexual function in rats. Comparative Clinical Pathology 31(3): 397–407.

Giselle, F., Azucena, I., Dalila, O., Florencia, F., Facundo, R., Giulia, M., Sandra, F., Maggi, M., Cristina, R. 2023. Antibacterial activity of cannabis (*Cannabis sativa* L.) female inflorescence and root extract against *Paenibacillus larvae*, causal agent of American foulbrood. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 47, doi: 10.1016/j.bcab.2022.102575.

Haddou, S., Hassania Loukili, E., Hbika, A., Chahine, A., Hammouti, B. 2023. Phytochemical study using HPLC-UV/GC–MS of different of *Cannabis sativa* L seeds extracts from Morocco. Materials Today: Proceedings 72: 3896–3903.

Iseppi, R., Brighenti, V., Licata, M., Lambertini, A., Sabia, C., Messi, P., Pellati, F., Benvenuti, S. 2019. Chemical characterization and evaluation of the antibacterial activity of essential oils from fibre-type *Cannabis sativa* L. (Hemp). Molecules 24(12), doi:10.3390/molecules24122302.

Kongkadee, K., Wisuitiprot, W., Ingkaninan, K., Waranuch, N. 2022. Anti-inflammation and gingival wound healing activities of *Cannabis sativa* L. subsp. sativa (hemp) extract and cannabidiol: An *in vitro* study. Archives of Oral Biology 140, doi:10.1016/j.archoralbio.2022.105464 .

Matešić, N., Jurina, T., Benković, M., Panić, M., Valinger, D., Gajdoš Kljusurić, J., Jurinjak Tušek, A. 2021. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Cannabis sativa* L.: Optimization and kinetics study. Separation Science and Technology (Philadelphia) 56(12): 2047–2060.

Mukhtar, T., Kayani, M.Z., Hussain, M.A. 2013. Nematicidal activities of *Cannabis sativa* L. and *Zanthoxylum alatum* Roxb. against *Meloidogyne incognita*. Industrial Crops and Products 42(1): 447–453.

Nigam, M.C., Handa, K.L., Nigam, I.C., Levi, L. 1965. Essential oils and their constituents: XXIX.1 the essential oil of marihuana: Composition of genuine Indian *Cannabis sativa* L. Canadian Journal of Chemistry 43(12): 3372–3376.

Novak, J., Franz, C. 2003. Composition of the essential oils and extracts of two populations of *Cannabis sativa* L. ssp. *Spontanea f*rom Austria. Journal of Essential Oil Research 15(3): 158–160.

Novak, J., Zitterl-Eglseer, K., Deans, S.G., Franz, C.M. 2001. Essential oils of different cultivars of *Cannabis sativa* L. and their antimicrobial activity. Flavour and Fragrance Journal 16(4): 259–262.

Oh, C.M., Choi, J.Y., Bae, I.A., Kim, H.T., Hong, S.S., Noah, J.K., Boo, Y.C. 2022. Identification of *p*-coumaric acid and ethyl *p*-coumarate as the main phenolic components of hemp (*Cannabis sativa* L.) roots. Molecules 27(9), doi: 10.3390/molecules27092781.

Soares, E.F.M.S., Carlos, D.F.L.P., Epifanio, N.M.M., Coumendouros, K., Cid, Y.P., Chaves, D.S.A., Campos, D.R. 2023. Insecticidal activity of essential oil of *Cannabis sativa* against the immature and adult stages of Ctenocephalides felis felis. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria 32(1), doi:10.1590/S1984-29612023003 .

Suman, S., Loveleen, L., Bhandari, M., Syed, A., Bahkali, A.H., Manchanda, R., Nimesh, S. 2022. Antibacterial, antioxidant, and haemolytic potential of silver nanoparticles biosynthesized using roots extract of *Cannabis sativa* plant. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology 50(1): 343–351.

Thomas, T., Sharma, S., Anand, P., Sharma, B. 2000. Insecticidal properties of essential oil of *Cannabis sativa* Linn. against mosquito larvae. Entomon 25(1): 21–24.

Verma, R.S., Padalia, R.C., Verma, S.K., Chauhan, A., Darokar, M.P. 2014. The essential oil of 'bhang' (*Cannabis sativa* L.) for non-narcotic applications. Current Science 107(4): 645–650.

Zheng, H., Chen, B., Rao, J. 2022. Nutraceutical potential of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) extracts: physicochemical stability and bioaccessibility of cannabidiol (CBD) nanoemulsions. Food and Function, doi:10.1039/d1fo04433h.

In vitro evaluation of the biocidal effects of the plant *Artemisia absinthium* on a disease vector, the mosquito *Culiseta longiareolata* from the Tebessa region, Algeria

Hamiri Manel[1*], Bouabida Hayette[2], Dris Djemaa[1]

[1] Department of Applied Biology, Water and Environment Laboratory, University of Tébessa, Tébessa, Algeria.
[2] Department of Living Beings, Water and Environment Laboratory, University of Tébessa, Tébessa, Algeria.

Abstract

In order to limit the use of synthetic chemical products which cause a certain resistance, a contamination of the environment, we have based ourselves on the search for the best alternatives, namely the use of plants for the valorization of plant resources and for the study of their biological activities. The yield of the essential oil of the *Artemisia absinthium* plant; was calculated after hydrodistilation by the Clevenger type apparatus and presents the value 1.50 ±0.27%.
- The toxicological aspect: after the treatment of the fourth stage larvae with different concentrations (LC50, CL25), the toxicological tests were carried out with 15 repetitions each comprising 25 individuals, the larval mortality rate was determined after 24. 48, and 72 hours of treatment, the results obtained show an interesting larvicidal potential as a function of time with regard to the larvae of *Culiseta longiareolata*.
- The morphometric aspect: is presented by the weight and the body volume of the larvae of Culiseta L, the analysis of the data shows that the essential oil affects the weight and the volume of fourth stage larvae. It would be interesting to continue this work by evaluating the insecticidal effect against the adults of mosquitoes tested and also the antibacterial, antifungal and antioxidant effect of the essential oil.

Keywords: *Artemisia absinthium*, essential oil, *Culiseta longiareolata*, morphometric aspect, toxicological aspect.

* e-mail: manel.hamiri@univ-tebessa.dz, manalhmi@yahoo.fr

1. Introduction

Mosquitoes have always been considered a source of nuisance for humans, mainly because they can be disease vectors. (Bouabida et al., 2016). To actively control mosquitoes, several methods have been undertaken around the world, including:

- Contamination of the food chain
- Reaching non-target organisms
- The appearance of resistant insects (Dris et al., 2020)

So chemical control by the use of chemical pesticides, all these reasons have motivated researchers to find other alternatives to conventional insecticides, biological control by the essential oil of the plant *Artemisia Absintium.*

Objectives -Study of the larvicidal effect of essential oil extracted against a species of mosquito, *Culiseta longiareolata*. The insecticidal activity made it possible to determine the lethality parameters (LC50 and CL25)

- Impact of lethal concentration (LC50 and LC25) on morphometric parameters (body weight and volume) of fourth instar larvae.

2. Material and methods

2.1. Presentation of the plant

Artemisia absinthium is a perennial herbaceous plant belonging to the Asteraceae family, found in temperate continental regions of Europe, Asia and North Africa. Commonly called in Algeria; Chiba or hchichet meriem.

Table 1. Systematic of the plant

Règne	**Plantes**
Sous-règne	***Trachéophytes***
Division	***Spermatophytes***
Sous-division	***Angiospermes***
Classe	***Eudicotylédones***
Sous-classe	***Astéridées***
Famille	***Astérales***
Genre	***Artemisia***
Espèce	***Absinthium***

2.2. Presentation of the insect

Culiseta Longiareolata is a pest with complete metamorphosis. More abundant in warm regions. Has a size that varies from 3 to 5mm.

it has a slender body and long, slender legs with long, narrow membranous wings (Bouabida et al., 2016). The larva of these species is characterized by a short, conical siphon with irregularly implanted siphonal comb teeth (Dris et al., 2017).



Figure1. Adult female of Cs. Longiareolata

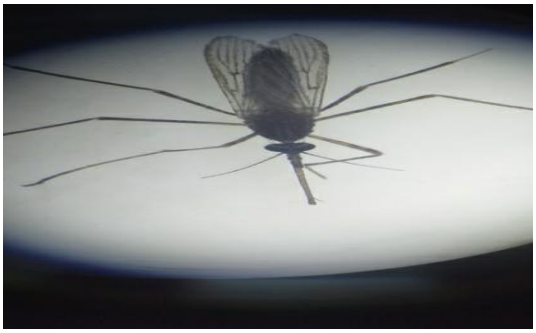


Figure2. larva L4of Culiseta longiareolata

Table 2. Systematic of the insect

Règne	***Animalia***
Embranchement	***Arthropoda***
Classe	***Insecta***
Ordre	***Diptera***
Famille	***Culicidae***
Genre	***Culiseta***
Espèce	***Culiseta longiareolata***

2.3. Extraction of essential oil

The extraction was carried out by the method of hydrodistilation Clevenger-type according to the following steps:

- Dried the plant and cut into small
- 100g of dry matter
- 100g of plant +1l distilled water

- Obtain the essential oil after 2 hours of boiling and stored in a flask wrapped in aluminum foil at 4°C (Bouabida et al., 2016)

2.4. Mosquito breeding technique

1st step:

Placed 25 fourth instar larvae of *Culiseta longiareolata* in 16 beakers containing 150 ml of water.

2nd:

Prepared two solutions treated with 2 different concentrations of *Artemisia absinthium* essential oil diluted in 1 mL of ethanol.

3rd:

We divided the samples into 4 series:

-Positive control series: larvae treated with 1 ml of ethanol

-Series of negative controls: untreated larvae.

-DL 25 series

-DL 50 series

4th: The mortality of individuals is recorded at 24 h, 48 h and 72 hours (Bouabida et al., 2014).

3. Results

a. The yield

The essential oil obtained by hydro distillation of *Artemisia Absinthium* is dark blue in color with a specific smell and with a yield of 1.93%.

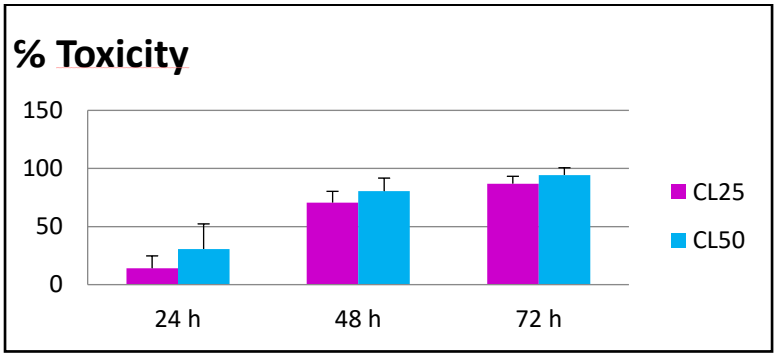


Figure 3. Toxicity of *Artemisia absinthium* L EO (LC25 and LC50), applied to newly exuviated larvae 4 of *C. longiareolata*

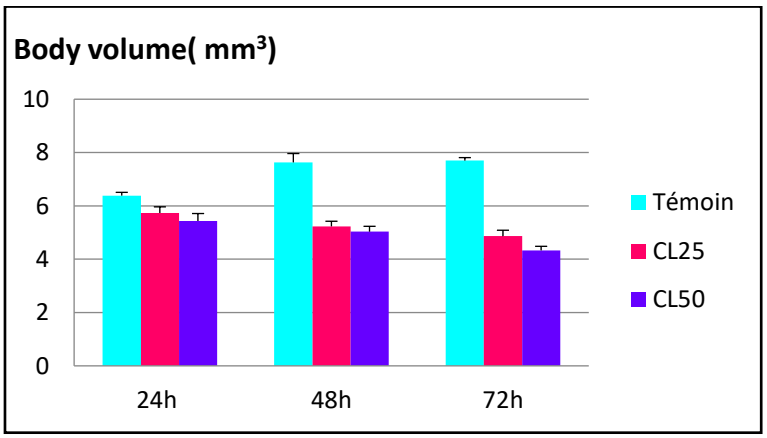


Figure 4. Effect of H.E extracted from *Artemisia absinthium* L (LC25 and LC50) on body volume (mm^3) of L4 larvae in *Culiseta longiareolata*

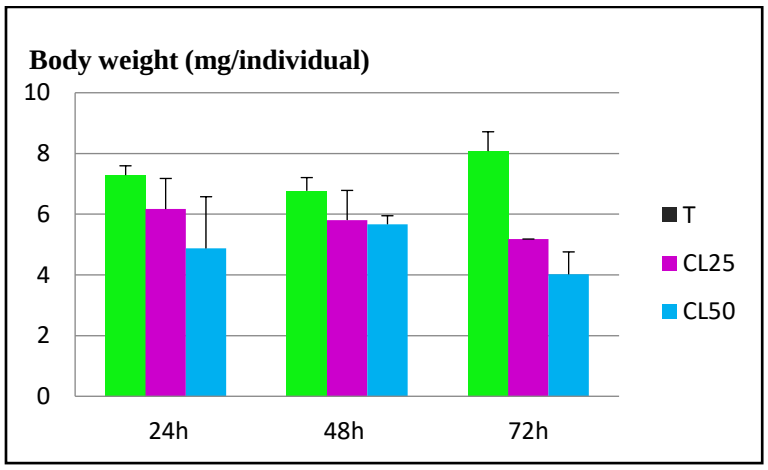


Figure 5. Effect of H.E extracted from *Artemisia absinthium* L (LC25 and LC50) on body weight (mg/individual) of L4 larvae in *Culiseta longiareolata*

4. Discussion

The toxicological tests made it possible to determine the lethal concentrations (LC50 and LC90) of the oil with regard to the newly exuviated fourth stage larvae of *Culiseta longiareolata*. This oil reveals an insecticidal effect with a dose-response relationship and Concentration-dependent time-dependent relationship with the decrease in morphometric parameters Body Volume and Size **(Figure3, 4 and 5)**.

In perspective, it would be interesting to continue this work by evaluating the effect:
The effect of the essential oil of this plant on other resistance mechanisms.
Specify the nature of the compound(s) responsible for the insecticidal activity.
The discovery of new plants and subsequently new molecules with a phytosanitary effect.
Antibacterial, antifungal and antioxidant properties of these essential oils.

Insecticide of these essential oils against adults and the egg and stages L1, L2, L3 and the nymph of the species tested.

A study of the biological activities of this oil on other biological models bacteria, fungi

References

Bouabida, H. 2014. Inventaire des moustiques de la région de Tébessa et bioactivité du spiromesifène sur la reproduction de *Culiseta longiareolata* et *Culex pipiens* : aspects écologique et biochimique. Doctorat thesis. University of Badji Mokhtar. Annaba, Algeria.

Bouabida, H., Djebbar, F., Soltani, N. 2016. Bioactivité de spiromisoféne sur deux espèces de moustique. Presses académiques Francophones.

Dris, D., Bouabida, H. 2020. Larvicidal activity of an Algerian Ruta Graveolens essential oil on mosquito species *Culex pipiens***.** Transylvanian Review. XXVII(47): 14717- 14723.

Dris, D., Tine-Djebbar, F., Soltani, N. 2017. Lavandula dentata essential oils: chemical composition and larvicidal activity against *Culiseta longiareolata* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). African Entomology. 25(2): 387-394.

Marine natural compounds as natural antioxidants: a brief review

Salim Sharifian[*1], Rohallah Zare[2]

[1] Fisheries Department, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran
[2] Marine Biology Department, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

Abstract

Antioxidants are essential compounds that protect the body from the damaging effects of free radicals. They play a vital role in maintaining good health and preventing the development of various diseases. Seaweed and marine natural compounds have been found to be rich sources of antioxidants, making them a promising area of research. Marine algae, for example, contain high concentrations of antioxidants such as polyphenols, phlorotannins, and carotenoids, which have been shown to have anti-inflammatory, anticancer, and neuroprotective properties. Similarly, seaweed extracts, such as brown seaweed, have been found to contain high levels of antioxidants, as well as other beneficial compounds, such as iodine and alginate. These properties make seaweed and marine natural compounds ideal candidates for the development of new functional foods, supplements, and cosmetics. Additionally, the antioxidant content of seaweed and marine natural compounds can be enhanced through various processing techniques, making them even more valuable for health and wellness applications. Therefore, in the present study, an attempt has been made to conduct a comprehensive review of the antioxidant properties of natural marine compounds.

Keywords: Antioxidant, Marine natural components, Seaweed

1. Introduction

Antioxidants are compounds that play a crucial role in protecting the body against oxidative stress and preventing various chronic diseases. Oxidative stress is a condition in which there is an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the body's ability to neutralize them through antioxidant defence mechanisms (Cotas et al. 2020). ROS are highly reactive molecules that can damage cellular components such as DNA, proteins, and lipids, leading to cellular injury and oxidative stress. This can result in a wide range of chronic diseases, such as cancer, cardiovascular disease, neurological disorders, and aging. Reactive oxygen species (ROS) are highly reactive molecules that are produced as by-products of normal cellular metabolism. ROS include highly reactive molecules such as superoxide anions, hydroxyl radicals, and hydrogen peroxide. Under normal conditions, ROS are produced in low levels and are effectively scavenged by

* sharifian.salim@hotmail.com

antioxidant enzymes and other protective mechanisms. However, when there is an imbalance between the production of ROS and the antioxidant defence mechanisms, oxidative stress can occur, leading to damage to cellular components such as lipids, proteins, and DNA. Oxidative stress has been implicated in the development of various chronic diseases, including cancer, cardiovascular disease, and neurodegenerative diseases (Corino et al. 2019). It can also contribute to aging and the decline in cellular function that occurs with age. ROS can be generated in response to a variety of environmental stressors, including exposure to ultraviolet light, ionizing radiation, and environmental pollutants, as well as through normal metabolic processes, such as the electron transport chain in the mitochondria (Cotas et al. 2020). Antioxidants can neutralize ROS by donating an electron, thus preventing them from damaging cellular components. Some of the most commonly known antioxidants include vitamins C and E, beta-carotene, and selenium. These antioxidants are found in many fruits, vegetables, and whole grains, as well as dietary supplements. Vitamin C is a water-soluble antioxidant that is involved in the biosynthesis of collagen, a protein that provides structural support to tissues, and carnitine, a molecule involved in energy production. Vitamin C also acts as a scavenger of ROS, neutralizing them before they can cause damage. Foods high in vitamin C include citrus fruits, bell peppers, kiwi, strawberries, and broccoli. Vitamin E is a fat-soluble antioxidant that is important in protecting cell membranes from oxidative damage. Vitamin E acts by neutralizing ROS, and it can also regenerate other antioxidants, such as vitamin C. Foods high in vitamin E include almonds, sunflower seeds, and avocado (Matos et al. 2021). Beta-carotene is a pigment found in fruits and vegetables that the body can convert into vitamin A, a nutrient important for vision, immune function, and skin health. Beta-carotene acts as an antioxidant by neutralizing ROS and providing protection against cellular damage. Foods high in beta-carotene include carrots, sweet potatoes, spinach, and kale. Selenium is a trace mineral that is an essential component of several enzymes involved in antioxidant defense. One such enzyme is glutathione peroxidase, which neutralizes hydrogen peroxide, a highly reactive ROS. Selenium can also interact with other antioxidants, such as vitamin E, to provide additional protection against oxidative damage. Foods high in selenium include Brazil nuts, seafood, and mushrooms. In addition to vitamins and minerals, several plant-based compounds have been shown to possess antioxidant properties. These include polyphenols, such as resveratrol found in red wine and grapes, seaweed and catechins found in green tea and many of marine organism. These compounds provide additional protection against oxidative stress by neutralizing ROS and reducing inflammation (Zhong et al. 2020).

Studies have shown that diets rich in antioxidants are associated with a reduced risk of chronic diseases, such as cardiovascular disease, cancer, and neurological disorders. For example, a diet high in fruits and vegetables has been shown to reduce the risk of heart disease, while high intakes of vitamin E have been associated with a reduced risk of Alzheimer's disease. Similarly, diets high in selenium have been linked to a reduced risk of certain cancers, such as prostate cancer. However, it is important to note that not all studies on the health benefits of antioxidants have been consistent, and more research is needed to fully understand the effects of these compounds on human health. Some studies have even shown that high doses of certain antioxidants, such as beta-carotene, can be harmful and increase the risk of certain diseases. This highlights the importance of obtaining antioxidants from a balanced diet and avoiding high doses of antioxidant supplements (Farvin and Jacobsen 2013).

A comprehensive review of antioxidants and marine natural compounds, particularly seaweeds, is essential due to the increasing interest in natural bioactive compounds for their therapeutic potential

in the prevention and management of chronic diseases, such as cardiovascular disease, cancer, and neurodegenerative disorders. The protective role of antioxidants against oxidative stress, a contributing factor in the pathogenesis of chronic diseases, is well-established. Marine natural compounds, including those from seaweeds, are recognized as a promising source of antioxidants, and thus are being extensively studied. Furthermore, seaweeds contain an array of bioactive compounds with diverse biological activities, including anti-inflammatory, antimicrobial, and anticancer properties. Therefore, a thorough review of the current scientific literature on these topics can provide a better understanding of the potential therapeutic applications of these compounds and highlight areas that require further investigation.

2. Marine natural compounds

Marine natural compounds refer to a diverse group of biologically active molecules that are derived from various marine organisms, including microorganisms, plants, and animals. These compounds have been the subject of extensive research in recent years due to their potential as a source of new drugs and other therapeutic agents (Alboofetileh *et al*. 2021). One of the most remarkable features of marine natural compounds is their structural diversity. They can range from simple organic compounds, such as sugars and amino acids, to complex macromolecules, such as polyketides, alkaloids, and glycoproteins. This diversity reflects the variety of habitats and ecological niches occupied by marine organisms, as well as the pressures they face from predators, parasites, and competitors. Marine natural compounds have a wide range of biological activities, including antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, and anti-tumor effects. For example, many marine-derived compounds have been found to exhibit potent antibacterial properties, making them potential candidates for the treatment of infectious diseases. Some of these compounds have also shown promise as antiviral agents, with the ability to inhibit the replication of viruses such as HIV and the hepatitis B virus. Another important aspect of marine natural compounds is their potential as anti-inflammatory agents. Inflammation is a hallmark of many diseases, including cancer, cardiovascular disease, and arthritis, and compounds that can modulate the inflammatory response may have therapeutic value in these conditions. Marine natural compounds have been shown to have potent anti-inflammatory effects, which is why they are being intensively studied for their potential as new drugs. In addition to their therapeutic potential, marine natural compounds also have other important applications. For example, some compounds have been found to have antimicrobial properties and are being explored for their potential use as preservatives in food, cosmetics, and personal care products. Other compounds have been found to have anti-tumor effects and are being studied as potential cancer therapies (Manlusoc *et al*. 2019).
Marine natural compounds in marine environment are produced by different organisms, such as algae, sponges, corals, and microorganisms. These compounds can be extracted from marine organisms using various methods, including:

- Solvent extraction: This involves the use of solvents, such as ethanol, methanol, or chloroform, to dissolve the compounds from the marine organisms. The mixture is then filtered, and the solvent is evaporated to obtain the concentrated extract. The choice of solvent can have a significant impact on the yield and composition of the extract from algae. Different solvents have different solubility properties and can extract different components from the algae. For example, polar solvents, such as water or ethanol, are

often used to extract water-soluble compounds, such as polysaccharides, from algae. The use of polar solvents can result in high yields of water-soluble compounds, but may not be effective in extracting lipophilic compounds. On the other hand, non-polar solvents, such as hexane or chloroform, are often used to extract lipophilic compounds, such as pigments and lipids, from algae. The use of non-polar solvents can result in high yields of lipophilic compounds, but may also extract undesirable components, such as waxes and chlorophyll, which can impact the quality and composition of the extract. Additionally, the use of mixtures of solvents can help to increase the yield and improve the composition of the extract. For example, the use of a combination of polar and non-polar solvents can help to extract both water-soluble and lipophilic compounds from the algae (Matos et al. 2021).

- Supercritical fluid extraction (SFE): This method uses supercritical CO2 as the extraction solvent, which has a high solubility for lipophilic compounds and a low solubility for water-soluble compounds. SFE is a green extraction method that does not require the use of harmful solvents.

- Ultrasonic-assisted extraction (UAE): This method involves the use of ultrasonic waves to disrupt the cell walls of the marine organisms, thereby increasing the extraction efficiency. UAE is a rapid and effective method for extracting marine natural compounds.

- Fermentation: This method involves the cultivation of marine microorganisms, such as bacteria or fungi, in a suitable medium. The marine natural compounds produced by the microorganisms can then be extracted and purified.

The antioxidant capacity of seaweed extracts can be evaluated using various methods, such as the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, and the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. These methods measure the ability of the extract to scavenge free radicals, reduce oxidative stress, and protect cellular components from oxidative damage. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) is a stable free radical used in vitro to measure the antioxidant capacity of different compounds. The DPPH radical scavenging assay is a widely used method to evaluate the antioxidant activity of various substances, including polyphenols, vitamins, and other antioxidants (Salehi et al. 2019). In the DPPH radical scavenging assay, a solution of DPPH is mixed with a sample of the substance being tested. If the substance is an antioxidant, it will scavenge the DPPH radical, resulting in a reduction in its absorbance at a specific wavelength (517 nm). The extent of the reduction in absorbance is proportional to the antioxidant capacity of the substance being tested. DPPH radical scavenging assays are widely used to evaluate the antioxidant capacity of different compounds due to their simplicity, reproducibility, and sensitivity. They are useful for comparing the antioxidant capacities of different compounds, and for ranking the antioxidant capacity of different food components. However, it is important to note that DPPH radical scavenging assays are in vitro tests and may not accurately reflect the antioxidant capacity of a substance in vivo. The bioavailability, metabolism, and activity of antioxidants can vary greatly depending on factors such as the food matrix, cooking methods, and the presence of other food components. As a result, in vitro tests, such as the DPPH radical scavenging assay, should be interpreted with caution and in conjunction with other methods

to evaluate the antioxidant capacity of different substances (Øverland *et al*. 2019).

3. Seaweeds in Persian Gulf and Oman Sea

Seaweeds are a diverse group of multicellular, marine macroalgae that play a critical role in the marine ecosystem. They serve as a primary source of food and habitat for a variety of marine organisms and also play a significant role in the biogeochemical cycling of nutrients in the ocean. In Iran, the Persian Gulf and the Oman Sea are two of the most important areas for seaweed distribution, with a rich and diverse seaweed flora (Salehi *et al*. 2019).

The Persian Gulf is located in the northwestern part of the Indian Ocean and is surrounded by Iran, Iraq, Kuwait, Saudi Arabia, Bahrain, Qatar, and the United Arab Emirates. The Gulf is a semi-enclosed body of water with a warm, arid climate and high salinity, which creates a unique environment for the growth and distribution of seaweeds. A number of studies have been carried out on the seaweed flora of the Persian Gulf, with a focus on the distribution and diversity of seaweeds in the region. These studies have revealed that the Persian Gulf is home to a diverse seaweed flora, with over 150 species of seaweeds belonging to 57 genera and 19 families reported.

The most common seaweeds found in the Persian Gulf are green seaweeds, followed by red and brown seaweeds. The green seaweeds are the most diverse and abundant group, with a total of 73 species belonging to 29 genera. These seaweeds are typically found in shallow, sheltered areas and are adapted to the high temperature and salinity conditions of the Persian Gulf. Some of the most commonly found green seaweeds in the Persian Gulf include *Ulva lactuca*, *Enteromorpha compressa*, and *Caulerpa racemosa*.The red seaweeds are the second most common group in the Persian Gulf, with a total of 57 species belonging to 20 genera (Salehi et al. 2019). These seaweeds are typically found in deeper waters, away from the shoreline, and are adapted to the high salinity conditions of the Persian Gulf. Some of the most commonly found red seaweeds in the Persian Gulf include *Gracilaria verrucosa*, *Kappaphycus alvarezii*, and *Eucheuma spinosum*. The brown seaweeds are the least diverse and abundant group in the Persian Gulf, with a total of 20 species belonging to 8 genera. These seaweeds are typically found in deeper waters, away from the shoreline, and are adapted to the high salinity conditions of the Persian Gulf. Some of the most commonly found brown seaweeds in the Persian Gulf include *Sargassum muticum*, *Padina pavonica*, and *Dictyota dichotoma*.

The Oman Sea is located in the northeastern part of the Indian Ocean and is bordered by Iran, Oman, and the United Arab Emirates. The Oman Sea is a semi-enclosed body of water with a warm, arid climate and high salinity, similar to the Persian Gulf. A number of studies have been carried out on the seaweed flora of the Oman Sea, with a focus on the distribution and diversity of seaweeds in the region. These studies have revealed that the Oman Sea is home to a diverse seaweed flora, with over 100 species of seaweeds belonging to 36 genera and 12 families reported. The most common seaweeds found in the Oman Sea are green seaweeds, followed by red and brown seaweeds. The green seaweeds are the most diverse and abundant group, with a total of 47 species belonging to 18 genera. These seaweeds are typically found in shallow, sheltered areas and are adapted to the high temperature and salinity conditions of the Oman Sea. Some of the most commonly found green seaweeds in the Oman Sea include *Ulva lactuca*, *Enteromorpha*

Seaweed is a rich source of antioxidants, including polyphenols, carotenoids, and phlorotannins, which have been shown to have potent antioxidant activities. For example, brown seaweed species, such as kelp and seaweed, contain high levels of fucoxanthin, a carotenoid with potent antioxidant

and anti-inflammatory properties. Red seaweed species, such as dulse and nori, are rich in phlorotannins, which have been shown to have potent antioxidant activities and to protect against oxidative stress (Alboofetileh et al. 2021).

4. Polyphenols

Polyphenols are a class of naturally occurring compounds that are widely distributed in the plant kingdom, including seaweeds. These compounds are known for their potent antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer properties, making them of great interest to researchers in the field of nutrition and health. Seaweeds, also known as marine macroalgae, are a diverse group of aquatic plants that occupy a unique position in the food chain as primary producers (Cotas et al. 2020). They are rich in a variety of nutrients, including vitamins, minerals, and phytochemicals, such as polyphenols. In recent years, the interest in seaweed-derived polyphenols has increased due to their potential health benefits and the growing awareness of the health benefits of seaweed as a whole food. One of the most well-known polyphenols found in seaweed is fucoxanthin, a carotenoid that is found primarily in brown seaweeds. This compound has been shown to have potent antioxidant properties and to have the potential to reduce the risk of chronic diseases such as cardiovascular disease, diabetes, and cancer. In addition, fucoxanthin has been shown to have anti-inflammatory effects, making it a promising target for the development of new therapies for the treatment of inflammation-related diseases (Matos et al. 2021). Another class of polyphenols found in seaweed is the phlorotannins, which are found primarily in brown seaweeds. These compounds are known for their strong antioxidant and anti-inflammatory properties, and have been shown to have the potential to reduce the risk of various chronic diseases, including cancer, cardiovascular disease, and neurodegenerative diseases. In addition to fucoxanthin and phlorotannins, seaweeds are also rich in other polyphenols, such as phenolic acids and flavonoids. These compounds have been shown to have a variety of health benefits, including the potential to reduce oxidative stress, improve cardiovascular health, and reduce the risk of chronic diseases such as cancer. Despite the growing body of evidence supporting the health benefits of seaweed-derived polyphenols, there is still much that is unknown about these compounds and their mechanisms of action. Further research is needed to fully understand the potential health benefits of these compounds and to determine the most effective ways to incorporate seaweed and its polyphenols into the diet (Øverland *et al*. 2019).

5. Conclusion

Marine natural compounds are a fascinating and diverse group of molecules that are being actively researched for their therapeutic potential and other applications. Despite the rapid pace of research in this area, much is still unknown about the biology of these compounds and their mechanisms of action, and much more work remains to be done to fully understand and exploit their potential. However, given their unique properties and broad range of biological activities, marine natural compounds are sure to play a major role in the discovery and development of new drugs and other useful products in the years to come. solvent extraction is a commonly used method to extract antioxidants from seaweed, and the antioxidant capacity of seaweed extracts can be evaluated using various methods, such as the DPPH, FRAP, and ORAC assays. Seaweed is a rich source of antioxidants, including polyphenols, carotenoids, and phlorotannins, with potent antioxidant activities, making it a potential source of natural antioxidants for use in various applications.

References

Alboofetileh M, Hamzeh A, Abdollahi M.. 2021. Seaweed proteins as a source of bioactive peptides. Curr Pharm Des. 27(11):1342–1352.

Corino C, Modina SC, Di Giancamillo A, Chiapparini S, Rossi R.. 2019. Seaweeds in pig nutrition. Animals. 9(12):1126.

Cotas J, Leandro A, Monteiro P, Pacheco D, Figueirinha A, Gonçalves AMM, da Silva GJ, Pereira L.. 2020. Seaweed phenolics: from extraction to applications. Mar Drugs. 18(8):384.

Farvin KHS, Jacobsen C.. 2013. Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. Food Chem. 138(2–3):1670–1681.

Manlusoc JKT, Hsieh CL, Hsieh CY, Salac ESN, Lee YT, Tsai PW.. 2019. Pharmacologic application potentials of sulfated polysaccharide from marine algae. Polymers (Basel). 11(7):1163.

Matos GS, Pereira SG, Genisheva ZA, Gomes AM, Teixeira JA, Rocha CMR.. 2021. Advances in extraction methods to recover added-value compounds from seaweeds: sustainability and functionality. Foods. 10(3):516.

Øverland M, Mydland LT, Skrede A.. 2019. Marine macroalgae as sources of protein and bioactive compounds in feed for monogastric animals. J Sci Food Agric. 99(1):13–24.

Salehi B, Sharifi-Rad J, Seca AML, Pinto DCGA, Michalak I, Trincone A, Mishra AP, Nigam M, Zam W, Martins N.. 2019. Current trends on seaweeds: looking at chemical composition, phytopharmacology, and cosmetic applications. Molecules. 24:4182.

Zhong B, Robinson NA, Warner RD, Barrow CJ, Dunshea FR, Suleria HAR.. 2020. LC-ESI-QTOF-MS/MS characterization of seaweed phenolics and their antioxidant potential. Mar Drugs. 18(6):331.

Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction (HS SPME) Based on MgAl Layered Double Hydroxide as a Fiber Coating for Analysis of *Grammosciadium platycarpum* Essential Oil

Marzieh Babashpour-Asl[1*], Marzieh Piryaei[2]

[1]Department of Horticultural Science, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran
[2]Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, Iran

Abstract

The study investigated the reliability of polystyrene/MgAl-layered double hydroxide as a 3D new nanostructure solid phase microextraction fiber coating for extraction and determination the essential oil of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn. growing wild in Maragheh region, East Azerbaijan province, Iran. The Headspace solid phase microextraction coupled with gas chromatography/mass spectrometric method was applied for analyzing of volatile oils. Within the study elaborated, some important experimental parameters affecting the extraction efficiency of essential oils were studied in detail and the optimal conditions are as follows: Desorption temperature, 260° C; Desorption time, 150 sec.; sample weight, 1.5 g; extraction temperature, 80 ° C; extraction time, 20 min. Although to date, SPME devices have been used mainly in laboratory applications, recent research has been directed towards remote monitoring, particularly for clinical, field environmental and industrial hygiene applications.

Key words: Volatile Oil, Microextraction, LDH, Nanomaterial, *Grammosciadium* DC., GC/MS.

* e-mail: babashpour@gmail.com

Introduction

Nowadays, modern sample preparation in analytical chemistry is characterized by simplification, high enrichment and minimization of sample amount and solvent (Zhang et al., 2007). In recent years, headspace solid phase microextraction (HS-SPME) has gained wide acceptance as an effective extraction technique for a wide variety of samples (Bicchi et al., 2000; Majithia et al., 2021; Zanella et al., 2021; Wang et al., 2022). HS-SPME has mainly been applied for studying the composition of the volatile fraction, in addition to or as an alternative to other sampling techniques. A number of SPME fibers with different polarity and coating thickness are commercially available and are used for extraction of the volatile compounds in medicinal plants (Gholivand et al., 2012; Nemati Kharajuo et al., 2017; Hendi et al., 2018; Hosseinzadeh et al., 2018;). From solid phase microextraction point of view, the fiber coating and the material of coating are very important (Yang and Xie, 2006; Gholivand and Abolghasemi, 2012; Gholivand et al., 2011). For this purpose, new sorbents based on activated carbon (Zhong et al., 2006), metal oxide nano particles (Mehdinia et al., 2006), hexagonally ordered silica material (Gholivand et al., 2011), conducting polymers (Gholivand et al., 2012; Gholivand and Abolghasemi, 2012), molecular-imprinted polymers (MIPs) (Djozan and Ebrahimi, 2008) and ionic liquid-modified silica (Abolghasemi et al., 2013) are recently appeared as alternatives to conventional SPME materials. Recently, there is a series of reports on the research of polymer/Layered double hydroxides nanocomposite as fiber coating. Layered double hydroxides (LDHs) are well characterized as anionic clays and utilized in wide range of technological applications such as catalysts, adsorbents, separation techniques and ion-exchangers (Abolghasemi and Yousefi, 2014).

The genus *Grammosciadium* DC. from the Apiaceae family consists of 9 species (Bani et al., 2011), three of them grow in Iran, which are characterized by setaceous leaf lobes, the persistent and often prominent sepals (Sonboli et al., 2005a). It is endemic to Irano-Turanian phytogeographic region (Takhtajan et al., 2005). *G. platycarpum* is a perennial plant growing up to 40 cm high, which is found in sandy mountain areas of Iran (Sonboli et al., 2005b). *Grammosciadium* species has been rarely documented in folk medicine. The dried leaves of *G. platycarpum* are used as spice for meals. This species which is named ‘Jafari koohi’, ‘Shevid Koohi’ and ‘Samoureh’, are also traditionally used for hyperlipidemia and cooked as edible foods in Iran (Babashpour-Asl et al., 2012). It has a pleasant test and odor and is sold under the Azeri name ‘Surulu’ as a vegetable and food additive in Maragheh region during the spring (Nazemiyeh et al., 2006). There have been a number of studies on the chemical compositions of the volatile oils obtained from various species of the genus *Grammosciadium*, including *Grammosciadium scabridum* Boiss. (Shikhiev et al., 1979), *G. platycarpum* (Sonboli et al., 2005a; Ahvazai et al., 2012), *Grammosciadium daucoides* DC. (Nickavar et al., 2006), *Grammosciadium pterocarpum* Boiss. (Sonboli et al., 2005b), and *Grammosciadium scabridum* Boiss. (Küçükboyacı et al., 2015) growing in different countries. In this research we focused on investigation new application of layered double

hydroxide nanostructured for essential oil extraction. So, a new three dimensionally (3D) polystyrene nanocomposite based on MgAl layered double hydroxide (PS/MgAl-LDH) sorbent, was synthesized and used as a novel coating for SPME fiber. The aim of this research was to develop a HS-SPME method using of proposed fiber in combination with GC/MS that can be utilized for the analysis of the essential oil of *G. platycarpum*. To the best of our knowledge, no related publications are available for the purpose.

Material and Methods

Plant Material

Aerial parts of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn. were collected during the flowering stage from Sahand region (37° 30' 0.2", 46° 17'49.2"; 1870 m, 15 km from Maragheh to Ashan village), East Azerbaijan province, Iran in May 2020. A voucher specimen (TUM-FPh-142) for these collections has been deposited at the Herbarium of the Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences.

Chemicals and Ragents

Styrene monomer, Magnesium chloride ($MgCl_2$), aluminum chloride ($AlCl_3$), Sodium hydroxide (NaOH) with maximum available purities were purchased from Merck and used as received. All chemical solvents were obtained from the Fluka or Merck companies.

Apparatus and GC–MS Analysis

A Hewlett-Packard Agilent 7890A series GC equipped with a split/splitless injector and an Agilent 5975 C mass-selective detector system were utilized for determination. The MS was operated in the EI mode (70 eV). Helium (99.999%) was employed as a carrier gas, and its flow-rate was adjusted to 1.1 mL min^{-1}. The separation of essential oils was performed on a 30 m×0.25 mm HP-5 MS column with 0.25 µm film thickness. The column was held at 50 °C and increased to 180 °C at a rate of 15 °C min^{-1} and then it was raised to 260 °C at 20 °C min^{-1} and kept at this temperature for 5 minutes. The injector temperature was set at 260 °C, and all injections were carried out on the splitless mode for 2 minutes. The GC-MS interface, ion source and quadrupole temperatures were set at 280, 230 and 150 °C, respectively. Compounds were identified using the Wiley 7N (Wiley, New York, NY, USA) Mass Spectral Library. A homemade SPME device was used for holding and the injection of the proposed fiber into the GC-MS injection port. The fiber was conditioned in the injection port of a GC for 1 h.

Synthesis of Polystyrene/MgAl-LDH Nanocomposite

Polystyrene (PS) spheres (ranging from 150 to 1000 nm) was prepared following the procedure of Kotera *et al*. [40] by ‘emulsifier-free’ emulsion polymerization. Monomer styrene was distilled before use to remove any traces of inhibitor. The PS particles initially suspended in water (10 wt%) were packed into three-dimensional colloidal crystals by centrifugation at 4000 rpm during 5 h. After drying at room temperature, 1 g of iridescent

crystal was immersed in 6 mL of a 1 M solution of metal salts containing magnesium chloride (0.67 M) and aluminum chloride (0.33 M), and was formed by a mixture water-ethanol (50/50, v/v). The filled samples were dried and then soaked in 2 M sodium hydroxide aqueous solution in order to achieve the template LDH precipitation. The excess of solution was removed by a slight filtration in Buchner funnel; finally, the samples were washed with water, and then dried for a day. Subsequently, the polystyrene beads were removed by heating at 400 °C during one day. The calcined samples were finally immersed in 5 mL of deionized water at room temperature for a day [41].

Preparation of the SPME Fiber

A piece of stainless steel wire with a 200µm diameter was cleaned twice with methanol in an ultrasonic bath for 20 minutes and dried at 70 °C. One centimeter of the wire was limed with epoxy glue and the PS/MgAl-LDH nanocomposite was immobilized onto the wire. The coated wire was heated to 50 °C for 48 h in an oven, gently scrubbed to remove non-bonded particles and assembled to the SPME holder device. Finally, prepared SPME fiber was inserted into the GC injection port to be cleaned and conditioned at 260 °C for 1 h in a helium environment. The thickness of the uniform coating layer was calculated from the difference between the coated and uncoated stainless steel wire and come out to be about 20µm.

The Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) Procedure

SPME was performed with the prepared 3D-LDH fiber, mounted in its SPME device (Figure 1). During the headspace extraction, the aqueous samples were continuously stirred with a magnetic stir bar. The extraction temperature was controlled using a thermostated water bath. Thermal desorption of retained compounds on fiber was carried out at 275 °C while the split valve of injector on the GC kept closed at different period of times. After reaching the extraction time, the SPME probe containing analytes from the sample, was withdrawn from the vial and inserted into the GC injection port for thermal desorption.

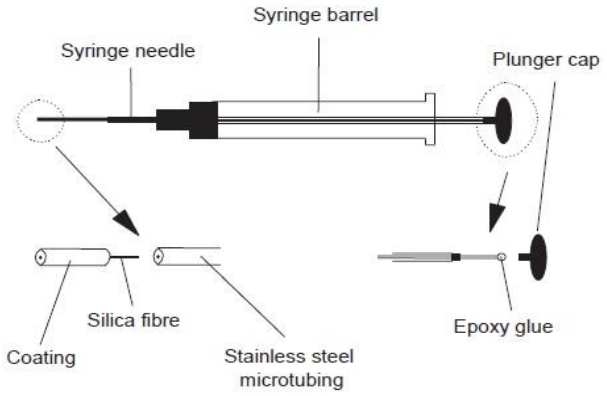


Figure 1. The custom-made SPME device based on the Hamilton 7000 series syringe [42]

Results

Before optimization of the extraction parameters, complete desorption of the collected analytes in the GC/MS injection port, and their proper separation over the column were optimized. For this purpose, different injector temperatures and desorption times were tested. The upper temperature that can be used for desorption of the analytes from a fiber is limited by the thermal stability of its coating. For the 3D-LDH SPME fiber, desorption temperatures ranged between 200 and 280 °C. A temperature of 260 °C was found to be appropriate for the efficient desorption of analytes from the proposed fiber without damaging its coating (Figure 2). Desorption times from 60 to 200 sec. were investigated at this temperature and 150 sec. was selected for a complete desorption with no memory effect (Figure 3).

Extraction Temperature Effect

A varied extraction temperature of 40-100 °C was considered as shown in Figure 4. Either the total or individual peak areas were found to be enhance with the temperatures of up to 80 °C, which then led to a leveling-off state. The significant impact of the extraction temperature on the extraction process was evidenced due to its effect on the compound distribution between the headspace and the fiber/sample. These results made us choose the final temperature of 80 °C for this work.

Extraction Time Effect

The extraction time varying from 10 to 35 minutes was investigated and the results are shown in Figure 5. The profile for the total and individual peaks area shows highest peak area at 20 minutes for the target compounds.

Sample Weight Effect

Increasing the sample weight generally leads to elevated analyte signals; however, extraction efficiency may be influenced by its large amounts. This does not mean that better results can be achieved by larger amounts of a sample. In the present work, a range of 0.5 to 3 g of the sample weight was utilized. The results of their effects on the total and individual peak areas of the 4 studied compounds are presented in Figure 6. As expected, the mentioned peak areas leveled off with the amounts of more than 1.5 g after augmenting up to this amount.

Added Water Effect

Since in this study the dried *G. platycarpum* plants were used as the samples, the effect of humidity was studied by the addition of different amounts of water to the samples in the optimized conditions. As shown in Figure 7, addition of water had a negative influence on the response. It means that the water molecules can deactivate the fiber surface by blocking the active sites; therefore, the proposed fiber is a good adsorptive fiber for sampling from the dried samples.

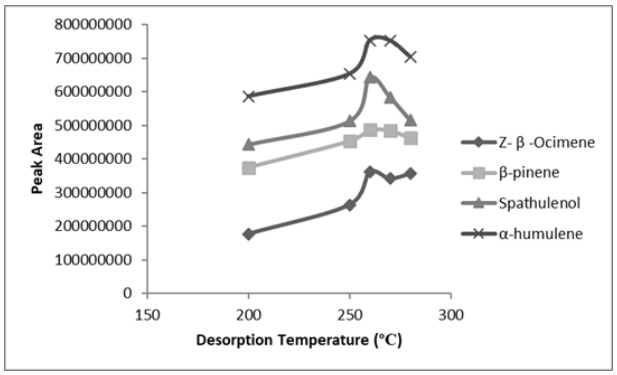


Figure 2. Effect of the desorption temperature on the extraction efficacy of essential oils of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn.

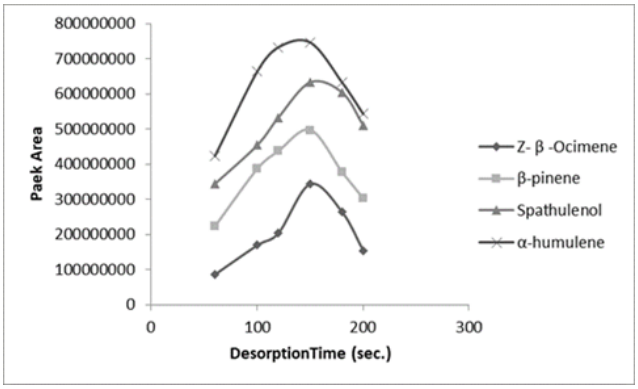


Figure 3. Effect of the desorption time on the extraction efficacy of essential oils of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn.

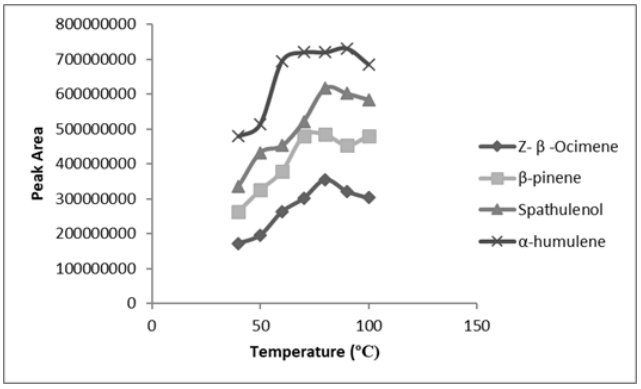


Figure 4. Effect of the extraction temperature on the extraction efficacy of essential oils of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn.

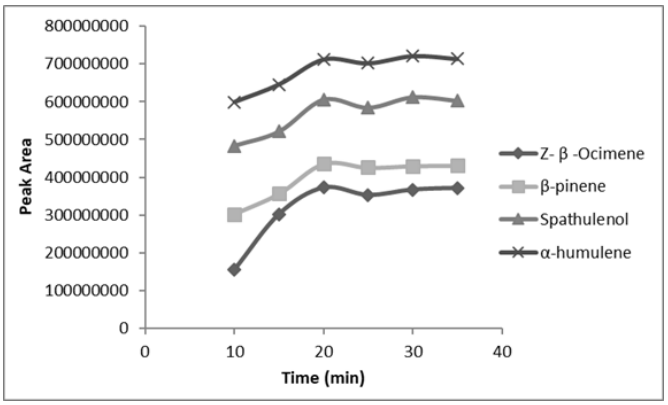


Figure 5. Effect of the extraction time on the extraction efficacy of essential oils of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn.

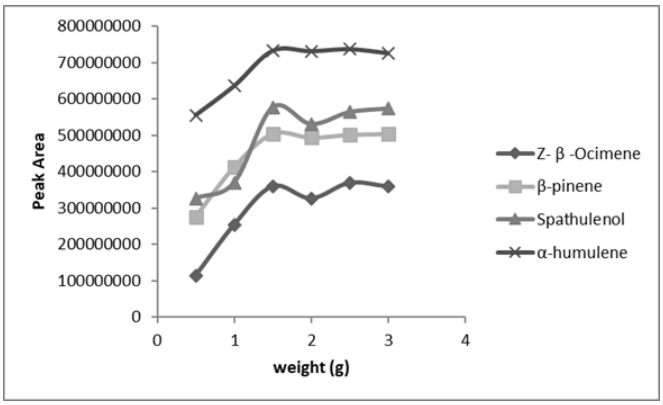


Figure 6. Effect of the sample weight on the extraction efficacy of essential oils of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn.

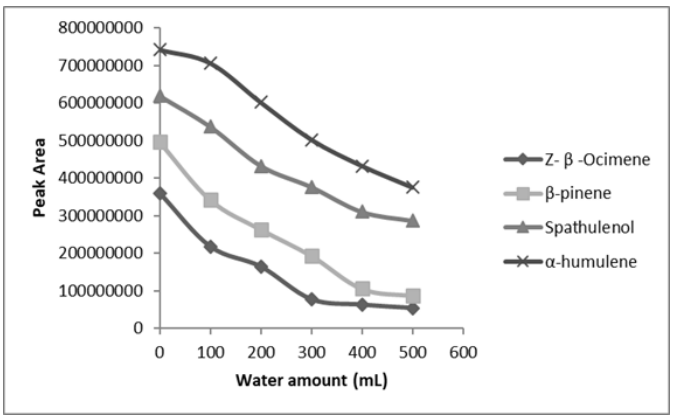


Figure 7. Effect of the added water on the extraction efficacy of essential oils of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn.

Conclusion

The presented experimental results clearly demonstrated that the novel fiber was suitable for HS-SPME of essential oils analyses. The fiber was mechanically stable, exhibited relatively high thermal stability and good repeatability. The construction of the fiber was very simple. The enhanced sorbent capacity was originated from the properties of the nanostructures, including porous structure, large surface area, and homogeneous honeycomb morphology. In comparison with an HD method, the proposed technique could equally monitor almost all the components of the sample, in an easier way, shorter time, and a much lower amount of sample was needed.

References

Abolghasemi, M., Yousefi, V. 2014. Three dimensionally honeycomb layered double hydroxides framework as a novel fiber coating for headspace solid-phase microextraction of phenolic compounds. Journal of Chromatography A. 1345: 9–16.

Ahvazi, M., Khalighi-Sigaroodi, F., Charkhchiyan, M., Mojab, F., Mozaffarian, V., Zakeri, H. 2012. Introduction of medicinal plants species with the most traditional usage in Alamut region. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 11: 185–194.

Babashpour-Asl, M., Talebpour, A., Alijanpour, R. 2012. Introducing of medicinal plants in Maragheh, Eastern Azerbaijan province (northwestern Iran). Journal of Medicinal Plants Research. 6: 4208–4220.

Bani, B., Mavi, Ö., Adigüzel, N. 2011. Morphological and Anatomical notes on a local endemic species: *Grammosciadium confertum* Hub.-Mor. & Lamond(Umbelliferae). Biological Diversity and Conservation.4: 1–6.

Bicchi, C., Drigo, S., Rubiolo, P. 2000. Influence of fiber coating in headspace solid-phase microextraction–gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. Journal of Chromatography A. 892: 469–485.

Djozan, D., Ebrahimi, B. 2008. Preparation of new solid phase micro extraction fiber on the basis of atrazine-molecular imprinted polymer: application for GC and GC/MS screening of triazine herbicides in water, rice and onion. Analytica Chimica Acta. 616: 152–159.

Gholivand, M.B., Abolghasemi, M.M. 2012. Inside needle capillary adsorption trap device for headspace solid-phase dynamic extraction based on polyaniline/hexagonally ordered silica nanocomposite. Journal of Separation Science. 35: 695–701.

Gholivand, M.B., Abolghasemi, M.M., Fattahpour, P. 2011. Polypyrrole/hexagonally ordered silica nanocomposite as a novel fiber coating for solid-phase microextraction. Analytica Chimica Acta. 704: 174–179.

Gholivand, M.B., Abolghasemi, M.M., Fattahpour, P. 2012. Highly porous silica-polyaniline nanocomposite as a novel solid-phase microextraction fiber coating. Journal of Separation Science. 35: 101–106.

Hendi, R., Piryaei, M., Babashpour-Asl, M., Abolghasemi, M.M. 2018. Nanoporous silica-polypyrrole/SBA-15 as fiber coated in the solid-phase microextraction for determination of *Salvia hydrangea* DC. essential oil Pharmaceutical Sciences. 24: 235–239.

Hosseinzadeh, Z., Piryaei, M., Babashpour-Asl, M., Abolghasemi, M.M. 2018. ZnO polythiophene SBA-15 nanoparticles as a solid-phase microextraction fiber for fast determination essential oils of *Matricaria chamomilla*. Nanochemistry Research. 3: 124–130.

Küçükboyacı, N., Demirci, B., Adıgüzel, N., Bani, B., Hüsnü, K., Başer, C. 2015. Volatile compounds from the aerial part and fruits of *Grammosciadium pterocarpum* Boiss. growing in Turkey. Journal of Essential Oil Research. 27: 177–181.

Majithia, D., Metrani, R., Dhowlaghar, N., Crosby, K.M. Patil, B.S. 2021. Assessment and classification of volatile profiles in melon breeding lines using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. Plants. 10(10): 2166.

Mehdinia, A., Mousavi, M.F., Shamsipur, M. 2006. Nano-structured lead dioxide as a novel stationary phase for solid-phase microextraction. Journal of Chromatography A. 1134: 24–31.

Nazemiyeh, H., Delazar, A., Movahedin, N., Jodari, M., Imani, Y., Ghahramani, M., Nahar, L., Sarker, S. 2009. Free radical scavengers from the aerial parts of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn.(Apiaceae) and GC-MS analysis of the essential oils from its fruits. Revista Brasileira de Farmacognosia. 19: 914–918.

Nemati Kharajuo, M., Piryaei, M., Babashpour-Asl, M., Abolghasemi, M.M. 2017. Fast analysis of volatile compounds from Lippia citriodora with nanoporous aluminum wire as solid-phase microextraction fibres. Natural Product Research. 31: 351–354.

Nickavar, B., Kamalinejad, M., Mohandesi, S. 2006. Comparison of the components of the essential oils from leaves and fruits of *Grammosciadium platycarpum*. Chemistry of Natural Compounds. 42: 686–688.

Shikhiev, A.S., Abbasov, R., Malinovskaya, T. 1979. Essential oils from two species of *Grammosciadium* genus from the Umbelliferae family. Khimiya Prirodnykh Soedinenii. 3: 410–411.

Sonboli, A., Eftekhar, F., Yousefzadi, M., Kanani, M.R. 2005a. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. from Iran. Zeitschrift für Naturforschung C. 60: 30–34.

Sonboli, A., Salehi, P., Kanani, M.R., Ebrahimi, S.N. 2005b. Antibacterial and antioxidant activity and essential oil composition of *Grammosciadium scabridum* Boiss. from Iran. Zeitschrift für Naturforschung C. 60: 534–538.

Takhtajan, A.L., Crovello, T.J., Cronquist, A. 1986. Floristic regions of the world. Berkeley: University of California Press.

Wang, W.C., Zheng, Y.F., Wang, S.C., Kuo, C.Y., Chien, H.J., Hong, X.G., Hsu, Y.M. Lai, C.C. 2022. The Identification of soy sauce adulterated with bean species and the origin using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. Food Chemistry:134638.

Yang, R., Xie, W. 2006. Determination of cannabinoids in biological samples using a new solid phase micro-extraction membrane and liquid chromatography–mass spectrometry. Forensic Science International. 162(1-3): 135–139.

Zanella, D., Anderson, H.E., Selby, T., Magnuson, R.H., Liden, T., Schug, K.A., 2021. Comparison of headspace solid-phase microextraction high capacity fiber coatings based on dual mass spectrometric and broadband vacuum ultraviolet absorption detection for untargeted analysis of beer volatiles using gas chromatography. Analytica Chimica Acta. 1141: 91–99.

Zhang, C., Qi, M., Shao, Q., Zhou, S., Fu, R. 2007. Analysis of the volatile compounds in *Ligusticum chuanxiong* Hort. using HS-SPME–GC-MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 44: 464–470.

Zhong, L.S., Hu, J.S., Liang, H.P., Cao, A.M., Song, W.G., Wan, L.J. 2006. Self-Assembled 3D flowerlike iron oxide nanostructures and their application in water treatment. Advanced Materials. 18: 2426–2431.

Relationship between growth and taxan production in endophytic fungi isolated from *Corylus avellana*

Narjes Mohammadi Ballakuti[1], Faezeh Ghanati[1]*

[1] Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Faster growth rate and ease of extraction of secondary metabolites from endophytic fungi cause to consider them in commercial industry. Paclitaxel and its derivatives that are widely used in chemotherapy are a good example from produced secondary metabolites by variety species of fungi. Previous studies showed endophytic fungi had potential to production of different taxanes metabolites in liquid cultures. Regard to the fact that the harvesting time is critical in the pharmaceutical industry for optimizing production, the present study was conducted to evaluate the effect of PDB (a general medium) and LS (as a rich medium) on taxanes production in different growth stages of *Cryptosporiopsis tarraconensis, Melanconium hedericola, Neopestalotiopsis vitis.* These fungi were endophytic fungi isolated from *C. avellana* and able to taxanes. biosynthesis. The results showed the most biomass production in LS medium in earlier periods. The change of mycelia growth was not significant from 9 to 21 days in PDB medium while the most taxan production were achieved after 21 days. The results showed a close association of natural product biosynthesis with primary metabolism, and confirmed again that under high growth conditions, receiving different signalling molecules from the medium triggers various signalling cascades and results in higher and faster production of taxanes.

Keywords: *Corylus avellana*, Endophytic fungi, LS medium, Mycelia growth, Taxanes

1. Introduction

It has been widely accepted that many species of fungi synthesize secondary metabolites (SM). These compounds are not necessary for survival of fungi but could be used in medicine, industry and agriculture (Steele et al., 2005). Paclitaxel and its derivatives which are widely used in chemotherapy are a good example of secondary metabolites produced by variety species of fungi (Mohammadi Ballakuti et al., 2022). Previous studies had been indicated that certain SM e.g., melanin, aflatoxin and sterigmatocystin usually commence in the late of growth, often upon entering the stationary or resting phase, simultaneous with upregulation of the general SM regulatory gene, sporulation and colony formation (Kumar et al., 2018). The inverse relationship between cell growth and Paclitaxel accumulation also has been observed in *Taxus sp.* callus and cell cultures (Wang et al., 2001). It has been shown that endophytic fungi isolated from *Taxus sp.* and *Corylus avellana* had potential to production of different taxanes metabolites in liquid cultures (Mohammadi Ballakuti et al., 2022). But there are not any reports about the correlation between biomass and taxan production in log and stationary phase in them. Moreover, the harvest time is also important in the pharmaceutical industry for optimizing production. In the present study the impact of two different media, PDB (as a general medium for fungi growth) and LS (as a medium rich in micro-macronutrients), on production of taxanes by certain endophytic fungi isolated from *C. avellana* was investigated. These fungi i.e., *Cryptosporiopsis tarraconensis*, *Melanconium hedericola*, and *Neopestalotiopsis vitis* were able to produce taxanes. The effects of aforementioned media on different growth phases of them were discussed. The correlations between medium content, growth phase, and taxanes production was discussed.

2. Material and methods

2.1. Isolation of endophytic fungi and identification

Previously, a taxan-producing endophytic fungi were isolated from different parts of *Corylus avellana* trees collected from six local gardens in Iran with different altitudes. The preliminary identification was done based on the micro morphology of the fungal colony and the characteristics of the hyphae, spores and conidia produced by isolate fungi. For taxonomic classification and to ensure consistency between experiments, every fungal culture was genotyped by PCR and DNA sequencing of the internal transcribed spacer regions (ITS) to confirm both strain identity and purity. The fungal ITS sequence matched to *C. tarraconensis*, *M. hedericola*, *N. vitis* have been deposited at NCBI with Accession numbers MW296853, MW296849 and MW296847 respectively (Mohammadi Ballakuti et al., 2022).

2.2. Culture media and conditions (PDB and LS)

Modified LS media supplemented with 3% sucrose, 3 mg L^{-1} IAA, 3 mg L^{-1} NAA, 100 mg L^{-1} kinetin were used (Rezaei et al., 2013). PDB was prepared by adding 20 g L^{-1} dextrose to hot water extract of the extract of potato (200 g L^{-1}). The purified fungi were grown on PDB and LS, at the darkness, 27± 2 ºC, on reciprocal shakers at 120 rpm and both filtrates and mycelia were harvested after 9 (the late log phase), 13 (the early stationary phase) and 21 (the late stationary phase) days (Figure 1).

2.3. Taxan extraction from fungi

Taxanes i.e., 10-deacetyl baccatin III, baccatin III, 10-deacetyl taxol, cephalomannine, 7-epi-10-deacetyl taxol, paclitaxel, 7-epi taxol were verified and quantified by HPLC-UV and LC-Mass as previously explained (Mohammadi Ballakuti, et al. 2022).

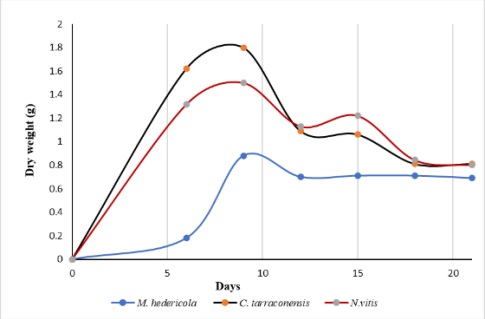


Figure 1. The growth curve of *M. hedericola*, *C. tarraconensis* and *N. vitis* after 9, 13 and 21 days.

2.4. Statistical analysis

All of the experiments were performed with at least three independent repetitions in triplicate. Graph pad software version 5.1 was used for the variance analysis. The Duncan's new multiple-range test was used and the differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

3. Results

The results showed the presence of cephalomannine and 7 epi taxol after 9 days, and the highest content of DAB in C. tarraconensis after 13 days of growth in LS medium. Taxan profile also showed the increase of 10 deacetyl Paclitaxel, cephalomannine and Paclitaxel from day 9 to day 13. The highest content of baccatin III in this fungus was detected after 21 days growth in LS medium.

In PDB medium, 10 deacetyl taxol, Paclitaxel and 7 epi taxol were produced after 9 days. Along with the growth of mycelia, baccatin III and 7 epi 10 deacetyl taxol were detected at day 13 in PDB medium. All aforementioned taxanes were detected in PDB culture after 21 days and the most outstanding increase was recorded for DAB (Table 1).

Table 1. The extra and intra cellular concentration of taxanes were quantified from *C. tarraconensis* after 9, 13 and 21 days from LS and PDB media. 10d BIII (10-deacetyl baccatin III); BIII (baccatin III); 10dT (10-deacetyl taxol); Ceph (cephalomannine); EDT (7-epi 10-deacetyl taxol), pacli (paclitaxel), 7 epi T (7-epi taxol); ND (not detected).

C. tarraconensis	10d BIII (mg/L)	BIII (mg/L)	10dT (mg/L)	Ceph (mg/L)	7,10dT (mg/L)	Pacli (mg/L)	7 epi T (mg/L)
LS medium (Intracellular)							
9 days	ND	0.2	ND	1.7	ND	0.4	0.1
13 days	ND	0.1	0.4	0.8	1.3	0.1	0.5
21 days	ND	10	0	ND	ND	0.2	0.1
LS medium (Extracellular)							
9 days	ND	ND	ND	0.5	ND	0.3	0.9
13 days	152.9	0.3	3.9	1.4	ND	5.4	ND
21 days	10	ND	0	0	0	0.2	0.1
PDB medium (Intracellular)							
9 days	ND	ND	3	ND	ND	1.2	1.5
13 days	ND	2.8	0.9	ND	ND	ND	0
21 days	207	ND	0	2.6	ND	ND	13
PDB medium (Extracellular)							
9 days	ND	0.1	0	ND	ND	0.0	0.7
13 days	ND	0.0	2.1	ND	1.3	ND	0.2
21 days	0	0.5	7.5	ND	0.0	2.4	0.1

Taxan profile of LS-grown *M. hedericola* showed the highest 10- deacetyl Taxol, 7-epi -10 deacetyl Taxol and 7- epi Taxol contents at d 9 and the most DAB synthesis at d 13. Also, baccatin III and 7 epi 10 deacetyl Taxol production were increased, compared to 9 days in LS culture. Although all of 7 taxanes were detected in 21 days of *M. hedericola* culture, their concentrations were decreased compared to 13 days.

In PDB culture of *M. hedericola* fungus, some taxanes increased from d 9 to d 21, so that in d 9, 10 deacetyl Taxol, Paclitaxel and 7-epi taxol were detected in culture and these concentrations were increased in 13 days. After 21 days the concentration of Paclitaxel, 7- epi Taxol, and 10 deacetyl taxol were increased among which the increase of 10 deacetyl taxol was remarkable (Table 2).

Table 2 The extra and intra cellular concentration of taxanes were quantified from *M. hedericola* after 9. 13 and 21 days from LS and PDB media. 10d BIII (10-deacetyl baccatin III); BIII (baccatin III); 10dT (10-

deacetyl taxol); Ceph (cephalomannine); EDT (7-epi 10-deacetyl taxol), pacli (paclitaxel), 7 epi T (7-epi taxol); ND (not detected).

M. hedericola	10d BIII (mg/L)	BIII (mg/L)	10dT (mg/L)	Ceph (mg/L)	7,10dT (mg/L)	Pacli (mg/L)	7 epi T (mg/L)
LS medium (Intracellular)							
9 days	0	ND	ND	0.1	ND	ND	0.1
13 days	9.2	1.7	ND	0.1	1.1	0.2	ND
21 days	ND	0.1	0	1.0	0.1	0.0	0.5
LS medium (Extracellular)							
9 days	0	ND	1.3	ND	0.6	0.2	1.0
13 days	35.4	ND	ND	ND	ND	ND	0.1
21 days	0	0.3	0	0.4	0.0	0.1	0.3
PDB medium (Intracellular)							
9 days	ND	ND	ND	0.6	0	ND	0.4
13 days	ND	ND	0.8	0	ND	0	0.8
21 days	0	0.2	1	0.6	0.4	0.6	0.2
PDB medium (Extracellular)							
9 days	0	0.0	2.0	ND	0.3	0.9	1.0
13 days	ND	0	ND	0.0	0.1	1.4	1.3
21 days	0	0.2	12.8	ND	3.3	3.1	ND

In *N. vitis* grown in LS medium, baccatin and cephalomannine were produced remarkably after 9 days and DAB was detected after 13 days in considerable amount. After 21 days the amount of taxanes like baccatin and 10 deacetyl taxol and Paclitaxel were enhanced, DAB was increased 1.6- fold, compared to d 13.

The observation of taxan profile of *N. vitis* showed that 10 deacetyl taxol, 7-epi 10 deacetyl taxol, Paclitaxel and 7 epi taxol were produced in PDB culture and after 13 days amount of baccatin, cephalomannine and 7 epi Taxol were detected considerably. In comparison with LS medium, all of 7 taxanes were detected in PDB-grown *N. vitis* after 21 days. The content of cephalomannine and Paclitaxel remarkably was higher in d 21, compared to d 13. The amounts of DAB were also observed at d 21 (Table 3).

Table 3 The extra and intra cellular concentration of taxanes were quantified from *N. vitis* after 9. 13 and 21 days from LS and PDB media. 10d BIII (10-deacetyl baccatin III); BIII (baccatin III); 10dT (10-deacetyl

taxol); Ceph (cephalomannine); EDT (7-epi 10-deacetyl taxol), pacli (paclitaxel), 7 epi T (7-epi taxol); ND (not detected).

N. vitis	10d BIII (mg/L)	BIII (mg/L)	10dT (mg/L)	Ceph (mg/L)	7,10dT (mg/L)	Pacli (mg/L)	7 epi T (mg/L)
			LS medium (Intracellular)				
9 days	0	4.2	0.1	0.8	ND	0.0	0.5
13 days	1.9	0.0	ND	0.4	ND	0.0	ND
21 days	3.0	0.5	1.1	ND	0.3	0.7	0.5
			LS medium (Extracellular)				
9 days	0	ND	ND	0.1	ND	ND	0.3
13 days	0	ND	ND	ND	0.2	ND	ND
21 days	0	1.6	0	ND	0.2	0.1	0.3
			PDB medium (Intracellular)				
9 days	ND	0.4	ND	ND	0.6	0.0	0.7
13 days	ND	0	0.1	0	ND	0.0	0.4
21 days	0	0.1	0.2	1	0.3	0.1	0.8
			PDB medium (Extracellular)				
9 days	0	0.0	4.6	ND	0.3	0.9	1.0
13 days	0	5	ND	0.8	0.7	ND	1.0
21 days	53	0.2	0.7	2	0.1	1.2	0.1

In both LS and PDB media, the change of biomass of *C. tarraconensis* was not significant from 9 to 21 days. In Ls medium, the most taxan production was recorded in 13 days, while for PDB culture most of them were detected in 21 days (Figure 2).

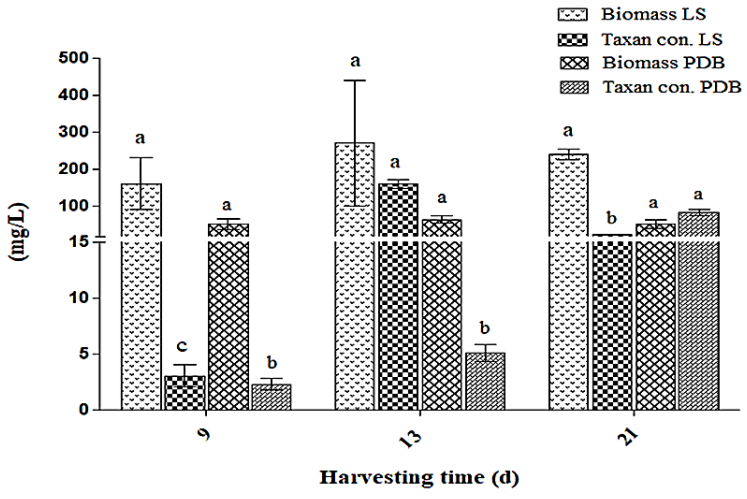


Figure 2. The change of biomass and total taxan concentration of *C. tarraconensis* in PDB and LS media from 9 to 21 days.

The biomass of *M. hedericola* both in LS and PDB media increased in day 9 of cultivation and the maximum growth was on day 13 of cultivation. No significant change, however was observed in biomass of this fungus from 9 to 21 days. The most increase of total taxan concentration was recorded after 13 days in LS culture while the most increasing of total taxan concentration was detected in 21 days (Figure 3).

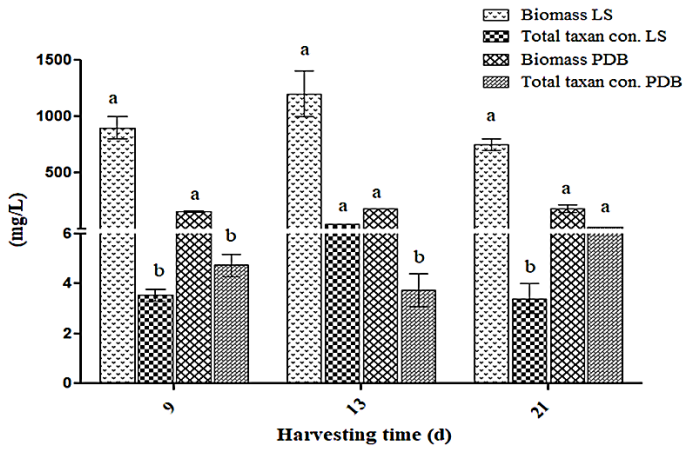


Figure 3. The change of biomass and total taxan concentration of *M. hedericola* in PDB and LS media from 9 to 21 days.

The monitoring of *N. vitis* biomass in different media showed that the most growth of mycelia after 21 days grwoth in LS and 13 days for PDB. Also, in the late stationary phase the hightest amount of taxanes were produced by *N. vitis* in both LS and PDB media (Figure 4).

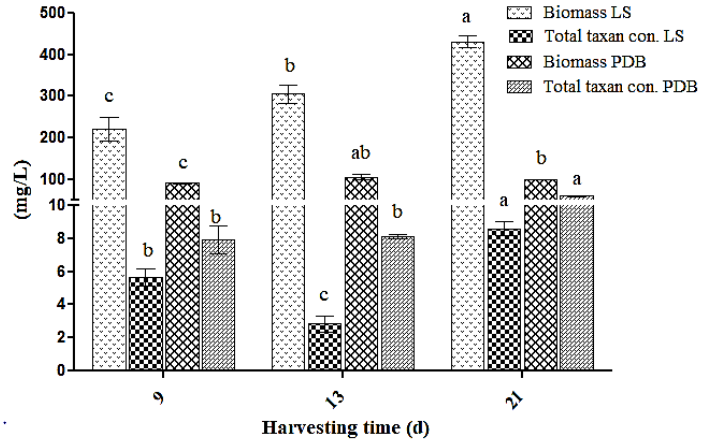


Figure 4. The change of biomass and total taxan concentration of *N. vitis* in PDB and LS media from 9 to 21 days.

4. Discussion

The most taxan production by all three fungi species investigated in this research in PDB medium was detected in late stationary phase, where the mycelial growth was not significant. In many organisms, secondary metabolism is associated with a developmental or morphological change in the producing organism (Flärdh and Buttner, 2009). It has been discussed that the production of secondary metabolites occurs during the stationary phase of growth and is concomitant with a switch in energy and carbon flux away from biomass production toward the production of small, bioactive molecules (Ruiz et al., 2010). Previous research conducted on *Aspergillus nidulans* have confirmed that natural products are often produced late in fungal development coinciding sporulation (Hicks et al., 1997). Interestingly, a nonsporulating mutant of *Aspergillus* was neither able to synthesize aflatoxins, confirming a correlation in the regulation of sporulation and aflatoxin biosynthesis (Caceres et al., 2020). Recent studies reveal that some of the G-protein signalling regulatory elements which are very conserved among other filamentous fungi have opposite roles in regulating the biosynthesis of natural products (Cairns et al., 2019).

The biomass production by fungi in Ls medium was significantly higher than PDB. The prominent production of taxanes also occurred earlier, compared to PDB. LS media reflects that supplement may have some role by sharing their carbon ring or both carbon and nitrogen skeleton in to the secondary metabolism processes of microorganisms (Anuhya et al., 2017). At the beginning of log phase carbon and nitrogen sources are used for mycelia growth and after that may trigger a cascade of downstream events resulting in a shift of carbon flux instead of biomass production toward the production of secondary metabolites. So, more growth of mycelia in LS media confirmed that LS is a rich medium composed of various macro and micro elements and different growth hormones that prepare a suitable condition for mycelia growth (Jain and Pundir, 2011). The results presented here showed a close association of natural product biosynthesis with primary metabolism, and confirmed again the necessity of a balance between them, so that under high growth conditions, higher production of taxanes is plausible. However, when multiple

signals for development and taxan production are received external to the cell by different receptors that sense pH, sugar, and nitrogen content of the environment, a system is required to integrate these signals and communicate a coherent message to the nucleus, leading to a coordinated response (Dhaver et al., 2022). The difference between the yield of taxanes in different stages of the growth in LS medium can be interpreted to their difference in response to nutritional, hormonal and other signals received from the medium.

References

Anuhya, G., Jyostna, V., Aswani, K., Bodaiah, B., Sudhakar, P. 2017. Influence of physico-chemical parameters on secondary metabolite production by marine fungi. International Journal of Current Pharmaceutical Research. 9: 112-118.

Caceres, I., Al Khoury, A., El Khoury, R., Lorber, S., P. Oswald, I., El Khoury, A., Atoui, A., Puel, O., Bailly, J.-D. 2020. Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: A review. Toxins. 12: 150.

Cairns, T.C., Zheng, X., Zheng, P., Sun, J., Meyer, V. 2019. Moulding the mould: understanding and reprogramming filamentous fungal growth and morphogenesis for next generation cell factories. Biotechnology for biofuels. 12: 1-18.

Dhaver, P., Pletschke, B., Sithole, B., Govinden, R. 2022. Optimization, purification, and characterization of xylanase production by a newly isolated *Trichoderma harzianum* strain by a two-step statistical experimental design strategy. Scientific Reports. 12: 1-18.

Flärdh, K., Buttner, M.J. 2009. Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. Nature Reviews Microbiology. 7: 36-49.

Hicks, J.K., Yu, J.-H., Keller, N.P., Adams, T.H. 1997. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA Gα protein-dependent signaling pathway. The EMBO Journal. 16: 4916-4923.

Jain, P., Pundir, R. 2011. Effect of fermentation medium, pH and temperature variations on antibacterial soil fungal metabolite production. Journal of Agricultural Science and Technology. 7: 247-269.

Kumar, A., Asthana, M., Gupta, A., Nigam, D., Mahajan, S. 2018. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Penicillium*, New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Elsevier. 47-68.

Mohammadi Ballakuti, N., Ghanati, F., Zare-Maivan, H., Alipour, M., Moghaddam, M., Abdolmaleki, P. 2022. Taxoid profile in endophytic fungi isolated from *Corylus avellana*, introduces potential source for the production of Taxol in semi-synthetic approaches. Scientific Reports. 12: 1-11.

Ruiz, P., Seseña, S., Izquierdo, P.M., Palop, M.L. 2010. Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of *Tempranillo wines* as determined by a culture-independent method (PCR-DGGE). Applied microbiology and biotechnology. 86: 1555-1562.

Steele, C.L., Chen, Y., Dougherty, B.A., Li, W., Hofstead, S., Lam, K.S., Xing, Z., Chiang, S.-J. 2005. Purification, cloning, and functional expression of phenylalanine aminomutase: the first committed step in Taxol side-chain biosynthesis. Archives of biochemistry and biophysics. 438: 1-10.

Wang, C., Wu, J., Mei, X., 2001. Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. Applied microbiology and biotechnology. 55: 404-410.

The effect of *Cakile maritima* Scop. on kinetic parameters of cabbage's guaiacol peroxidase

Maryam Mohadjerani*, Behnam Golestani Pooya

Department of molecular and cell biology, Faculty of basic sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Abstract

Peroxidase (PODS; EC 1.11.1.X) in different living organisms, including animals, plants, and microorganisms have wide applications in various fields of medical biochemistry, biotechnology, food industry and their attractiveness has been increased on the study of detoxifying and removal of organic contaminants from wastewaters. The *in vitro* effect of methanol extract of *Cakile maritima* on the peroxidase was investigated and the kinetic parameters were measured. The peroxidase (POD) activity from fresh cabbage extract was evaluated using the spectrophotometric method. The enzyme activity in the crude extract and final dialysate was monitored at 470 nm with H_2O_2 as substrate and guaiacol as an electron donor in phosphate-citrate buffer pH 5 and at 55°C. For the H_2O_2 substrate, the Km and Vmax values were found as 0.37 mM and 6.05 mM/min. The extract of *Cakile maritima* has shown the inhibitory effect as noncompetitive on the peroxidase. Therefore, these results could be useful for the prevention and treatment of certain disease, which peroxidase enzyme plays a vital role.

Keywords: Cabbage, Peroxidase, Guaiacol, Medicinal plants, *Cakile maritima*

* e-mail: m.mohajerani@umz.ac.ir

1. Introduction

White cabbage belongs to the cabbage family (Brassica oleracea var. capitata) and is an excellent source of vitamins C, E and K and as well as antioxidative enzymes, e.g. superoxide dismutase, catalase and peroxidase (POD). White cabbage is a rich source of bioactive compounds, particularly flavonoids, sulforaphanes, glucosinolates and anthocyanins, which are subjected to oxidation, a process which involves POD and polyphenol oxidase enzymes (Pellicer et al., 2016).This plant contains antimicrobial and antioxidant properties, which stimulate the activity of enzymes involved in the detoxification of carcinogenic substances, an effective factor in reducing oxidative stress, such as protective effects against colon cancer in the body (Phung et al., 2020).

Peroxidase (EC:1.11.1.X) in different types of living organisms: animals, plants, and microorganisms can be seen (Marzouki et al., 2005). This enzyme belongs to the oxidoreductase enzyme family which catalyzes the oxidation reaction of some substrates, including phenolic compounds such as guaiacol, pyrogallol, chlorogenic acid, and catechol in the presence of hydrogen peroxide H2O2 or organic hydroperoxides as electron acceptor (Twala et al., 2020). The involvement of POD in browning is limited by the availability of electron acceptor compounds such as phenolic acids and flavonoids (Altay et al., 2018). Enzymatic browning is a significant problem in a number of fruits and vegetables such as strawberry (Chisari et al., 2007), grape (Muñoz et al., 2003), potato (Moon et al., 2020), and lettuce (Gawlik-Dziki et al., 2007).

The browning color in fruits and vegetables may be related to conversion of phenolic compounds to o-quinones which subsequently polymerize to be a brown or dark pigment. There are enzymes that have a reactive group formed by either heme or porphyrin groups involved in catalysis and are able to oxidize several organic compounds through the transference of electrons to hydrogen peroxide (Pinto et al., 2015). Because polyphenol oxidase and POD are the main enzymes involved the phenolic oxidation of many fruits and vegetables (Nogales-Delgado et al., 2021). Therefore their activities have attracted much attention. Moreover, heme-containing peroxidases nonspecifically catalyze protein oxidation, lipid peroxidation and cell lysis, which occur when neural cells are degenerated in the presence of hydrogen peroxide and cause cell lies (Mohajerani et al., 2016).

Plants can express several peroxidases involved in different physiological process such as defense mechanisms acting against pathogens, hormone regulation, lignin biosynthesis, oxidation of lignin precursor phenols and responses to abiotic stresses including UV radiation and drought (Pinto et al., 2015).

The *Cakile maritima,* grown in Mazandaran province and its derived compounds have therapeutic applications and were studied by many researchers. The objective of this study was the isolation of guaiacol peroxidase from white cabbage leaves and characterization for its kinetic properties and catalytic conditions in the presence of methanol extract of *Cakile maritima.*

2. Material and methods

2.1.Preparation of the peroxidase

Fresh white cabbage leaves were purchased from the market, cleaned and washed with tap water and then by distilled water. They were grated and then mixed with phosphate buffer pH 7 (100 mL/kg) and the mixture was stirred. The resulting mixture was passed through a two-layered fabric to remove pieces of plant tissue and centrifugation was performed for 20 minutes at 15000 xg. Solution phase was borough to 40% saturation by ammonium sulfate and the solution was stored at 4 °C for 12 hours. The mixture was centrifuged for a second time for 20 minutes at

15000xg. The supernatant was collected and ammonium sulfate was added to 75% saturation. The mixture was kept in the refrigerator for 12 hours and then centrifuged for the third time as described above and the resulting precipitate was collected.

The obtained suspension including peroxidase was poured in dialysis bags and dialysis was performed at 4 °C with subsequent exhausting dialysis (five times against 10 mM phosphate buffer pH 7.0 and finally against water). The obtained suspension contained peroxidase which was distributed in micro tubes and stored at -20 °C.

2.2. Peroxidase assay and protein determination

The amount of protein was measured by Lowry protein assay (Joel et al., 2020). After measuring the enzyme activity, specific peroxidase activity in each stage of extraction was determined by equation: Specific activity of the enzyme (U/mg) = enzyme reaction rate (ΔA/min) / the amount of protein (mg/ml). Guaiacol was used as the hydrogen donor to determine the activity and optimal reaction conditions.

2.3. Preparation of the extract

The aerial parts of *Cakile maritima* was collected from Mazandaran province and identified by a botanist of Mazandaran University (Fig.1). The sample was dried in shadow by laboratory temperature and then pulverized by an electric mill. Methanol was added to the resulting powder in a ratio of 1:10. The resulting mixture was stirred on a shaker for 72 hours, during which time the solvent was changed three times. The collected methanol extract was filtered through Whatman filter paper and concentrated and dried in a vacuum evaporator apparatus and then weighed.



Figure 1: *Cakile maritima* Scop.

2.4. Effect of pH and temperature on peroxidase activity

Buffers at pH 3 to 11 were used to determine the optimal pH of the peroxidase enzyme. For this purpose, 0.5 M citrate buffer for buffer range of 3-7, 0.5 M Tris buffer for buffer range of 8-9 and 0.5M carbonate buffer for pH 10 and phosphate buffer for pH 11 were used (Mohadjerani et al.,

2016). In each test tube, 100µL of guaiacol (1% v/v), 200 µL hydrogen peroxide (0.1% v/v) and 100 µL crude enzyme were brought to volume of 3 mL using the buffer. Then, the absorbance in each test tube were recorded every 30 seconds at 20°C at 470 nm. The relative activity of the enzyme at different pH was calculated by equation (A = (ΔAbs)/t (min) (A and ΔAbs stand for enzyme activity and its variation) and by plotting the enzyme activity, relative to various pH levels, the optimum pH was obtained. To determine the optimum temperature, relative enzyme activity under standard conditions at 4 up to 65°C in phosphate-citrate buffer with pH 5 was measured and the enzyme activity graph was plotted in different temperatures.

2.5. Effect of the extract on the peroxidase activity

To study the effect of *Cakile maritima* extract on the crude extract including the guaiacol peroxidase, enzyme activity was measured for different concentrations of hydrogen peroxide and the methanol extract. For this purpose, concentrations from 0.1-2.1 mM of the substrate (0.1% hydrogen peroxide) and concentration of methanol extract from 0.1-1 mg/ml in 2mL of phosphate-citrate buffer with pH 5, were used. Reaction solution contained 100µL 1% guaiacol, 200 µL 0.1% hydrogen peroxide, 100µL diluted extract, 100µL extracted enzyme suspension and 2.5 mL of phosphate-citrate buffer with pH 5. Absorbance changes over time were recorded in minutes. Also, 100µL of distilled water was used instead of extract as control. All measurements were performed at wavelength of 470 nm.

2.6. Kinetic parameters of peroxidase

To obtain the enzyme kinetic parameters as Km and Vmax, Lineweaver–Burk plot for methanol extract was drawn and the exact amount of Km and Vmax and the type of inhibition on the peroxidase enzyme by *Cakile martima* extract was concluded (Joel, 2020).

3. Results

3.1. Activity amount of the guaiacol peroxidase

The Lowry assay was used to determine the protein concentration in various stages of extraction (Mohadjerani et al., 2016). The concentration of extracted enzyme at the final stage was found as 4.5 mg/mL by drawing the standard graph for bovine serum albumin and equation of y = 1.059x +0.1582; (R^2 =0.9773). Peroxidase activity and specific activity of crude extract after centrifugation, precipitation with ammonium sulfate and dialysis, were found as 17.6 U/mL and 3.9 U/mg respectively.

3.2. Kinetic parameters of white cabbage leaves peroxidase

As in Figure 2 was shown, apparent Km and Vmax for peroxidase extracted from white cabbage leave. For H_2O_2 substrate, the Km and Vmax values were found as 0.37 mM and 6.05 mM/min.

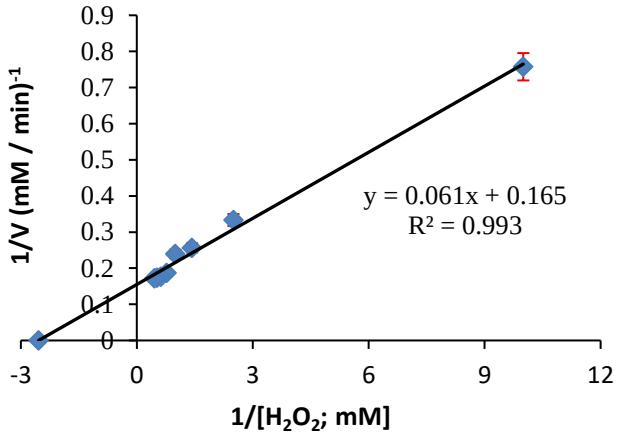


Figure 2. Lineweaver-Burk plot for the peroxidase extracted from white cabbage leave (*Brassica oleracea* var. capitata). (All experiment were made three times and the results was expressed as Mean ± SD).

3.3. Effect of the methanol extract on activity of the peroxidase

The yield of the extraction was found 11.25% (w/w). The methanol extract of *Cakile maritima* decrease the activity of the enzyme in different concentration. The kinetic behavior of the peroxidase in the presence of the methanol extract was demonstrated in Figure 3.

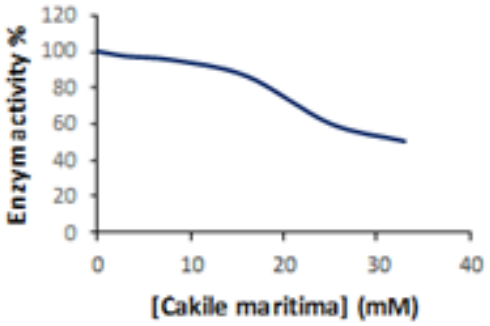


Figure 3. The peroxidase activity in the presence of methanol extract of *Cakile maritima*.

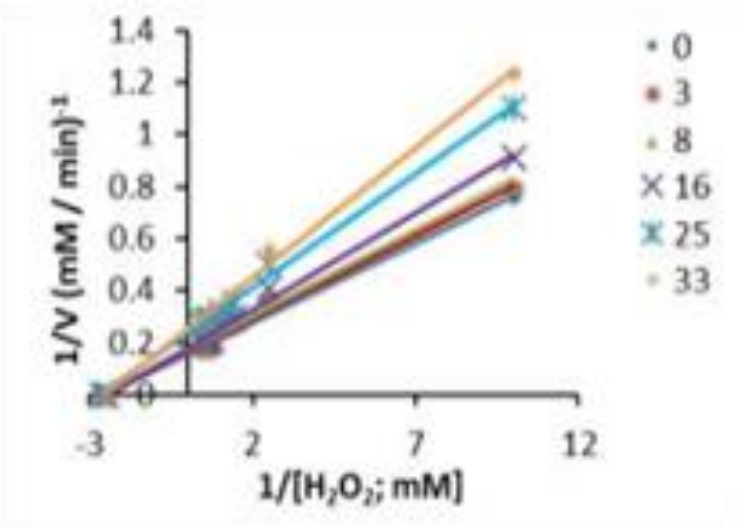


Figure 4. The lineweaver-Burk plot for the peroxidase activity in the presence of *Cakile maritima* methanol extract.

According to Fig 4, the value of IC_{50} for the *Cakile maritima* extract was 33 µg/mL and the amount of K_i was 1.98 mM. The extract of *Cakile Maritima* plant at a concentration of 33 µg/mL, with 39.58% inhibition, was shown a non-competitive inhibitory effect on the cabbage leaf peroxidase.

4. Discussion

Several studies have been conducted to purify plant peroxidases. In all studies, important physicochemical properties (molecular weight, optimum pH, Km, Vmax, etc.) of purified peroxidases were determined, and it has been observed that these properties varied according to source type or assay conditions (Alijanipoor et al., 2019). In previously reported studies on the peroxidase enzyme, the molecular weights of purified peroxidase were found to be in the range of 35 to 95 kDa (Somtürk et al., 2014). The optimum pH values of peroxidases purified from various sources were mostly in the range between 4.5 and 7.5 (Somtürk et al., 2014). Although, the resistance of an enzyme to heat depends on the pH, substrate nature, assay conditions, and source of the enzyme, peroxidase was reported as being one of the most heat-resistant enzymes in plants Jorge (Saraiva et al., 2010; Silva et al., 2019). The optimum temperature of peroxidase has been reported to be in the range of 30 to 60 °C in the literature (Alijanipoor et al., 2019). Km is another important characteristic value for an enzyme because it shows the affinity of the enzyme with the substrate and the robustness of the enzyme-substrate complex (Beltrán et al., 2019). The Km values of purified peroxidase distributed in a wide range and these values vary depending on source and substrate type (Agunbiade et al., 2021). Cabbage, a cheap and accessible plant was used as the source of peroxidase enzyme in this study. Considering the white cabbage as a source of peroxidase could be more proper because it is not in competition with food consumption and is a method of recycling agro-waste pollution that constitutes a municipal environmental nuisance (Joel et al., 2020). The results of the present study showed the highest enzyme activity at pH of 5. Also, 45 °C was considered in the our studied papers, as the optimum temperature for the reaction of peroxidase in tea leaves and soybean hulls, while in the present study, the optimum temperature for the activity of this enzyme in white cabbage leave

was found as 55 °C. The effect of essential oils of eucalyptus, tea, lemon and a few other plants on reducing the activity of peroxidase found in vegetables, was investigated. It was reported that these methanol extracts which are natural antioxidants with antibacterial properties, have different effects on the activity and kinetics of peroxidase from different sources (Korus et al., 2011). Our results was shown that in the presence of 3 until 33 µL of *Cakile maritima* methanol extract, the enzyme's Km fixed and Vmax relatively declined, also Ki was equal to 1.98, a kinetic behavior that confirms the inhibition type as non-competitive. Therefore, the use of herbal extracts *Cakile maritima* as medicinal plant plays an important role in laboratory studies to prevent the activity of the peroxidase enzymes. Our suggestion for future studies on the methanol extract should be determining of its active components that could be isolated and identified using high performance liquid chromatography. Then its effect on peroxidases could be study and compare their mechanism and power of inhibiting of peroxidase enzyme by computer modeling.

Acknowledgements

The authors of the article are very grateful to the respected Research Vice-Chancellor of Mazandaran University, who accepted the financial support of this research.

References

Agunbiade, OJ., Famutimi, OG., Kadiri, FA., Kolapo, OA., Adewale, IO. 2021. Studies on peroxidase from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Heliyon.* 7(1):e06032.

Alijanipoor, K., Hajihosseini, R., Sariri, R., Vaziri, A. 2019. Extraction, purification and characterization of peroxidase from *Vitis vinifera* wastes. Caspian Journal of Environmental Sciences. 17(1): 1–9.

Altay, A., Koktepe, T., Durmaz, L., Topal, F., Gülçin, İ., Köksal, E. 2018. Purification and selected biochemical properties of peroxidase from cress (*Lepidium sativum* sub sp. sativum). International Journal Food Properties. 21(1): 2610–2621**.**

Beltrán, JL., Franco, R. 2019. The meaning of the Michaelis-Menten constant : Km describes a Running title Solving a Michaelis-Menten paradox Keywords Cell metabolism; Enzyme kinetics; Michaelis Menten; pre-steady-state kinetics; Systems Biology. *BioRxiv*. 55: 1–16.

Gawlik-Dziki, U., Złotek, U., Świeca, M. 2007. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L.). Food Chemistry.107 (1): 129–135.

Joel, EB., Mafulul, SG., Adamu, HE., Goje, LJ., Tijjani, H., Igunnu, A., Malomo, SO. 2020. Peroxidase from waste cabbage (*Brassica oleracea* capitata L.) exhibits the potential to biodegrade phenol and synthetic dyes from wastewater. Scientific African.10:e00608.

Korus, A. 2011. Level of vitamin C, polyphenols, and antioxidant and enzymatic activity in three varieties of kale (*Brassica oleracea* l. var. Acephala) at different stages of Maturity. International Journal Food Properties.14 (5):1069–1080.

Marzouki, S., Limam, F., Smaali, M. 2005. A new thermostable peroxidase from garlic Allium sativum. *Applied. Biochemistry*. 127: 201–214.

Mohadjerani, M., Aghaei, A. 2016 The Effect of *Citrus Aurantium, Foeniculum Vulgare* and *Rosmarinus Officinalis* Essential Oils on Peroxidase Activity. *Medical Laboratory Journal*. 10(1): 17–23.

Moon, KM., Bin Kwon, E., Lee, B., Kim, CY. 2020. Recent Trends in Controlling the Enzymatic Browning of Fruit and Vegetable Products. Molecules. 25(12): 42.

Nogales-Delgado, S. 2021. Poly phenol oxidase (Ppo): Effect, current determination and inhibition treatments in fresh-cut produce. Applied Science. 11(17): 23.

Pellicer, JA., Lucas-Abellán, C., Serrano-Martínez, A., López-Miranda, S., Núñez-Delicado, E., Fortea, MI. 2016. Kinetic characterization and thermal properties of two acidic peroxidases from white cabbage (*Brassica Oleracea* L.). Journal of Food Biochemistry. vol. 40.4; pp. 480-489.

Phung, DM., Lee, J., Hong, S., Kim, YE., Yoon, J., Kim,YJ. 2020. Meta-Analysis of Differentially Expressed Genes in the Substantia Nigra in Parkinson's Disease Supports Phenotype-Specific Transcriptome Changes. Frontiers in neuroscience. vol. 14; pp. 596105.

Pinto, M. D. S. T., Ribeiro, J. M., de Araújo, F. P., de Melo, N. F., & Fernandes, K. V. S. 2015. Purification and characterization of a peroxidase present in xilopodium exsudates of umbu plants (*Spondias tuberosa* A.). African Journal of Biotechnology, 14(21): 1838-1845.

Saraiva, JA., Cláudia, CS., Nunes, S., Coimbra, MA. 2010. Purification and Characterization of Olive *(Olea europaea L.)* Peroxidases. Elsevier Inc; 101: 9.

Silva Oliveira, W., Neves, DA., Ballus, CA. 2019. Mature chemical analysis methods for food chemical properties evaluation. Elsevier Inc. 18:28.

Somtürk, B., Kalın, R., Özdemir, N. 2014. Purification of peroxidase from red cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata f. rubra) by affinity chromatography. Applied Biochemistry and Biotechnology. 173(7):1815–1828.

Twala, PP, Mitema A, Baburam C, Feto NA. 2020. Breakthroughs in the discovery and use of different peroxidase isoforms of microbial origin. AIMS Microbiolgy. 6(3): 330–349.

The effect of hydro-ethanolic extract of sage plant (*Salvia officinalis* L.) on the expression of place preference induced by morphine in mice

Amir Abbas Barzegari* Morteza Mortazavian

Address 1: Department of biology, Faculty of Basic sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran

Abstract

Morphine is an important drug in hospitals. However, euphoric effects of morphine can lead to abuse of it and addiction to the important alkaloid. The aim of this study was to investigate the effect of hydro-alcoholic extract of sage (Saliva officinalis) on the euphoric effects of morphine. Twelve groups of female mice (n=8) were used for the experiments. A conditioned place preference (CPP) method was used to investigate the euphoric effects of morphine and sage. Subcutaneous administration of morphine (0, 5, 10 and 15 mg/kg) induced a conditioned place preference in laboratory mice. Intraperitoneal administration of sage extract (0, 50, 100 and 150 mg/kg) had no significant effect on the induction of conditioned place preference. Administration of sage extract one hour before the start of the test failed to change the expression of the conditioned place preference of the effective dose of morphine; despite this, the high dose of the plant extract (150 mg/kg) decreased the locomotor activity in the animals. As a result, hydro-ethanolic extract of sage has no significant effect on the expression of conditioned place preference caused by morphine.

Keywords: Morphine, Sage, Reward, Conditioned place preference

*Barzegaridoctora@gmail.com

1. Introduction

Sage (Salvia officinalis) is a medicinal plant from the Labiatae/Lamiaceae family that grows as a shrub. Plants of this family are widely distributed in the world. The genus *Salvia* includes nearly 900 species, and the species *S. officinalis* is native to the Middle East and Mediterranean regions. The aerial parts of the S. officinalis are used in cooking and traditional medicine. In the traditional medicine, this plant is used to treat various diseases. Among them, we can mention indigestion, excessive sweating, age-related cognitive impairment, convulsions, wounds, gout, rheumatism, inflammation, dizziness, tremors, paralysis, and diarrhea (Ghorbani and Esmaeilizadeh, 2017). In addition, animal research has shown that the extract of this plant and its main constituents, i.e. rosmarinic acid and caffeic acid, have analgesic effects against neuropathic pain (El Gabbas *et al.*, 2019). Moreover, previous research has shown that the alcoholic extract of sage has sedative properties, and it can reduce morphine withdrawal signs in morphine-dependent mice and rats (Hosseinzadeh and Lary, 2000; Hasanein *et al.*, 2015). Morphine is one of the important alkaloids of poppy plant (Papaver somniferum) (Zahid *et al.*, 2015). This alkaloid has long been used as a gold standard in the treatment of moderate to severe pain (Ruiz-Garcia and Lopez-Briz, 2008). Despite the beneficial effects that morphine has in the treatment of patients, its euphoric or rewarding properties can cause abuse of this drug and this eventually may lead to dependence and addiction (Listos *et al.*, 2019).

One of the important methods used in laboratory animals to measure the euphoric or rewarding effects of various drugs and substances is conditioned place preference, abbreviated as CPP (Tzschentke, 2007). CPP occurs when a subject prefers one location to others because the preferred location has already been paired with rewarding events. As stated, the CPP model is widely used to explore the rewarding effects of natural and pharmacological stimuli, including addictive drugs. There is a general hypothesis that conditioned place preference is a form of classical or Pavlovian conditioning. In case of drugs of abuse, the rewarding effect of a drug acts as an unconditioned stimulus. Repeated pairing of rewarding effects of a drug with the certain stimuli in an environment eventually change theses neutral stimuli into conditioned stimuli. Then, in the absence of drug effects, the animal prefer drug-paired environment to vehicle-paired environment. In CPP, it usually uses a two- or three-chamber device, where each chamber shows distinct background characteristics (for example, the colors/patterns of the walls and floor texture are different in different parts of the CPP device). Morphine has been shown to induce CPP in various laboratory animals in various CPP models(Bardo and Bevins, 2000; Tzschentke, 2007).

Many studies have investigated the role of different medicinal plants in altering morphine-induced conditioned place preference (Sahraei *et al.*, 2002; Mobasher *et al.*, 2006; Sahraei *et al.*, 2006; Imenshahidi *et al.*, 2014). As mentioned before, previous studies have shown the effects of sage plant extract on tolerance to analgesic effects of morphine as well as dependence on morphine in laboratory animals. For this reason, the aim of the present study was to investigate the possible effects of hydro-alcoholic extract of sage plant on conditioned place preference caused by morphine.

2. Material and methods

a. Preparation of hydro-ethanolic extract of sage

The sage plant was obtained from the research farm of Dr. Javanmard in the Faculty of Agriculture at the University of Maragheh. After harvesting, the leafy branches of the plant were dried in the shade at room temperature and then were ground into powder by an electric mill. Hydro-

ethanol solution (70%) was used to extract the active ingredients of the plant. Therefore, 100 grams of the powder of the plant were mixed with one liter of 70% alcohol. The resulting mixture was placed in a shaker-incubator device for 72 hours. Then the mixture was passed through Whatman filter paper. A rotary device was used to separate the alcoholic part from the filtered solution. After this step, an aqueous part containing the active ingredients of the plant remained, which was poured into plates and placed under the hood to evaporate the water. At the end, a black substance was left that contained the active ingredients of the sage plant. This material was used to prepare different doses of hydroalcoholic extract of the plant. The dry extract of sage was dissolved in normal saline and was administered intraperitoneally to the animals.

b. Animals

In this research, 12 groups of NMRI female mice were used, which were randomly placed in groups of eight. Mice were obtained from Pasteur Institute of Iran and were transferred to the animal house at the University of Maragheh. In order to adapt the animals to the new environment, the animals were kept in standard conditions for a week before starting the experiments. The temperature of the animal colony was kept at 22±2°C and the light-dark cycle was maintained on 12h light/12 h dark. Animals had free access to tap water and laboratory animal pellets except during the tests. Ethical considerations were taken into account in all experiments performed on laboratory animals.

c. Materials

Morphine sulfate (in the form of 10 mg/ml ampoules) prepared from Darou Pakhsh Pharmaceutical Manufacturing Company (Tehran-Iran) and injectable normal saline (Iran Pharmaceutical and Injectable Products Company) were used in the present study. To make different doses of morphine, the desired amount of morphine was dissolved in normal saline. Morphine was administered subcutaneously to the animals.

d. CPP apparatus

The CPP apparatus was made entirely of wood and consisted of three compartments, previously described by Carr and White in 1983(Carr and White, 1983). In short, this device consisted of two main parts (30 x 45 x 45), which were connected to each other from one side by a smaller neutral part (30 x 15 x 23). The walls of one of the main parts of the device were black and the walls of the other main part were black and white striped. The neutral part was gray. The two main parts of the device had access to each other only through the neutral interface part. A wooden divider completely cut off the access of the two main sections to the interface section. Preliminary studies showed that in this device animals had no un-conditional preference to any of the main parts of the device. For this reason, an unbiased method was used to conduct the CPP test.

e. Induction of CPP

CPP was induced in three steps:

A- Habituation phase: This phase consisted of two consecutive days. At this stage, each animal was placed inside the device separately for 10 minutes to freely search all three parts of the device.

B- Conditioning phase: This phase consisted of three consecutive days. At this stage, we first put the separator that separated the three parts of the device into the device. On the morning of the first day of conditioning, each animal received the desired dose of the drug and was placed in the CPP device for 40 minutes. In the afternoon session (6 hours later), each animal received normal saline (10 ml/kg) and was confined in the other part of the apparatus for 40 minutes. The order of drug and saline injection on the second day of conditioning was the opposite of the first day of conditioning, so that

each animal received saline in the morning and the drug in the afternoon sessions. The third day of conditioning was just like the first day of conditioning.

C: The post-conditioning phase: In this stage, which is also called the test, each animal was placed inside the apparatus separately for 10 minutes and its activity was recorded with a camera. The conditioning score was calculated as the time each animal stayed in the drug-paired section minus the time it stayed in the saline-conjugated section during the testing period (McKendrick and Graziane, 2020).

f. Measurement of locomotor activity

The locomotor activity of each animal on the test day was counted using the open field method. In this way, the floor of the main parts of the apparatus was divided into four equal parts by two intersecting lines. In the ten minute of the test time, every time the animal's head and front legs crossed one of these lines, a score was added to its movement activity (Zarrindast *et al.*, 2002).

g. Experiment design

A: Investigating the effect of morphine in inducing conditioned place preference: For this purpose, four groups of animals were selected. On conditioning days, saline (10 ml/kg) was administered to one group as a control group, and morphine (5, 10, and 15 mg/kg) was administered to the other three groups. Morphine was administered subcutaneously.

B: Examining the effect of sage hydro-ethanolic extract in inducing conditioned place preference: For this purpose, four groups of animals were selected. On conditioning days, saline (10 ml/kg) was administered to one group as a control group, and sage extract (50, 100, and 150 mg/kg) was administered intraperitoneally to the other three groups.

C: Investigating the effect of sage on the expression of conditioned place preference caused by morphine: for this purpose, four groups of rats were conditioned with an effective dose of morphine (10 mg/kg) on conditioning days. On the day of the test, one hour before placing the animals into the apparatus, one group of animals received saline and the other three groups received different doses of sage (50, 100, and 150 mg/kg). Then each animal was placed in the apparatus individually.

h. Statistical analysis

SPSS statistical software was used for statistical analysis of the results. The conditioning score and locomotor activity were expressed as mean ± standard error of the mean. One-way analysis of variance test and if the results were significant, Tukey's post hoc test was used to compare the mean of different groups compared to the control group. A P value of less than 0.05 was considered as a criterion of significance

3. Results

3.1. Effect of morphine in inducing conditioned place preference

Subcutaneous administration of different doses of morphine (0, 5, 10, and 15 mg/kg) on the days of conditioning to mice induced a significant conditioned place preference in mice, $P<0.001$. In addition, Tukey's post hoc test showed that the most effective dose of morphine in inducing CPP was 10 mg/kg (Figure 1). This dose was used as the effective dose in the expression test. The analysis of motor activity on the day of the test showed that none of the doses of morphine used in this experiment had a significant effect on the locomotor activity of the mice, $P>0.05$.

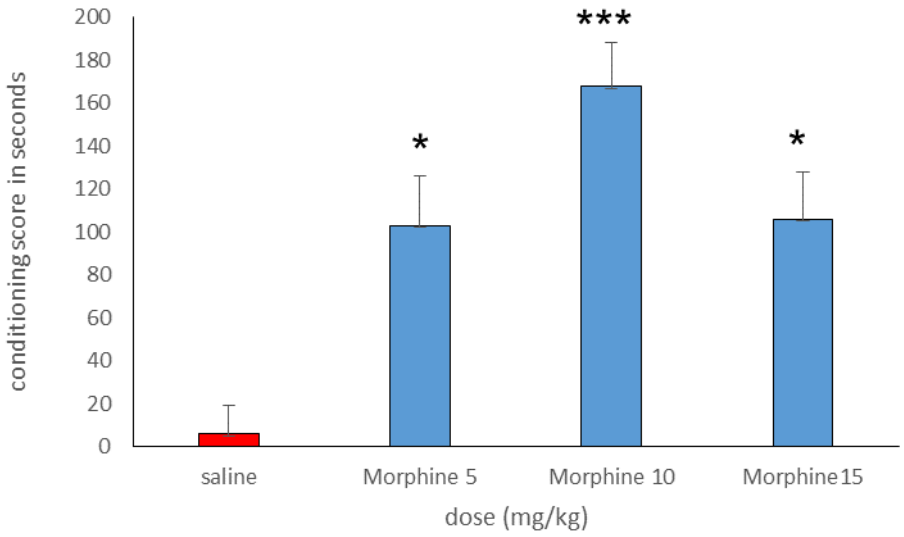


Figure 1. Effects of morphine on induction of conditioned place preference in mice. Data are shown as mean±SEM. * and * indicate P<0.05 and P<0.001, respectively.**

3.2. The effect of sage extract on the induction of conditioned place preference

Intraperitoneal administration of different doses of sage (0, 50, 100, and 150 mg/kg) on conditioning days did not have any significant effect on inducing conditioned place preference in animals, P>0.05 (Figure 2). The analysis of locomotor activity in these animals showed that the administration of sage on the days of conditioning had no significant effect on the locomotor activity of the animals on the test day, P>0.05.

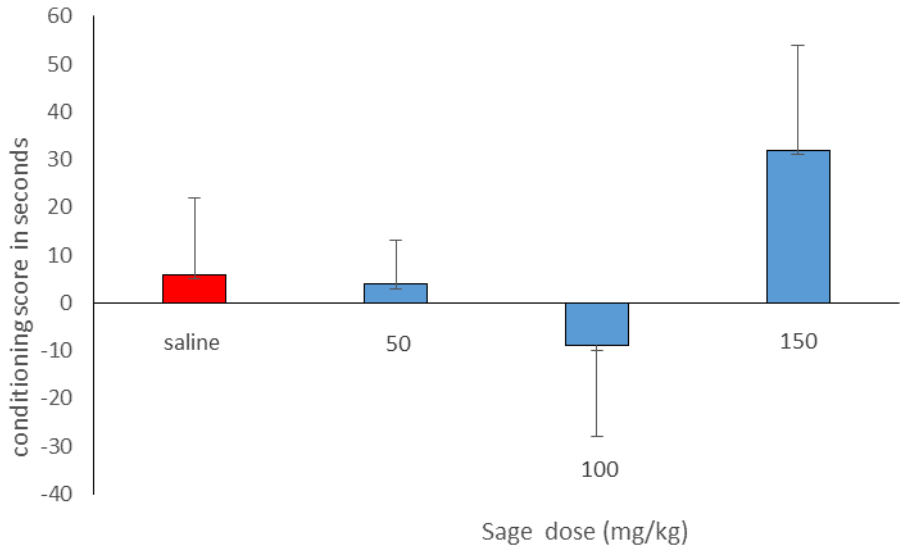


Figure 2. Effects of sage hydro-ethanolic extract on induction of CPP in mice. The results shows that the extract cannot induce CPP in mice.

3.3. The effect of sage extract on the expression of morphine-induced CPP

Four groups of mice were conditioned with the effective dose of morphine. Then, on the test day, different doses of sage extract was one h. before the test. The results showed that administration of the sage hydro-alcoholic extract had no significant effect on the expression of CPP with the effective dose of morphine $P>0.05$ (Figure 3). Despite this, mice that received a high dose of sage on the test day showed a decrease in motor activity compared to the control group, $P<0.01$.

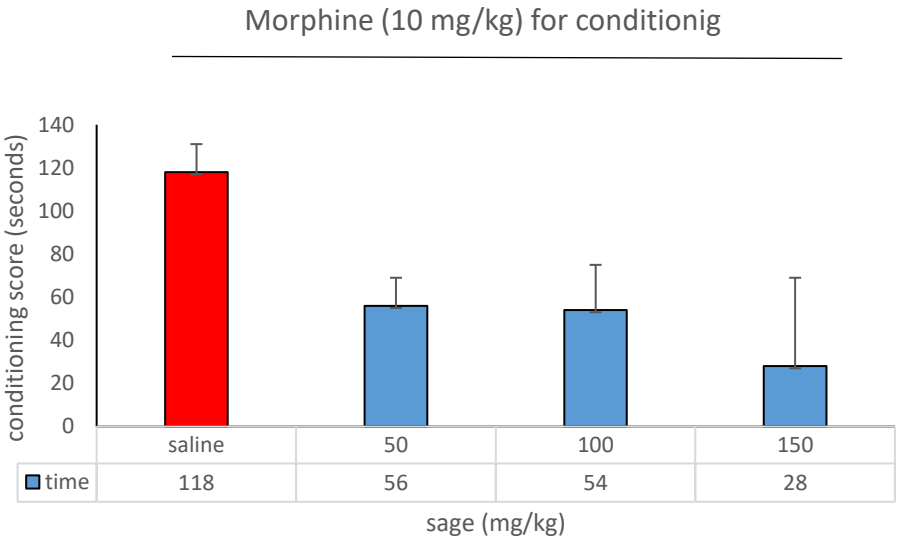


Figure 3. Effects of sage extract on the expression of morphine conditioned place preference in mice. The results shows no significant effect of the extract on the expression of morphine CPP.

4. Discussion

Sage is one of the plants that have many medicinal uses around the world. This plant has been used for the treatment of nervous system disorders such as memory and cognitive impairments. Regarding the inhibitory effects of the plant extract on morphine dependence in experimental animals, the current study was designed to investigate the effects of the hydro-alcoholic extract of sage on the rewarding effects of morphine using a CPP paradigm. In the first part of the present research, it was shown that the animals that received different doses of morphine on the conditioning days developed a strong preference for that part of the apparatus that was paired with morphine. The effect of morphine in inducing CPP has long been shown in previous studies and indicates its rewarding property (Tzschentke, 2007; Imenshahidi *et al.*, 2014). The rewarding or euphoric effects of morphine are exerted by affecting the dopaminergic mesolimbic pathway of the brain. The pathway begins from the dopaminergic neurons in the ventral tegmental area (VTA) in the midbrain that their axons project to different limbic regions of the brain including the nucleus accumbens, amygdala, and hippocampus. When morphine binds to mu-opioid receptors on GABAergic interneurons in the VTA area, the GABAergic interneurons are inhibited. These interneurons tonically inhibit the VTA dopaminergic neurons in the VTA area. Therefore, this leads to the disinhibition of dopaminergic neurons and increases the firing rate of these neurons. This eventually causes an increase in dopamine release in the nucleus accumbens and other related limbic areas. The increase of dopamine in the

nucleus accumbens is equivalent to increase in reward and euphoria. On the other hand, in the present experiment, the administration of the sage extract to mice had no significant effect on the animal's preference for the drug-paired part of the apparatus. With our current knowledge, this is the first time that the effect of the hydro-alcoholic extract of sage on the induction of conditioned place preference has been investigated. Thus, we are not able to compare our results with previous experimental data. As it was mentioned before, one of the methods that are widely used for investigating the rewarding effects of drugs is conditioned place preference, and the ability of a substance to induce CPP is a measure of its euphorogenic or rewarding effects. Thus, our result indicates that at least in the doses of sage that are used in this research, the extract of this plant has no rewarding effects. Finally, the acute administration of sage plant extract on the test day, to the animals that had received the effective dose of morphine (10 mg/kg) on conditioning days, had no significant effect on the expression of morphine-induced CPP. The expression of CPP is a complex phenomenon and different brain regions, especially those that are related to memory, are involved in this phenomenon. When morphine administration in conditioning days are paired with one compartment of a CPP apparatus, new memories are formed by morphine. When the animal (in the absence of drug effects) is placed in the apparatus, the memories are recalled and drug-seeking behaviors are activated; it means that morphine-paired compartment preferred over the saline-paired part by mice, and animal spend more time in morphine-paired part. Therefore, our results indicate that the plant extract could not interrupt morphine-related memories. This hypothesis seems to be correct because previous research has shown that sage not only does not impair memory but also has memory-enhancing properties. However, an insignificant decrease in CPP was observed in the expression experiment. One may ascribe this effect to a significant reduction of locomotor activity caused by sage on the test day. This decrease in activity by sage can be attributed to the sedative effects of this plant and its effect in increasing the activity of the GABAergic system of the brain (Kavvadias *et al.*, 2003). In conclusion, the administration of hydro-ethanolic extract of sage has no significant effect on the expression of morphine-induced CPP in female mice.

Acknowledgements

We are very grateful to Dr. Javanmard for providing the sage plant to conduct this research.

References

Bardo, M., Bevins, R.A., 2000. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? Psychopharmacology. 153: 31-43.

Carr, G.D., White, N.M., 1983. Conditioned place preference from intra-accumbens but not intra-caudate amphetamine injections. Life sciences. 33: 2551-2557.

El Gabbas, Z., Bezza, K., Laadraoui, J., Ait Laaradia, M., Kebbou, A., Oufquir, S., Boukhira, A., Aboufatima, R., Chait, A., 2019. Salvia officinalis, rosmarinic and caffeic acids attenuate neuropathic pain and improve function recovery after sciatic nerve chronic constriction in mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2019.

Ghorbani, A., Esmaeilizadeh, M., 2017. Pharmacological properties of Salvia officinalis and its components. Journal of traditional and complementary medicine. 7: 433-440.

Hasanein, P., Teimuri Far, M., Emamjomeh, A., 2015. Salvia officinalis L. attenuates morphine analgesic tolerance and dependence in rats: possible analgesic and sedative mechanisms. The American Journal of Drug and Alcohol Abuse. 41: 405-413.

Hosseinzadeh, H., Lary, P., 2000. Effect of Salvia leriifolia leaf extract on morphine dependence in mice. Phytotherapy Research. 14: 384-387.
Imenshahidi, M., Qaredashi, R., Hashemzaei, M., Hosseinzadeh, H., 2014. Inhibitory effect of Berberis vulgaris aqueous extract on acquisition and reinstatement effects of morphine in conditioned place preferences (CPP) in mice. Jundishapur journal of natural pharmaceutical products. 9.
Listos, J., Łupina, M., Talarek, S., Mazur, A., Orzelska-Górka, J., Kotlińska, J., 2019. The mechanisms involved in morphine addiction: an overview. International journal of molecular sciences. 20: 4302.
McKendrick, G., Graziane, N.M., 2020. Drug-induced conditioned place preference and its practical use in substance use disorder research. Frontiers in behavioral neuroscience. 14: 582147.
Mobasher, M., Sahraei, H., Sadeghi-Rad, B., Kamalinejad, M., Shams, J., 2006. The effects of crocus sativus extract on the acquisition and expression of morphine-induced conditioned place preference in mice. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences .5: 143-150.
Ruiz-Garcia, V., Lopez-Briz, E., 2008. Morphine remains gold standard in breakthrough cancer pain. Bmj. 337.
Sahraei, H., Fatemi, S.M., Pashaei-Rad, S., Faghih-Monzavi, Z., Salimi, S.H., Kamalinegad, M., 2006. Effects of Papaver rhoeas extract on the acquisition and expression of morphine-induced conditioned place preference in mice. Journal of ethnopharmacology. 103: 420-424.
Sahraei, H., Ghoshooni, H., Salimi, S.H., Astani, A.M., Shafaghi, B., Falahi, M., Kamalnegad, M., 2002. The effects of fruit essential oil of the Pimpinella anisum on acquisition and expression of morphine induced conditioned place preference in mice. Journal of Ethnopharmacology. 80:43-47.
Tzschentke, T.M., 2007. Review on CPP: Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. Addiction biology. 12: 227-462.
Zahid, Z., Khan, S., Nadeem, F., Azeem, M.W., 2015. The review of power of Poppy: Harnessing benefits of nature's most dangerous Plant. International Scientific Organization. 8: 56-64.
Zarrindast, M.-R., Bahreini, T., Adl, M., 2002. Effect of imipramine on the expression and acquisition of morphine-induced conditioned place preference in mice. Pharmacology biochemistry and behavior. 73: 941-949.

اثر رویشگاه بر عملکرد و محتویات اسانس دو جمعیت از گونه دارویی مریم‌گلی تماشایی *Salvia hydrangea* L. در خراسان شمالی

پویا آروین*[1]، رعنا فیروزه[2]

[1] گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
[2] گروه کشاورزی، ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

چکیده

گیاه مریم‌گلی تماشایی *Salvia hydrangea* L. از گونه‌های ارزشمند دارویی است که از آن در فرهنگ سنتی، جهت پیشگیری و درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود. در این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر رویشگاه بر بازده و محتوای اسانس، نمونه‌برداری به صورت تصادفی از سرشاخه‌های گل‌دار گیاه در مرحله گلدهی کامل با سه تکرار از رویشگاه‌های طبیعی آن واقع در ارتفاعات راز و آخرداغ استان خراسان شمالی انجام گرفت. پس از اسانس‌گیری، نوع و درصد ترکیب‌های موجود در اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) و گاز کروماتوگرافی متصل شده به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که اثر رویشگاه بر عملکرد اسانس گیاه مریم‌گلی تماشایی در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد و منطقه آخرداغ با ۰/۵۳ درصد بازده اسانس بیشتری را نسبت به رویشگاه راز به خود اختصاص داد. در بررسی نوع و میزان ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس نیز مجموعاً ۱۱ ترکیب شناسایی شد که سیس آلفابرگاموتن (۴۵/۶۷ درصد)، وربنون (۳۲/۵۱ درصد) و کاریوفیلن اکساید (۴/۶۴ درصد) عمده‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس در *S. hydrangea* های رشدیافته در رویشگاه راز و سیس آلفابرگاموتن (۵۷/۰۵ درصد)، ژرانیل استات (۱۱/۳۷ درصد) و ژرانیال (۵/۷۳ درصد) عمده‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس در گیاهان منطقه آخرداغ بودند. به‌طورکلی، نتایج حاصل از این مطالعه، اثر شرایط اکولوژیکی را بر درصد اسانس و محتوای ترکیبات تشکیل دهنده آن، در گیاه مریم‌گلی تماشایی به اثبات رساند.

واژگان کلیدی: بازده اسانس، رویشگاه راز و آخرداغ، مریم‌گلی تماشایی

* e-mail: pooya.arvin@pnu.ac.ir

۱. مقدمه

گیاه مریم‌گلی تماشایی با نام علمی (*Salvia hydrangea* L.) و نام محلی سفتالیک (گویش بومی منطقه) یکی از گونه‌های دارویی ارزشمند موجود در مراتع ایران و متعلق به خانواده نعنائیان (Lamiaceae) می‌باشد. مریم‌گلی تماشایی گیاهی پایا، چند ساله، معطر به ارتفاع ۲۰ تا ۶۰ سانتی‌متر با برگ‌هایی که دارای تقسیمات شانه‌ای و دمبرگ‌هایی به طول ۵ تا ۱۰ میلی‌متر است. گل آذین آن گرزن و غیرمنشعب، جام گل به رنگ صورتی تا قرمز و میوه آن فندقه، بدون کرک، بیضوی و لعابدار می باشد (Sonboli et al., 2009).

در طب سنتی مریم‌گلی تماشایی به عنوان مسکن، برطرف کننده سردرد عصبی، ادرارآور، ضدتب و التیام دهنده دردهای معده استفاده می‌شده و دم‌کرده گل‌های آن نیز برای درمان سرماخوردگی و مالاریا کاربرد دارد (رنجبر و همکاران، ۱۳۹۴). Sairafianpour و همکاران (۲۰۰۳) با بررسی اثر ضد مالاریایی عصاره گل‌های گونه *S. hydrangea* در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که حضور مقادیر بالای تری‌ترپن‌های پنتاسیکلیک (عمدتاً اولئانیک اسید) در اسانس این گیاه منجر به جلوگیری از رشد عامل بیماری مالاریا می‌شود.

نظر به اهمیت اقتصادی و درمانی گیاهان دارویی و صنعتی و توسعه نگرش گیاه درمانی در جهان، شناسایی ترکیبات بیوشیمیایی، تعیین میزان کمی و کیفی ترکیب‌های موجود در اسانس و بررسی تاثیر عوامل محیطی بر خواص دارویی گیاهان از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد (رنجبر و همکاران، ۱۳۹۴). تغییرات گرادیان دما در اثر تغییر ارتفاع از مهمترین عوامل موثر در محل زندگی نباتات می‌باشد، به طوریکه با افزایش و یا کاهش ارتفاع عواملی چون دما، رطوبت نسبی، سرعت باد، میزان آب در دسترس و حتی تابش دریافتی تغییر می‌یابد و تغییر در ارتفاع محل رویش و استقرار آن می‌تواند بسیاری از واکنش‌های اکوفیزیولوژیکی گیاه را که به‌عنوان موجودی زنده از کوچکترین تغییرات مربوط به اکوسیستم تاثیر می‌پذیرد، دستخوش تغییر نماید (Tajbakhsh et al., 2008). برای مثال بررسی تأثیر ویژگی‌های اکولوژیک بر کمیت و کیفیت اسانس گل و برگ بومادران هزار برگ (*Achillea millefolium*) از رویشگاه سیاه بیشه واقع در استان مازندران نشان داد که بین طبقات ارتفاعی از نظر بازده اسانس برگ اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد مشاهده شد (Azarnivand et al., 2008). بررسی ترکیبات شیمیایی و اثرات ضد باکتریایی اسانس گیاه مریم‌گلی تماشایی در دو رویشگاه مختلف آباده و تکاب در استان فارس نیز نشان داد که تفاوت‌های کمی و کیفی مشاهده شده در اسانس این گیاه در دو منطقه می‌تواند ناشی از تاثیر عوامل مختلف اکولوژیکی، جغرافیایی و اقلیمی روی ترکیبات شیمیایی اسانس جمعیت‌های مختلف این گونه دارویی باشد (Sonboli et al., 2009). ازاین‌رو با توجه به اهمیت و ارزش گیاه دارویی مریم‌گلی تماشایی و پراکنش آن در مناطق مورد مطالعه، انجام تحقیقات در رابطه با تأثیر عوامل محیطی و اکولوژیکی بر محتوای متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات تشکیل دهنده اسانس صورت گرفت، چرا که شناسایی نیازهای اکولوژیکی این گیاه و کشف بهترین شرایط رویشگاهی که در آن کیفیت و کمیت مواد مؤثره ممتاز و قابل‌قبول باشد، ضروری و مهم به نظر می‌رسد.

۲. مواد و روش

۱.۲. منطقه مورد مطالعه

به منظور انجام تحقیق، نمونه‌برداری از رویشگاه‌های طبیعی گیاه مریم‌گلی تماشایی واقع در منطقه راز با ارتفاع ۱۴۱۰ متر از سطح دریا و منطقه آخرداغ با ارتفاع ۱۶۸۰ متر از سطح دریا در خرداد ماه ۱۴۰۰ در مرحله گلدهی کامل (باز شدن ۵۰ تا ۷۰ درصد از

گل‌ها) به روش تصادفی در سه تکرار صورت گرفت. نمونه‌برداری از هر منطقه به این صورت بود که سه ترانسکت به طول ۳۰ متر مستقر شد. در طول هر ترانسکت ۱۰ پلات یک مترمربعی به صورت تصادفی انداخته شد و نمونه‌های ۱۰ پلات با هم مخلوط و به‌عنوان یک نمونه لحاظ شد و در نهایت ۳ نمونه آماده شد. علاوه بر این نمونه خاک پای بوته تا عمق ۰/۵ متر نیز جمع‌آوری شد که به همراه نمونه‌های گیاهی به منظور انجام مطالعات به آزمایشگاه گروه کشاورزی دانشگاه پیام‌نور بجنورد منتقل شدند. شناسایی گیاهان نیز با استفاده از منابع معتبر فلوریستیک، انجام گرفت. نمونه‌های گیاهی پس از خشک شدن به مدت چهار روز در سایه و دمای اتاق (۲۲ تا ۲۵ درجه سانتیگراد)، آماده‌ی اسانس‌گیری شدند. مشخصات خاک، موقعیت جغرافیایی و ارتفاع دو منطقه در جدول ۱ گزارش‌شده است.

جدول ۱. مشخصات خاک، موقعیت جغرافیایی و ارتفاع دو منطقه موردمطالعه

		راز	آخرداغ
خاک	نوع بافت	شنی	شنی رسی
	اسیدیته (pH)	۷/۳	۷/۹
	هدایت الکتریکی (dS/m)	۱/۰۸	۱/۲۲
	مختصات جغرافیایی	۵۷°۰۸′۰۳′′ طول شرقی ۳۷°۵۶′۵۲′′ عرض شمالی	۵۷°۱۲′۴۱′′ طول شرقی ۳۷°۳۴′۴۵′′ عرض شمالی
	ارتفاع از سطح دریا (m)	۱۴۱۰ متر	۱۶۸۰ متر

۲.۲. استخراج اسانس

جهت استخراج اسانس، ۵۰ گرم از نمونه خشک‌شده سرشاخه‌های گل‌دار به روش تقطیر با آب، توسط دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت اسانس‌گیری و در مرحله آخر با سولفات‌سدیم آبگیری شد. اسانس‌ها تا زمان آنالیز، درون شیشه‌های تیره‌ی دربسته و در یخچال نگهداری شدند.

۳.۲. تعیین بازده اسانس استخراج‌شده

درصد بازده اسانس نمونه‌ها برحسب وزن اسانس به وزن خشک ماده گیاهی، به کمک فرمول زیر محاسبه گردید:

درصد بازده اسانس = وزن اسانس/ وزن خشک گیاه × ۱۰۰

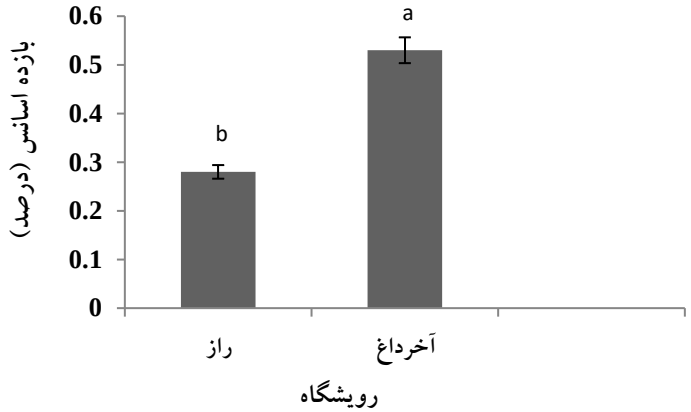
۴.۲. شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس

شناسایی ترکیبات اسانس با دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل شده به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) مدل Shimadzu-QP2010SE مجهز به ستون Rtx-5MS (طول ستون ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فاز ثابت ۰/۲۵ میکرومتر) انجام گرفت.

۳. نتایج

۱.۳. نتایج حاصل از اندازه‌گیری عملکرد اسانس

داده‌های مطالعات حاضر نشان داد که اثر رویشگاه بر عملکرد اسانس سرشاخه‌های گلدار گیاه مریم‌گلی تماشایی در دو منطقه در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد و رویشگاه آخرداغ با ۰/۵۳ درصد بازده اسانس بیشتری را نسبت به رویشگاه راز به خود اختصاص داد (شکل ۱).



شکل ۱. درصد بازده اسانس گیاه *S. hydrangea* در دو رویشگاه موردمطالعه
حروف غیر یکسان بالای ستون‌ها، تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۵٪ (آزمون LSD) نشان می‌دهد

جدول ۲. ترکیبات اسانس *S. hydrangea* در دو منطقه راز، آخرداغ

شماره	ترکیبات	منطقه راز درصد	شاخص بازداری RI^{exp}	منطقه آخرداغ درصد	شاخص بازداری RI^{exp}
۱	Verbenone	۳۲/۵۱	۱۲۱۷	–	–
۲	Geraniol	–	–	۳/۳۹	۱۲۴۵
۳	Geranial	–	–	۵/۷۳	۱۲۷۴
۴	Limonene-10-ol	–	–	۲/۶۱	۱۲۹۷
۵	Thymol	۲/۶۰	۱۲۹۸	۳/۹۶	۱۲۹۸
۶	Carvacrol	–	–	۱/۰۵	۱۳۰۴
۷	Geranyl acetate	–	–	۱۱/۷۳	۱۳۸۵
۸	Cis-*a*-bergamotene	۴۵/۶۷	۱۴۱۹	۵۷/۰۵	۱۴۱۸
۹	*E*-caryophyllene	۳/۶۸	۱۴۲۹	۱/۳۷	۱۴۲۹
۱۰	Germacrene D	۲/۱۶	۱۴۸۹	۵/۵۵	۱۴۸۹
۱۱	Caryophyllene oxide	۴/۶۴	۱۵۷۸	۱/۹۱	۱۵۷۸
	Total	۹۱/۲۶		۹۴/۳۵	

شاخص بازداری برای ستون RTX-5MS با اشاره به n-آلکان‌ها ارائه شده است

۲.۳. نتایج مطالعات اسانس مریم‌گلی تماشایی منطقه راز

نتایج نشان داد که در محتوای اسانس این منطقه ۶ ترکیب وجود داشت که مجموعاً ۹۱/۲۶ درصد از کل اسانس را تشکیل دادند. سیس آلفابرگاموتن با ۴۵/۶۷ درصد، وربنون با ۳۲/۵۱ درصد و کاریوفیلن اکساید با ۴/۶۴ درصد عمده‌ترین ترکیبات تشکیل-دهنده اسانس را شامل شدند. در این رویشگاه جرماکرن D با ۲/۱۶ درصد کمترین مقدار را بین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس به خود اختصاص داد (جدول۲).

۳.۳. نتایج مطالعات اسانس مریم‌گلی تماشایی منطقه آخرداغ

آزمایشات فیتوشیمیایی انجام شده وجود ۱۰ ترکیب را شناسایی کرد که درمجموع ۹۴/۳۵ درصد از کل اسانس را تشکیل می‌دهند. از این میان، ترکیبات سیس آلفابرگاموتن با ۵۷/۰۵ درصد، ژرانیل استات با ۱۱/۷۳ درصد و ژرانیال با ۵/۷۳ درصد به ترتیب عمده‌ترین ترکیبات اسانس شناخته شدند. در منطقه آخرداغ ترکیب کارواکرول با ۱/۰۵ درصد کمترین مقدار را در بین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس کسب کرد (جدول۲).

نتایج حاصل از بررسی‌ها در مورد تنوع ترکیبات اسانس نشان داد که منطقه آخرداغ با ۱۰ ترکیب نسبت به منطقه راز، تنوع بیشتری داشت. درمجموع از ۱۱ ترکیب شناسایی‌شده، ۵ ترکیب مشابه و مشترک در اسانس گیاهان دو رویشگاه دیده شد که تیمول، سیس آلفابرگاموتن، E کاریوفیلن، جرماکرنD و کاریوفیلن اکساید نام داشتند (جدول۲). نکته قابل توجه این است که ترکیب سیس آلفابرگاموتن بالاترین درصد از محتویات اسانس را در هر دو رویشگاه به خود اختصاص داد. برخی ترکیبات نیز به‌صورت انحصاری تنها در یک رویشگاه حضور داشتند، برای مثال ژرانیول، ژرانیال، لیمونن-۱۰-ال، کارواکرول و ژرانیل استات ترکیباتی بودند که تنها در اسانس گیاهان منطقه آخرداغ دیده شدند و ترکیب وربنون ترکیبی بود که تنها در اسانس گیاهان رویشگاه راز مشاهده شد (جدول۲).

٤. بحث و نتیجه‌گیری

رشد و عملکرد گیاهان در اکوسیستم‌ها و رویشگاه‌های طبیعی، تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار دارد که هریک از آن‌ها می‌تواند تاثیر به‌سزایی بر کمیت و کیفیت محصول گیاهان دارویی داشته باشد (رنجبر و همکاران، ۱۳۹۴). از طرفی باید توجه داشت که یک گیاه دارویی از نظر اقتصادی زمانی مقرون به صرفه است که میزان متابولیت ثانویه آن به حد مطلوب رسیده باشد. ارتفاع از سطح دریا در دسته پراهمیت‌ترین عوامل محیطی تأثیرگذار در این زمینه است (قربانزاده و همکاران، ۱۳۹۸ و آریانفر و همکاران، ۱۳۹۷)، با افزایش و کاهش ارتفاع، عواملی چون دما، رطوبت نسبی، سرعت باد، میزان آب در دسترس و میزان تابش دریافتی تغییر می کند، بنابراین تغییر ارتفاع محل استقرار گیاه می‌تواند بر بسیاری از واکنش‌های اکوفیزیولوژی اثر بگذارد (قنبری و همکاران، ۱۳۹۹). در تحقیقات حبیبی و همکاران (۱۳۸۵) که به‌منظور بررسی اثر ارتفاع بر روغن اسانس و ترکیبات تشکیل دهنده آن در گیاه دارویی آویشن وحشی (*Thymus kotschaynus*) در منطقه طالقان صورت گرفت، دیده شد که بین درصد اسانس و اختلاف ارتفاع از سطح دریا یک رابطه خطی معنی‌داری وجود داشت. در پژوهش صورت گرفته روی گیاه لعل کوهستان (*Oliveria decumbens*) نیز مشخص گردید عملکرد اسانس این گیاه در اغلب مناطق رویشگاه‌های طبیعی آن در

استان خوزستان، با افزایش ارتفاع از سطح دریا، افزایش یافت (Ale Omrani Nejad and Rezvani Aghdam, 2019) که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد.

سیس آلفابرگاموتن، وربنون و کاریوفیلن اکساید عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس در *S. hydrangea* های رشدیافته در رویشگاه راز و سیس آلفابرگاموتن، ژرانیل استات و ژرانیال عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس در گیاهان منطقه آخرداغ بودند. بررسی کمیت و کیفیت اسانس *S. hydrangea* در دو رویشگاه از استان مازندران نشان داد که در منطقه هزارجریب بهشهر عمده‌ترین ترکیبات اسانس ۱و۸ سینئول، نفتالن، کامفور، آلفا ترپینول و یالنگن بود، در حالیکه در منطقه کیاسر بیشترین ترکیبات اسانس بتاپینن، نفتالن، کامفور، دلتا کادینن، بی‌سیکلو هپتان و آلفا آمورفن شناسایی شد (رنجبر و همکاران، ۱۳۹۴). در تحقیقات Ghannadi و همکاران (۱۹۹۹) در تجزیه اسانس گیاه *S. hydrangea* در قزوین، پنج ترکیب اسپاتولنول (۲۳/۱ درصد)، بتاکاریوفیلن (۹/۹ درصد)، ۱و۸ سینئول (۱۲/۳ درصد)، آلفاپینن (۱۰ درصد) و بتاپینن (۶/۸ درصد) به عنوان عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس گیاه مریم‌گلی تماشایی گزارش شدند. نتایج بررسی اسانس گیاه مریم‌گلی تماشایی که توسط Barazandeh در سال ۲۰۰۴ در اصفهان انجام گرفت نیز نشان داد که ترکیبات ۱و۸ سینئول (۲۸/۴ درصد)، اکساید کاریوفیلن (۱۶/۴ درصد)، آلفاپینن (۱۴/۶ درصد) و بتاپینن (۱۴/۲ درصد) عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس گیاه بودند. Kotan و همکاران (۲۰۰۸) با آنالیز اسانس گیاه *S. hydrangea* در ترکیه ۴۵ ترکیب مختلف را در اسانس این گیاه شناسایی کردند که اصلی‌ترین ترکیبات شامل کامفور، آلفاهامولن، سیس‌سس کویی سابینن، میرتنول، بتابیسابولول و ۱و۸ سینئول بودند.

با بررسی و مقایسه نتایج تحقیقات انجام شده در این زمینه، اینگونه به نظر می‌رسد که عملکرد و محتویات اسانس گیاهان در رویشگاه‌ها و شرایط اقلیمی مختلف متفاوت بوده و دلایل تفاوت آن را، می‌توان به متغیر بودن عواملی از قبیل ارتفاع و به‌التبع آن میزان اشعه ماورابنفش، رطوبت نسبی و سرعت باد، درجه حرارت و طول مدت روشنایی مرتبط دانست (Tajbakhsh et al., 2008). شدت نور در ارتفاعات، بر فعال شدن مسیر بیوسنتزی و تولید هر چه بیشتر اسانس نقش داشته، چرا که بین نور و مواد حدواسطی که در طی چرخه تثبیت کربن به عنوان پیش ماده‌های اصلی در بیوسنتز اسانس‌ها به کار می‌رود، همبستگی شدیدی دیده می‌شود (Bernath, 2008). دمای محیط نیز از طریق اثرگذاری بر هدایت روزنه‌ای، تبخیر و تعرق، جذب املاح، سرعت واکنش‌های شیمیایی مثل فتوسنتز، حل شدن گازها و تاثیر در رشد و نمو گیاهان تولید متابولیت‌های ثانویه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در مسیر تولیدی اسانس، دما روی سرعت متیلاسیون، اکسیداسیون و احیاء تاثیر گذاشته و نسبت ترکیبات مختلف را تغییر می‌دهد که باعث تغییر در کمیّت و کیفیت اسانس می‌شود (Mahajan et al., 2020).

با توجه به تنوع ترکیبات موجود در اسانس گیاه مریم‌گلی تماشایی، شناسایی و تعیین نوع و درصد ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس این گیاه در ارتباط با عوامل اکولوژیکی از جمله ارتفاع از سطح دریا و بررسی تاثیر سایر عوامل محیطی بر روی کمیت و کیفیت اسانس این گیاه می‌تواند ما را در جهت استفاده‌های کاربردی از ذخایر گیاهی یاری نماید و می‌توان از نتایج حاصل از مطالعه حاضر بر روی اسانس، در استاندارد نمودن فرآورده‌های دارویی حاوی این ترکیبات بهره جست.

منابع

آریانفر، م.، اکبری نودهی، د.، همتی، خ.، رستمپور، م. ۱۳۹۷. تأثیر ارتفاع و جهت در عملکرد اسانس و برخی از خواص فیتوشیمیایی گونه‌های دارویی *Artemisia aucheri* و *Artemisia sieberi* در مراتع خراسان جنوبی. نشریه مرتع. ۱۲، ۲۸۱-۲۹۴.

حبیبی، ح .، مظاهری، د.، مجنون حسینی، ن .، چائی چی، م، ر.، فخرطباطبائی، م.، بیگدلی، م. ۱۳۸۵. اثر ارتفاع بر روغن اسانس و ترکیبات داروئی آویشن وحشی *Thymus kotschyanus* منطقه طالقان. پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی. ۷۳، ۲-۱۰.

رنجبر، س.، ابراهیمی، م.، اکبرزاده، م. ۱۳۹۴. بررسی کمیت و کیفیت اسانس گیاه دارویی *Salvia hydrangea* L. در رویشگاه-های مختلف استان مازندران. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی. ۳، ۱۲-۲۴.

قربانزاده، ا.، قاسم‌نژاد، ع.، خوشحال سرمست، م .، نژاد ابراهیمی، ص. ۱۳۹۸. بررسی و مقایسه فیتوشیمیایی اسانس و عملکرد آنتی اکسیدانی سرشاخه‌های گیاه دارویی *Juniperus communis* در رویشگاه‌های مختلف مازندران و گلستان. اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی. ۷، ۱۵-۳۲.

قنبری، ع.، عظیمی، م.ر.، رفیعی، ع. ر.، بی‌پروا، پ .، ابراهیم زاده، م. ع. ۱۳۹۹. تغییر محتوای فیتوشیمیایی گیاه دارویی علف مار *Capparis spinosa* L. جمع آوری‌شده از خرد اقلیم‌های مختلف. فرآیند و کارکرد گیاهی. ۳۹، ۱۶۵- ۱۷۸.

Ale Omrani Nejad, S., Rezvani Aghdam, A. 2019. The study of essential oil composition and antioxidant activity of *Oliveria decumbens* collected from different regions of Khuzestan province. Ecophytochemistry Journal of Medicinal Plants. 24: 14-25.

Azarnivand, H., Ghavam Arabani, M., Sefidkon, F., Tavili, A. 2008. The effect of ecological characteristics on quality and quantity of the essential oils of *Achillea millefolium* L. subsp. Millefolium. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 25(4): 556-571.

Barazandeh, M. 2004. Volatile Constituents of The Oil of *Salvia hydrangea* From Iran. Journal of Essential Oil Research. 16(1): 20-21.

Bernath, J. 2008. Production ecology of secondary plant products. In LE Craker and JE Simon (eds.). Herbs, spices and medicinal plants: Recent advances in botany, horticulture and pharmacology. Vol. I. Oryx Press, Phoenix, Arizona p: 220.

Ghannadi, A., Samsam-SHariat, H., Moattar, F. 1999. Composition of the Leaf Oil of *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. Grown in Iran Preview Access options Journal of Essential Oil Research. 11(6): 745-746.

Kotan, R., Kordali, S., Cakir, A., Kesdek, M., Kaya, Y., Kilic, H. 2008. Antimicrobial and Insecticidal Activities of Essential Oil Isolated from Turkish *Salvia hydrangea*. 36(5-6): 360-368.

Mahajan, M., Kuiry, R., Pal, P. 2020. Understanding the consequence of environmental stress for accumulation of secondary metabolites in medicinal and aromatic plants. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. 18: 100255.

Sairafianpour, M., Bahreininejad, B., Witt, M., Ziegler, H.L., Jaroszewski, J.W., Staerk, D. 2003. Terpenoids of *Salvia hydrangea*: two new, rearranged 20- norabietanes and the effect of oleanolic acid on erythrocyte membrane. Planta Med. 69: 846- 850.

Sonboli, A., Kanani, MR., Yosefzadi, M., Mojarad, M. 2009. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Salvia hydrangea* from Two Localities of Iran. Journal of Medicinal Plants. 8(30): 20-28.

Tajbakhsh, M., Ghiasi, M. 2008. Seeds ecology. Jihad Daneshgahi Publications, West Azerbaijan. 134 p.

The effect of habitat on yield and essential oil content of two populations of *Salvia hydrangea* L. in North Khorasan

Pooya Arvin[1*], Rana Firouzeh[2]

[1] Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran
[2] Department of Agriculture, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

Abstract

The *Salvia hydrangea* L. plant is one of the valuable medicinal species that is used in traditional culture to prevent and treat diseases. . In this study, in order to investigate the effect of the habitat on the yield and content of essential oil, random sampling of the flowering branches of the plant in the full flowering stage with three replications was done from its natural habitats situated in the heights of Raz and Akhvor Dagh in North Khorasan province. After extracting the essential oil, the type and percentage of compounds in the essential oil were analyzed by gas chromatography (GC) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The results of the experiment showed that the effect of the habitat on the essential oil yield of the *Salvia hydrangea L*. plant was significant at the level of 5%, and the Akhvor Dagh district with 0.53% had a higher essential oil yield than the Raz habitat. In the examination of the type and amount of essential oil compounds, a total of 11 compounds were identified, of which cis-alpha- bergamotene (45.67%), verbanone (32.51%) and caryophyllene oxide (4.64%) are the main compounds of essential oil in *Salvia hydrangea* L. grown in Raz habitat, and cis-alpha-bergamotene (57.05 %), geranyl acetate (11.37 %) and geranial (5.73 %) were the main compounds of essential oil in the plants of Akhvor Dagh district. In general, the results of this study proved the effect of ecological conditions on the percentage of essential oil and the content of its compounds in the *Salvia hydrangea* L. plant.

Keywords: essential oil yield, Raz and Akhvor Dagh habitat, *Salvia hydrangea* L.

* e-mail: pooya.arvin@pnu.ac.ir

اثر عصاره آبی – الکلی گیاه خوشاریزه (*Echinophora platyloba* L.) بر اضطراب در موش کوچک آزمایشگاهی

امیر عباس برزگری*، مرتضی مرتضویان

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه

چکیده

خوشاریزه یک گیاه دارویی بومی ایران است. مطالعات بالینی اثرات ضد اضطرابی این گیاه را نشان داده‌اند. با وجود این، مطالعات تجربی در این مورد انجام نشده‌است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات عصاره آبی- اتانولی گیاه خوشاریزه بر اضطراب موش آزمایشگاهی بود. در این مطالعه از چهار گروه هشت‌تایی موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر با وزن ۲۵-۳۰ گرم استفاده شد. از دستگاه ماز بعلاوه مرتفع برای بررسی اثرات عصاره گیاه بر اضطراب استفاده شد. یک ساعت پیش از شروع تست، موش‌ها دوزهای ۰، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره آبی– اتانولی گیاه خوشاریزه را دریافت کردند. سپس، موش‌ها جداگانه در سکوی وسط دستگاه قرار داده شدند و رفتار آنها توسط یک دوربین به مدت ۵ دقیقه فیلم برداری شد. درصد زمان ماندن جانوران در بازوی باز و درصد تعداد ورود جانوران به بازوی باز به عنوان معیارسنجش اضطراب در نظر گرفته شد. تجویز عصاره گیاه به موش‌ها در دوزهای۱۲/۵و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم باعث کاهش معنی‌دار درصد زمان ماندن جانوران در بازوی باز نسبت به گروه کنترل شد ($P<0.05$). علاوه بر این، تجویز دوزهای ۱۲/۵و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره باعث کاهش درصد تعداد ورود به بازوی باز در موش‌ها شد (به ترتیب، $P<0.01$ و $P<0.05$). با توجه به کاهش معنی دار زمان ماندن در بازوی باز و تعداد دفعات ورود به بازوی باز در موش‌های دریافت کننده عصاره نسبت به گروه کنترل می‌توان گفت که عصاره گیاه دارای خاصیت اضطراب زایی می باشد.

واژگان کلیدی: خوشاریزه، اضطراب، موش آزمایشگاهی، ماز بعلاوه مرتفع

ایمیل نویسنده مسئول

E-mail: Barzegaridoctora@gmail.com

۱. مقدمه

اختلال اضطراب شایعترین اختلال روانپزشکی به شمار می روند و stein و همکاران شیوع جهانی آن را ۷/۳ درصد تخمین زده اند. بین اختلال اضطراب و افسردگی همبودی (comorbidity) بالایی وجود دارد. امروزه استفاده از بنزودیازپاین‌ها برای درمان افسردگی به دلیل اثرات جانبی که دارند دیگر توصیه نمی‌شود (Nutt *et al.*, 2002). استفاده از گیاهان دارویی در درمان اضطراب اثرات نوید بخشی را نشان داده است و مطالعات زیادی در این زمینه انجام شده است (Kenda *et al.*, 2022).

گیاه خوشاریزه، خوشاروزه یا تیغ توراغ که در زبان ترکی آذری به آن تولوق اوتو گفته می‌شود یکی از گیاهان دارویی است که بومی ایران است و نام علمی آن *Echinophora platyloba* می‌باشد. از این گیاه به عنوان چاشنی و ضد قارچ در برخی از غذاها مثل دوغ، خیار شور و رب گوجه فرنگی استفاده می‌شود. علاوه بر مصارف خوراکی، این گیاه معطر مصارف دارویی نیز دارد. به عنوان مثال از این گیاه در درمان عفونت های قارچی، کاهش علائم سندرم پیش قاعدگی ، در درمان دلپیچه و اسهال استفاده شده است. علاوه بر این، مطالعات تجربی اثرات درمانی بالقوه متعددی برای این گیاه ذکر کرده‌اند. از آن جمله می‌توان به اثرات ضدباکتریایی، ضد سرطانی، کاهش چربی خون، اثر آنتی اکسیدانی و محافظت در برابر مسمومیت‌های کبدی و کلیوی، افزایش تستوسترون و تقویت قوای جنسی اشاره کرد (Hosseini *et al.*, 2017).

ماز بعلاوه مرتفع به عنوان روشی ساده برای ارزیابی پاسخ‌های اضطرابی جوندگان توسط فایل و همکارانش توصیف شده است. این روش اولین بار توسط Handley وMithani در سال ۱۹۸۴ توصیف شد و امروزه به طور گسترده‌ای برای ارزیابی رفتارهای اضطرابی در جانوران از آن استفاده می‌شود. دستگاه بکار رفته در این روش شامل دو بازوی باز و دو بازوی بسته است که در ارتفاع مشخص از سطح زمین قرار می گیرند و با یکدیگر یک بعلاوه را تشکیل می‌دهند. پاسخ‌های رفتاری در ماز بعلاوه مرتفع به راحتی توسط یک ناظر ارزیابی و کمی می‌شود. به طور خلاصه، جوندگان در تقاطع چهار بازوی ماز بعلاوه مرتفع قرار می گیرند و رفتار آنها معمولاً به مدت ۵ دقیقه ثبت می‌شود. این بر اساس مطالعات اولیه مونتگومری بود که نشان داد موش‌ها قوی‌ترین واکنش‌های اجتنابی را در ۵ دقیقه اول پس از قرار گرفتن در بازوهای باز ماز بعلاوه مرتفع نشان دادند. رفتارهایی که معمولاً هنگام قرار گرفتن جوندگان در ماز مرتفع بعلاوه ثبت می‌شوند شامل زمان صرف شده توسط جانور در بازوهای باز و بازوهای بسته و همچنین تعداد ورودهایی است که جانور در بازوهای باز و بسته انجام می‌دهد. در این دستگاه بهترین معیار برای اثرات ضد اضطرابی یک ماده افزایش زمان ماندن جانوران در بازوی باز و افزایش تعداد ورود جانوران به بازوی باز می باشد. برعکس، موادی که خاصیت اضطراب زایی داشته باشند باعث کاهش زمان ماندن جانوران در بازوی باز و کاهش تعداد ورود جانوران به بازوی باز می‌شوند (Komada *et al.*, 2008). در این تست در برخی از موارد بجای زمان بازوی باز از درصد زمان ماندن جانور در بازوی باز نسبت به مجموع زمان بازوی باز و بسته و بجای تعداد ورود به بازوی باز از درصد تعداد ورود به بازوی باز نسبت به مجموع تعداد ورود به بازوی باز و بسته استفاده می‌شود (Mombeini *et al.*, 2015).

با توجه به اینکه مطالعات بالینی پیشین نشان داده است که استفاده از گیاه خوشاریزه باعث کاهش علائم اضطرابی در سندرم پیش قاعدگی می‌شود (Delaram and Haeri, 2011)، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات عصاره آبی – الکلی گیاه خوشاریزه بر اضطراب با استفاده از مدل ماز بعلاوه مرتفع در موش آزمایشگاهی بود.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. حیوانات آزمایشگاهی

در این تحقیق از موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI استفاده شد. این موش‌ها از مجتمع تولید تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران خریداری و به حیوانخانه دانشگاه مراغه منتقل شد. موش‌ها برای سازش با محیط جدید پس از انتقال به حیوانخانه به مدت یک هفته در شرایط استاندارد نگهداری شدند. دمای نگهداری حیوانات ۲±۲۲ درجه سانتی گراد بود و دوره تاریکی- روشنایی با دوازده ساعت تاریکی و دوازده ساعت روشنایی برقرار بود. حیوانات در بخش روشنایی این دوره مورد آزمایش قرار گرفتند. بجز در زمان آزمایش، حیوانات آزادانه به غذای مخصوص حیوانات آزمایشگاهی و آب شهر دسترسی داشتند.

۲.۲. تهیه عصاره آبی- الکلی گیاه

گیاه خوشاریزه در فصل بهار و در اواخر خردادماه ازتپه‌های اطراف دانشگاه مراغه جمع‌آوری شد و توسط یک گیاه شناس مورد شناسایی و تایید قرار گرفت. سپس، بخش‌های هوایی گیاه در دمای اتاق و در سایه خشک شد و توسط آسیاب برقی به صورت پودر درآمد. صد گرم از این پودر با یک لیتر اتانل ۸۰ درصد مخلوط شد و در دستگاه شیکر- انکوباتور به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس، از کاغذ صافی واتمن برای جداسازی ذرات نامحلول استفاده شد. در مرحله بعد، محلول حاصله در داخل یک بالن ریخته شد و بالن به دستگاه روتاری وصل‌گردید تا بخش الکلی محلول جدا شود. در آخرین مرحله، بخش آبی محلول در دمای اتاق تبخیر شد تا یک بخش خشک باقی بماند. از این ماده خشک برای درست کردن دوزهای مختلف عصاره گیاه استفاده شد. بر اساس مطالعات پیشین (که داده‌های آن هنوز به چاپ نرسیده‌اند) دوزهای ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم برای انجام این آزمایش انتخاب شد. مقادیر مورد نظر از عصاره گیاه به صورت تازه در نرمال سالین حل و به صورت داخل صفاقی به موش‌های آزمایشگاهی تجویز شد. گروه کنترل هم سالین دریافت نمود.

۳.۲. دستگاه ماز بعلاوه مرتفع و جمع آوری داده ها

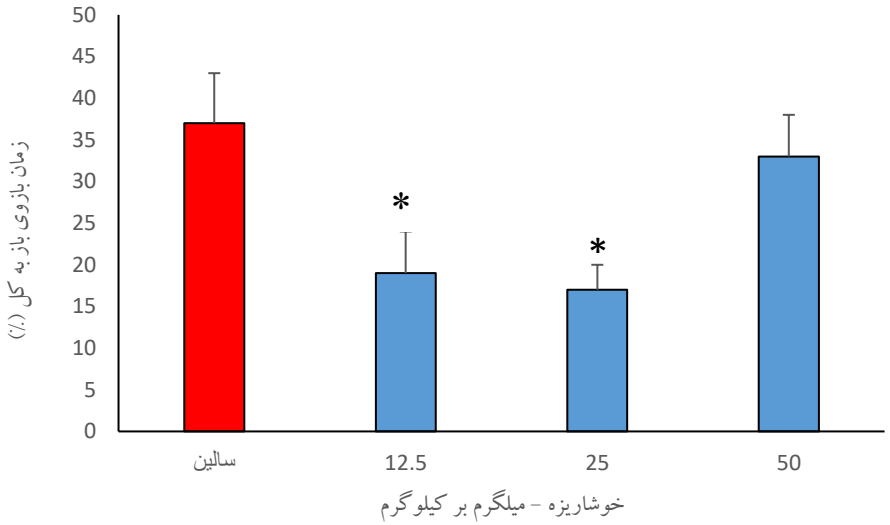
دستگاه مورد استفاده برای آزمایش ماز به علاوه مرتفع شامل دو بازوی باز (۲۵×۵×۰/۵ سانتی متر) و دو بازوی بسته (۲۵×۵×۱۶ سانتی متر) که عمود بر یکدیگر هستند، می باشد. در مرکز دستگاه یک سکو(۵×۵ سانتی متر) قرار دارد که بازوها از طریق آن با یکدیگر ارتباط دارند. بازوهای باز دارای یک دیواره بسیار کوچک (۰/۵ سانتی متر) برای کاهش تعداد سقوط‌های جانوران هستند، در حالی که بازوهای بسته دارای یک دیوار بلند (۱۶ سانتی متر) برای محصور کردن جانوران هستند. کل دستگاه ۵۰ سانتی متر بالاتر از سطح زمین قرار می‌گیرد. در این تحقیق، هر موش به مدت ۵ دقیقه بر روی سکوی مرکزی دستگاه قرار می‌گرفت و از رفتار آن توسط یک دوربین فیلم برداری می‌شد. پس از فیلم برداری، داده‌های زیر توسط فردی که از شرایط آزمایش آگاهی نداشت با مشاهده فیلم‌ها بدست آمد: تعداد ورود به بازوهای باز، تعداد ورود به بازوهای

بسته، زمان ماندن حیوان در بازوهای باز به ثانیه، و زمان ماندن حیوان در بازوهای بسته به ثانیه. با استفاده از اطلاعات فوق، درصد زمان بازوی باز و درصد دفعات ورود به بازوی باز توسط فرمول‌های زیر محاسبه شد: ۱- درصد زمان بازوی باز برابر است با زمان بازوی باز تقسیم بر مجموع زمان بازوی باز و بازوی بسته ضرب در صد.۲- درصد تعداد ورود به بازوی باز برابر است با تعداد ورود به بازوی باز تقسیم بر مجموع تعداد ورود ها به بازوی باز و بسته ضرب در صد.

۳. نتایج

۱.۳. اثر عصاره آبی- الکلی گیاه خوشاریزه بردرصد زمان ماندن جانوران در بازوی باز دستگاه ماز بعلاوه مرتفع:

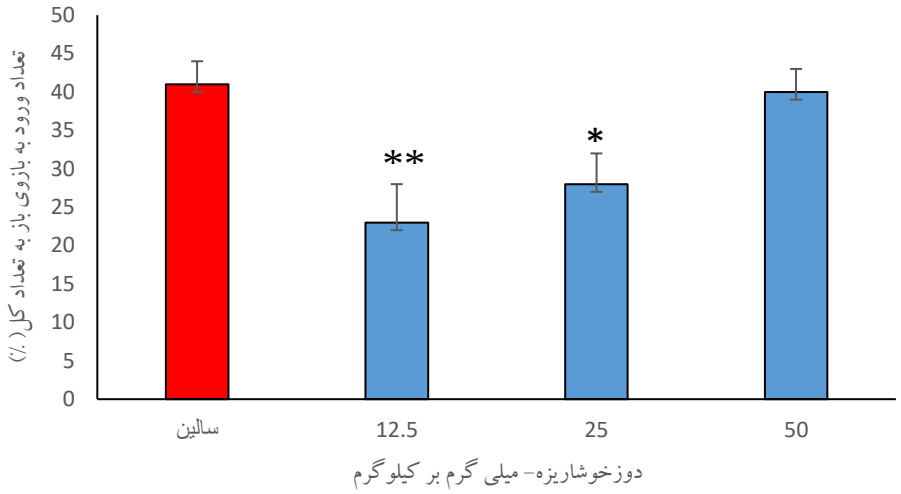
همان طور که در شکل (۱) نشان داده شده است، گروه‌هایی از جانوران مورد مطالعه که دوزهای ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی- اتانولی خوشاریزه را یک ساعت پیش از تست دریافت کردند کاهش معنی‌داری در درصد زمان ماندن در بازوی باز نسبت به گروه دریافت کننده سالین از خود نشان دادند ($p<0.05$).



شکل ۱. اثر عصاره آبی- الکلی گیاه خوشاریزه بر درصد زمان ماندن در بازوی باز . داده ها به صورت میانگین± خطای استاندارد میانگین نمایش داده شده است. * به معنی P کوچک‌تر از 0.05 است.

۲.۳. اثر عصاره آبی- الکلی گیاه خوشاریزه بردرصد تعداد ورود جانوران به بازوی باز دستگاه ماز بعلاوه مرتفع:

همان‌طور که در شکل (۲) نشان داده شده است، موش‌هایی که یک ساعت قبل از تست در دستگاه ماز بعلاوه مرتفع عصاره آبی- اتانولی خوشاریزه را در دوزهای ۱۲/۵ و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند کاهش معنی‌داری در درصد تعداد دفعات ورود به بازوی باز، نسبت به گروه کنترل از خود نشان دادند. این کاهش در موش‌هایی که دوز ۱۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره گیاه را دریافت نمودند، بیشتر بود ($p<0.01$).



شکل ۲. اثر عصاره آبی- الکلی گیاه خوشاریزه بر درصد تعداد ورود به بازوی باز. داده ها به صورت میانگین± خطای استاندارد میانگین نمایش داده شده است. * و ** به ترتیب به معنی $P<0.05$ و $P<0.01$ می باشد.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

دستگاه ماز بعلاوه مرتفع به طور گسترده‌ای در مطالعاتی که اثرات مواد مختلف بر اضطراب را بررسی می‌کنند مورد استفاده قرار می‌گیرد (Walf and Frye, 2007). با دانش کنونی ما به نظر می‌رسد که این اولین باری است که اثرات عصاره آبی- الکلی خوشاریزه بر اضطراب با استفاده از دستگاه ماز بعلاوه مرتفع مورد مطالعه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر درصد زمان ماندن جانوران در بازوی باز و نیز درصد تعداد دفعات ورود به بازوی باز در موش‌هایی که عصاره آبی- اتانولی گیاه خوشاریزه را دریافت نموده بودند نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد. این نتایج نشان دهنده اثرات اضطراب‌زای عصاره گیاه در دوزهای ۱۲/۵ و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم می‌باشد. همچنین، تحقیقات پیشین ما (منتشر نشده) نشان داده است که این دوزهای

پایین عصاره گیاه که اثرات اضطراب زا داشته‌اند نمی‌توانند فعالیت حرکتی موش‌ها را به طور معنی داری تغییر دهند؛ این مورد، اثر احتمالی تغییر فعالیت حرکتی را بر نتایج بدست آمده در این تحقیق رد می‌کند. از طرف دیگر، نتایج تحقیق حاضر ممکن

است با نتایج تحقیقات بالینی قبلی متناقض به نظر برسد چرا که در تحقیقات پیشین تجویز گیاه خوشاریزه باعث کاهش اضطراب و رفتارهای وابسته به اضطراب در شرکت کنندگان در تحقیق شد (Delaram and Haeri, 2011). دلیل این تفاوت را می توان در چند مورد جستجو کرد: اولاً، روش استخراج عصاره در این آزمایش بالینی که روش پرکولاسیون بوده است با روش استخراج ما متفاوت است.ثانیاً، حلّالی که در آن تحقیق بالینی برای استخراج عصاره از آن استفاده شده است دقیقا مشخص نشده است که ممکن است با حلّال ما متفاوت باشد و این تفاوت باعث استخراج مواد موثره متفاوتی در این دو تحقیق شده است. در نتیجه، این مواد متفاوت اثرات متفاوتی بر اضطراب گذاشته‌اند. ثالثاً، راه تجویز متفاوت عصاره و تفاوت در دوزهای مورد استفاده در این دو تحقیق می‌تواند دلیلی بر این تفاوت‌ها باشد. در نهایت، نتایج تحقیقات تجربی بر روی حیوانات آزمایشگاهی همیشه در راستای نتایج تحقیقات بالینی نیست؛ که این به دلیل تفاوت‌های دسترسی زیستی و متابولیسم داروها و همچنین تفاوت‌های گونه‌ای می‌باشد(Elsas *et al.*, 2010).

منابع

Delaram, M., Haeri, A. 2011. The effect of Echinophora platyloba on the pre-menstural syndrome. Research in Medicine. 34: 219-224.

Elsas, S.-M., Rossi, D., Raber, J., White, G., Seeley, C.-A., Gregory, W., Mohr, C., Pfankuch, T., Soumyanath, A. 2010. Passiflora incarnata L.(Passionflower) extracts elicit GABA currents in hippocampal neurons in vitro, and show anxiogenic and anticonvulsant effects in vivo, varying with extraction method. Phytomedicine. 17: 940-949.

Hosseini, Z., Lorigooini, Z., Rafieian-Kopaei, M., Shirmardi, H.A., Solati, K. 2017. A review of botany and pharmacological effect and chemical composition of Echinophora species growing in Iran. Pharmacognosy research. 9(4):305-312.

Kenda, M., Kočevar Glavač, N., Nagy, M., Sollner Dolenc, M. 2022. Medicinal plants used for anxiety, depression, or stress treatment: An update. Molecules. 27(6021)1-19.

Komada, M., Takao, K., Miyakawa, T. 2008. Elevated plus maze for mice. JoVE (Journal of Visualized Experiments). e1088.

Mombeini, T., Mazloumi, S., Shams, J .2015 .Pharmacological effects of Origanum vulgare L. in the elevated plus-maze and open field tests in the rat. Journal of Basic and Clinical Pathophysiology. 3: 29-36.

Nutt, D.J., Ballenger, J.C., Sheehan, D., Wittchen, H.-U., 2002. Generalized anxiety disorder: comorbidity, comparative biology and treatment. International Journal of Neuropsychopharmacology 5, 315-325.

Walf, A.A., Frye, C.A., 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. Nature protocols.2. 322-328.

The effect of hydro-alcoholic extract of the plant (Echinophora platyloba L.) on anxiety in mice

Amir Abbas Barzegari*, Morteza Mortazavian

Department Biology, Faculty of Basic Science, University of Maragheh, Maragheh, Iran

Abstract

Introduction: Khosharizeh (*Echinophora platyloba*) is a medicinal plant native to Iran. Clinical studies have shown the anti-anxiety effects of this plant. However, no experimental study has been conducted on this matter. The aim of this study was to investigate the effects of hydro-ethanolic extract of Khosharizeh on the anxiety of mice. Four groups of male mice (n=8) weighing 25-30 grams were used. Elevated plus maze device was used to investigate the effects of the plant extract on anxiety. One hour before the test, the mice received doses of 0, 12.5, 25 and 50 mg/kg of the extract. Then, each mouse was placed separately on the middle platform of the device, and its behaviors were recorded for 5 minutes with a camera. The percentage of time in the open arm and the percentage of open arm entries were considered as measures of anxiety. The administration of plant extract (12.5 and 25 mg/kg) to mice caused a significant decrease in the percentage of time animals stayed in the open arm compared to the control group ($P<0.05$). In addition, the administration of the extract (12.5 and 25 mg/kg) decreased the percentage of open arm entries in comparison with control group ($P<0.01$ and $P<0.05$, respectively). In this study, animals that received the plant extract showed a significant decrease in both open arm time and the numbers of open arm entries. Therefore, it can be said that the hydro- ethanolic extract of the plant has anxiogenic properties.

Keywords: Khosharizeh, Anxiety, Elevated plus maze, Mice

اثر نوع حلال و روش‌های مختلف روغن‌گیری بر میزان روغن، ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بذر لیموترش محلی جهرم (*Citrus aurantifolia*)

سعیده محتشمی[1] *، یگانه مهارت[2]، یسنا سعادت‌جو[2]

[1] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم

[2] پژوهش سرای دکتر برنا، جهرم

چکیده

مرکبات یکی از مهم‌ترین محصولات باغی ایران است. سالانه مقدار زیادی زباله به دلیل کارخانه‌های فرآوری مواد غذایی، نبود شرایط مناسب برای نگهداری و ناکافی بودن صنعت فرآوری مرکبات در ایران تولید می‌شود. این زباله‌ها اغلب یا مدفون می‌شوند و یا به عنوان خوراک دام استفاده می‌شوند. سالانه مقدار زیادی بذر لیموترش که جزو ضایعات حاصل از کارخانجات آب-لیموگیری آن است، تولید می‌شود که این بذرها حاوی روغن و ترکیبات ارزشمندی است که علاوه بر خواص تغذیه‌ای، خواص دارویی نیز دارند و به جای مدفون شدن می‌توان از آن‌ها استفاده مفید کرد. همچنین از آنجا که نوع حلال و روش بکار گرفته شده برای روغن‌گیری بر کمیت و کیفیت روغن بدست آمده تاثیرگذار است، لذا این پژوهش با هدف بررسی اثر نوع حلال و روش‌های مختلف روغن‌گیری بر میزان روغن، ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بذر لیموترش محلی جهرم پایه‌گذاری شد. بر همین اساس از دو نوع حلال (اتانول و هگزان) و دو روش روغن‌گیری (خیساندن در حلال و سوکسله) با سه تکرار استفاده شد. با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش، از میان روش‌های روغن‌گیری، روش سوکسله و از میان حلال‌های بکار گرفته شده حلال اتانول در استخراج روغن، ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی مناسب‌تر هستند. به‌طوری که این روغن می‌تواند به تنهایی به عنوان منبع روغن خوراکی استفاده شود و یا در ترکیب با سایر روغن‌های گیاهی در جهت افزایش اثرات فراسودمند آن‌ها بکار رود. همچنین این روغن می‌تواند کاربردهای آرایشی-بهداشتی و دارویی نیز داشته باشد که لازمه آن تحقیقات بیشتر در این زمینه می‌باشد.

واژگان کلیدی: آنتی‌اکسیدان، سوکسله، خیساندن، بذر، روغن.

E-mail: mohtashamis@yahoo.com

۱. مقدمه

ایران یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان مرکبات در جهان می‌باشد؛ به‌طوری که در سال ۲۰۱۷، رتبه پنجم تولید مرکبات در جهان را به خود اختصاص داده است (Taghizadeh Alisaraei et al., 2017). ۲۵/۳ درصد از تولید مرکبات ایران در صنایع تبدیلی به مصرف می‌رسد (آمارنامه کشاورزی ایران، ۱۳۷۶). بعد از استخراج آب‌میوه از مرکبات در کارخانجات آب‌میوه‌گیری یکی از ضایعات حاصل از آن، بذر آن‌ها می‌باشد که با توجه به وضعیت اقلیمی خشک و موقعیت اقتصادی ایران لزوم استفاده از ضایعات کاملا محسوس است؛ به‌ویژه آنکه هسته مرکبات از لحاظ داشتن تلخی جزء ضایعات صرف هستند، در حالی که این بذور دارای روغن می‌باشند. روغن تصفیه شده بذر مرکبات برای مصارف خوراکی به عنوان پخت و پز و سالاد و همچنین برای تولید مارگارین و چاشنی سالاد استفاده می‌شود و سرشار از اسیدهای چرب ضروری می‌باشد (گلمکانی و همکاران، ۱۳۹۷). روغن بذر مرکبات منبع مناسبی از اسیدهای چرب ضروری می‌باشد. بیش از ۶۰ نوع اسید چرب در روغن بذر مرکبات شناسایی شده‌است که عمده‌ترین آن‌ها مربوط به اسیدهای چرب غیر اشباع (بیشتر از ۶۵ درصد) می‌باشد. به‌طور کلی، اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در روغن بذر مرکبات شامل اسیدهای اولئیک (بیشتر از ۱۸ درصد) لینولئیک (بیشتر از ۳۰ درصد) و لینولنیک (۲ تا ۱۲ درصد) می‌باشند. نسبت اسیدهای چرب اشباع به اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در روغن بذر مرکبات اسیدهای پالمیتیک و استئاریک بوده که مقادیر آن‌ها به ترتیب حدود ۲۲ تا ۳۱ درصد و ۱ تا ۶ درصد می‌باشد. در مقایسه با سایر اسیدهای چرب، اسیدهای آراشیدونیک و لوریک در مقادیر بسیار ناچیز در روغن بذر مرکبات وجود دارند (Shahidi and Zhong, 2005). روغن بذر مرکبات علاوه بر اسیدهای چرب حاوی ترکیبات باارزشی مانند لیمونوئیدها (لیمونین، نومیلین)، فلاوانون گلیکوزیدها (هسپریدین و نارینجین)، فیتواسترول‌ها، توکوفرول‌ها و کاروتنوئیدها می‌باشد که این ترکیبات موجب بروز خواص دارویی مانند ضد سرطان، ضد ویروس، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی این روغن می‌شوند (Zayed et al., 2021). روغن یکی از ارکان تامین امنیت غذایی کشور و سبد غذایی خانوارها به شمار می‌آید که وابستگی زیادی به واردات دارد. در ایران، دانه‌های روغنی به عنوان یک کالای وارداتی محسوب می‌گردد که واردات آن اغلب به صورت دانه‌های روغنی، روغن تصفیه شده یا خام و یا به صورت کنجاله می‌باشد. براساس آمار گمرک، بیش از ۹۰ درصد نیاز ۱/۵ میلیون تنی به روغن خام کشور از طریق واردات تامین می‌شود. از کل میزان واردات ۱/۲ میلیون تن آن به صورت روغن خام و حدود ۲۰۰ هزار تن از محل ورود دانه‌های روغنی تامین می‌شود (آل نبی امشلی، ۱۳۹۴).

امروزه از گیاهان دارویی بخاطر مقدار بالای ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی و اثرات دارویی سلامت بخشی آن‌ها بصورت تنها یا همراه با روغن‌ها برای مقاصد خوراکی یا دارویی و حتی آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود. یکی از این روغن‌های پرکاربرد روغن بذر مرکبات بوده که از آنتی‌اکسیدان‌های بالا و ترکیبات عالی فنلی برخوردار است که یکی از کاربردهای آن ضد سرطان بودن آن است. روغن بذر لیموترش می‌تواند کاربرد زیادی در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی و بهداشتی داشته باشد و به تنهایی یا همراه با سایر ترکیبات در فرمولاسیون انواع مختلفی از محصولات غذایی استفاده شود. روش‌هایی برای جداسازی و خشک کردن بذرها ابداع شده و تولید تجاری روغن بذرهای مرکبات امکان پذیر شده است. در حالی که ترکیب روغن بذر مرکبات در کشورهای دیگر مطالعه شده است و روش‌های مناسبی برای خشک کردن بذرهای مرکبات به منظور روغن‌کشی، پالایش و رنگبری این روغن‌ها ارائه شده است، متاسفانه در ایران مطالعه چندانی صورت نگرفته است (حامدی و گودرزی، ۱۳۷۸).

بر اساس مطالعات انجام شده در گیاهان مختلفی مانند سیاه دانه (افخمی سرای و همکاران، ۱۴۰۰)، خارمریم (حاجی آقایی و همکاران، ۱۳۹۷) و بذر نارنج (گلمکانی و همکاران، ۱۳۹۷)، کمیت و کیفیت روغن بذرها تحت تاثیر روش‌های مختلف استخراج تغییر می‌کند. همچنین با توجه به اینکه شهر جهرم قطب تولید مرکبات فارس می‌باشد و سالانه بین ۴۰۰ تا ۶۰۰ هزارتن انواع مرکبات را بسته‌بندی کرده و به سراسر کشور صادر می‌کند و فعالیت بالای کارخانجات آب‌لیموگیری جهرم، این تحقیق با هدف بررسی تاثیر حلال‌ها و روش‌های مختلف روغن‌گیری بر میزان روغن، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی روغن بذر لیموترش محلی جهرم در جهت استفاده مفید از این ضایعات زیستی کارخانجات آب‌لیموگیری انجام شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. منطقه مورد مطالعه

در این پژوهش، بذرهای لیموترش محلی جهرم (که به طور گسترده جهت آبگیری استفاده می‌شود) از یکی از کارگاه‌های آب‌لیموگیری تهیه شدند و پس از تمیز کردن، آن‌ها را بوسیله آسیاب آزمایشگاهی کاملا پودر کرده و به دو روش خیساندن و سوکسله به صورت زیر روغن‌گیری انجام گرفت.

۲.۲. روغن‌گیری به روش خیساندن

در این روش از حلال‌های اتانول و ان-هگزان (نرمال هگزان) جهت روغن‌گیری استفاده شد. در هر نمونه، میزان ۱۵۰ گرم بذر آسیاب شده وزن شد و داخل بالن‌های ۱۰۰۰ میلی‌لیتری انتقال یافت و سپس به هرکدام میزان ۳۰۰ میلی‌لیتر از حلال‌های مذکور اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت بر روی دستگاه شیکر با دور ۲۰۰ دور در دقیقه (rpm) قرار داده شد تا روغن موجود در بذرها به طور کامل در حلال‌ها حل شوند. بعد از آن نمونه‌ها از روی شیکر برداشته شدند و با کمک کاغذ صافی، صاف گردیدند به‌طوری که روغن حل شده در حلال از سایر ضایعات جدا شدند. سپس روغن‌ها به مدت ۷۲ ساعت در زیر هود قرار داده شدند تا حلال‌های موجود در روغن‌ها به صورت کامل تبخیر شدند و روغن خالص باقی ماند.

۳.۲. روغن‌گیری به روش سوکسله

اساس کار دستگاه سوکسله (Soxhlet) بر مبنای حرارت و حلال می‌باشد. به منظور استخراج روغن از بذر لیموترش به روش سوکسله، میزان ۵۰ گرم از نمونه پودر شده درون کارتوش موجود در دستگاه سوکسله قرار داده شد و میزان ۲۰۰ میلی‌لیتر از حلال‌های ذکر شده (اتانول و ان-هگزان) به صورت جداگانه درون بالن ۲۵۰ میلی‌لیتری دستگاه سوکسله ریخته شد و سپس گرم‌کننده (هیتر) دستگاه روشن شد تا حلال به جوش آید. حلال پس از رسیدن به نقطه جوش تبخیر شده و بخارات حاصل از آن به قسمت بالای دستگاه که سردکن یا کندانسور یا مبرد نام دارد حرکت کرده و در آن‌جا تحت تاثیر دمای سردی که به وسیله آب جاری ایجاد می‌شد، به حالت مایع درآمده و بر روی نمونه‌های موجود در کارتوش‌ها ریخته می‌شود و پس از پر شدن محفظه کارتوش از حلال، بازگشت حلال به داخل بالن (سیرکوله) انجام می شود و این کار تا مرحله روغن‌گیری کامل ادامه داشت. این عمل در مدت زمان ۳ ساعت روغن‌گیری حدود ۲۰ مرتبه تکرار شد تا روغن موجود در بذرها بطور کامل در حلال

حل شود. سپس دستگاه سوکسله خاموش شد و پس از یک مرحله صاف کردن، بالن حاوی روغن حل شده در حلال ها جهت تبخیر حلال مانند روش قبل به مدت ۷۲ ساعت در زیر هود قرار گرفتند.

٤.٢. اندازه گیری میزان روغن

محاسبه میزان روغن در همه نمونه‌ها، بر اساس وزن روغن به دست آمده در ۱۰۰ گرم بذر (وزنی-وزنی) محاسبه شد و در نمونه‌هایی که از مقدار کمتر یا بیشتر از ۱۰۰ گرم بذر پودرشده استفاده شده بود تناسب گرفته شد.

۵.۲. اندازه گیری میزان ترکیبات فنلی

در ابتدا میزان ۲/۵ گرم روغن مربوط به هر نمونه وزن شد و به لوله فالکون انتقال یافت و ۲/۵ میلی‌لیتر حلال ان-هگزان به آن اضافه گردید. این مخلوط به مدت یک دقیقه ورتکس شد و سپس میزان ۲/۵ میلی‌لیتر محلول متانول:آب (به نسبت ۸۰ به ۲۰) اضافه و دوباره به مدت یک دقیقه ورتکس شد. نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و سپس فاز روغنی رویی با سرنگ خارج گردید. فاز آبی نیز به صورت جداگانه نگهداری شد. در ادامه میزان ۲/۵ میلی‌لیتر محلول متانول:آب به فاز روغنی جدا شده از مرحله قبل اضافه شد و به مدت یک دقیقه ورتکس شد. سپس مشابه مرحله اول، با دور و زمان مشابه سانتریفوژ گردید. بعد از سانتریفوژ، فاز روغنی با سرنگ خارج شد و در لوله دیگر قرار گرفت. فاز آبی به صورت جداگانه نگهداری شد. به فاز روغنی حاصل از مرحله قبل نیز ۲/۵ میلی‌لیتر محلول متانول:آب اضافه شد و مشابه مرحله قبل ورتکس و سپس سانتریفوژ شد. فازهای روغنی و آبی جداگانه نگهداری شدند. فازهای آبی نگهداری شده با هم مخلوط شدند و ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتئو (Folin-Ciocalteu) به آن اضافه گردید. پس از اختلاط کامل، مخلوطها به مدت سه دقیقه در حالت سکون قرار داده شد تا واکنش صورت پذیرد و در ادامه میزان ۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد به فاز آبی اضافه شد و بعد از یک دقیقه با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. نمونه‌ها در طول شب نگهداری و سپس جذب آن در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد (Capannesi et al., 2000).

برای ترسیم منحنی کالیبراسیون جهت محاسبه میزان ترکیبات فنلی موجود در روغن، محلول‌های استاندارد اسید گالیک در متانل با غلظت‌های مختلف در دامنه ۰/۰۴ تا ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آماده شد. سپس به بالن‌های حجم سنجی ۵۰ میلی‌لیتر، یک میلی‌لیتر محلول استاندارد اسید گالیک، ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتئو (برای تهیه این معرف، معرف فولین غلیظ با آب مقطر به نسبت یک به ده رقیق شد) و پنج میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه و با آب خالص به حجم نهایی رسانده شد. محلول در طول شب نگهداری و سپس جذب آن در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. منحنی میزان جذب در برابر غلظت اسید گالیک (میلی‌گرم به میلی‌لیتر) رسم شد و معادله زیر با ضریب اطمینان ۰/۹۶ به دست آمد:

$$Y= ۰/۶۶۰۷X$$

که X جذب خوانده شده در طول موج ۷۶۵ نانومتر و Y مقدار ترکیبات فنلی بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است.

وجود ترکیبات فنلی در روغن در واکنش با فولین و کربنات سدیم باعث تشکیل رنگ آبی می‌گردد که هرچه رنگ نمونه‌ها پررنگ تر باشد نشان دهنده بالاتر بودن ترکیبات فنلی موجود در روغن می‌باشد.

٦.٢. اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی

جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های روغن از معرف DPPH (2,2- diphenyl picrylhydrazyl) استفاده شد (Oke et al., 2009). در این آزمایش، از روش توصیه شده توسط با اندکی تغییر استفاده شد. جهت واکنش کامل روغن‌ها با ماده دی-پی‌پی‌اچ از حلال ان-هگزان جهت ساخت محلول اصلی استفاده شد که تولید رنگ ارغوانی می کند. ترکیباتی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری می‌باشند باعث خنثی شدن این رنگ و تبدیل رنگ ارغوانی به زرد روشن می گردند (شکل شماره ۲). در ادامه، از هر نمونه روغن میزان ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و درون لوله آزمایش انتقال یافت و به هر کدام میزان ۵ میلی‌لیتر محلول DPPH با غلظت ۰/۰۰۴ درصد اضافه شد. در محلول شاهد به جای روغن، ۱۰۰ میکرولیتر ان-هگزان اضافه شد. محلول‌ها به مدت ۱۰ ثانیه به به وسیله شیکر انگشتی به شدت تکان داده شدند و مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و شرایط تاریکی جهت انجام واکنش نگهداری شدند و در نهایت اعداد جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. هرچه اعداد جذب پایین‌تر باشد نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تر می‌باشد. درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

۱۰۰ ×عدد جذب شاهد/ (عدد جذب نمونه -عدد جذب شاهد) = درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۷.۲. بررسی مقایسه‌ای رنگ روغن

بر اساس بررسی چشمی، تغییرات رنگ نمونه‌ها که تا حدودی با هم اختلاف داشتند مورد ارزیابی قرار گرفتند.

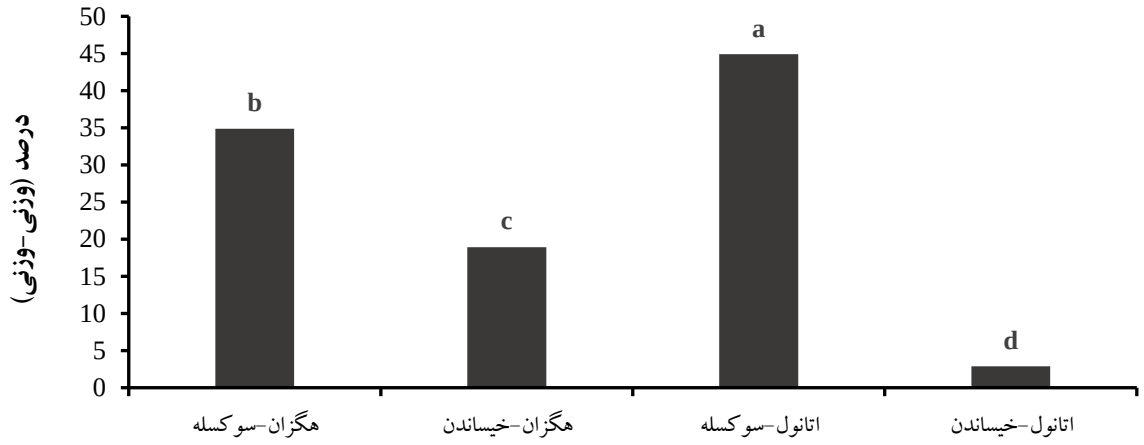
برای انجام این تحقیق، آزمایشی به صورت فاکتوریل با دو فاکتور و سه تکرار بر پایه طرح کامل تصادفی انجام شد. فاکتور اول نوع حلال (شامل دو نوع حلال: اتانول و ان-هگزان) و فاکتور دوم، روش روغن گیری (شامل دو روش: روغن گیری با روش خیساندن و سوکسله) بود.

۳. نتایج

نتایج نشان دهنده تاثیر قابل توجه روش‌های روغن‌گیری و نوع حلال بر میزان روغن، ترکیبات فنلی روغن و فعالیت آنتی‌اکسیدانی روغن بود که در زیر به شرح آن‌ها پرداخته شده است.

۱.۳. میزان روغن

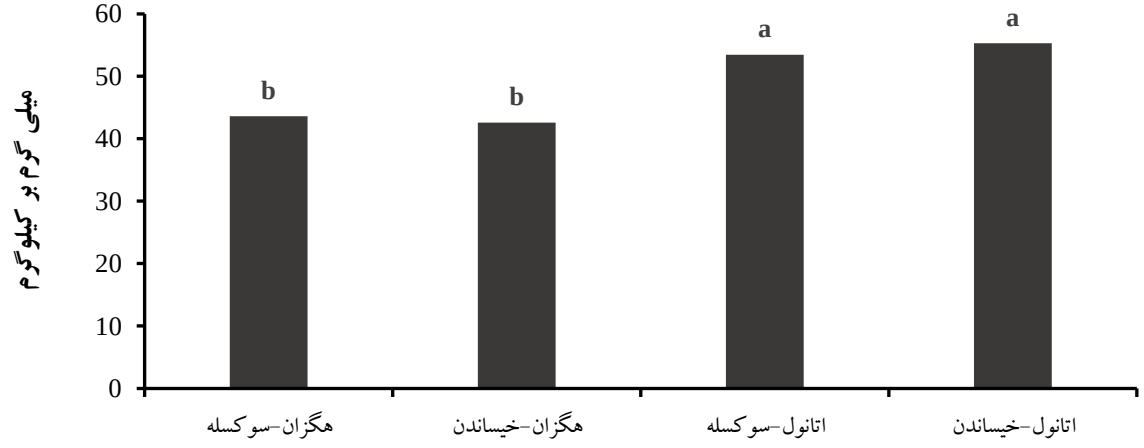
تاثیر روش‌های مختلف روغن‌گیری و نوع حلال بر میزان روغن به دست آمده از بذر لیموترش محلی جهرم قابل توجه بود. به‌طوری که بیشترین میزان روغن (۴۴/۹۰ درصد) در روش سوکسله با استفاده از حلال اتانول و بعد از آن نمونه روغن‌گیری شده توسط سوکسله با استفاده از حلال ان-هگزان (۳۴/۸۷ درصد) بدست آمد. در حالی که کمترین میزان روغن (۲/۸۸ درصد) در روش خیساندن و استفاده از حلال اتانول بدست آمد. میزان روغن بدست آمده در روش سوکسله بدون در نظر گرفتن نوع حلال حدود چهار برابر (۳/۶۶) بود (شکل ۱). نوع حلال تاثیر کمتری بر میزان روغن به دست آمده در مقایسه با روش روغن‌گیری در نمونه بذر لیمو در این پژوهش داشته است.



شکل ۱- تاثیر نوع حلال و روش روغن‌گیری بر میزان روغن بذر لیموترش محلی جهرم

۲.۳. میزان ترکیبات فنلی

بیشترین میزان ترکیبات فنلی (۵۵/۳۰ میلی‌گرم گالیک اسید در کیلوگرم) مربوط به روغن‌گیری به روش خیساندن با استفاده از حلال اتانول و بعد از آن روغن‌گیری به روش سوکسله با استفاده از حلال اتانول (۵۳/۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) بود که اختلاف زیادی بین این دو روش وجود نداشت. مقادیر روغن به‌دست آمده با استفاده از حلال هگزان با استفاده از روش‌های سوکسله و خیساندن اختلاف زیادی با هم نداشتند (به ترتیب ۴۳/۶۳ و ۴۲/۵۹ میلی‌گرم در کیلوگرم) (شکل ۲). تاثیر نوع حلال بر میزان ترکیبات فنلی روغن در مقایسه با روش روغن‌گیری پررنگ‌تر بود. به طوری که میانگین روغن بدست آمده با استفاده از حلال اتانول در مقایسه با حلال هگزان به مقدار ۲۶ درصد افزایش یافته است.



شکل ۲- تاثیر نوع حلال و روش روغن‌گیری بر میزان ترکیبات فنلی روغن بذر لیموترش محلی جهرم

۳.۳. فعالیت آنتی اکسیدانی

بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۸۶/۱۵ درصد) در روغن‌گیری به روش سوکسله و حلال اتانول و بعد از آن روغن‌گیری به روش خیساندن و حلال اتانول (۷۷/۷۹ درصد) بدست آمد. در حالی که فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های روغن‌گیری شده با استفاده از حلال هگزان در روش‌های سوکسله (۶۱/۴۱ درصد) و خیساندن (۶۵/۰۶ درصد) کمتر بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی روغن‌ها نیز مانند میزان ترکیبات فنلی بیشتر تحت تاثیر نوع حلال قرار گرفتند به‌طوری که میانگین اعداد نشان دهنده افزایش ۳۰ درصدی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در استفاده از حلال اتانول نسبت به هگزان بود (شکل ۳).



شکل ۳- تاثیر نوع حلال و روش روغن‌گیری بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی روغن بذر لیموترش محلی جهرم

٤.۳. مقایسه رنگ روغن نمونه‌ها

رنگ ظاهری روغن‌ها نیز تحت تاثیر نوع حلال و روش استخراج قرار گرفتند به صورتی که در نمونه‌هایی که از حلال ان-هگزان استفاده شده بودند، روغن‌ها دارای رنگ روشن زرد متمایل به سبز بودند و رنگ روغن نمونه مربوط به روش خیساندن روشن تر از روغن استخراج شده به روش سوکسله بود. روغن استخراج شده با استفاده از حلال اتانول و با استفاده از سوکسله دارای رنگ زرد متمایل به قهوه‌ای بود در حالی که روغن مربوط به نمونه حلال اتانول به روش خیساندن به رنگ قهوه‌ای بود (شکل شماره ۲). طبق نتایج این تحقیق، به نظر می‌رسد که بین رنگ روغن‌ها و میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ارتباط مستقیمی وجود دارد و نمونه‌های روغن دارای رنگ تیره‌تر (نمونه‌هایی که از حلال اتانول استفاده شده است) دارای شاخص‌های کیفی بالاتری می‌باشند گرچه از نظر مصرف کننده رنگ تیره روغن به عنوان یک نکته منفی محسوب می‌شود.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

ضایعات حاصل از مرکبات از جمله بذرها، غنی از ترکیبات شیمیایی گیاهی و سایر ترکیبات سودمند هستند که به عنوان ترکیبات طعم دهنده، مکمل‌های غذایی و نگهدارنده‌های مواد غذایی می‌توانند استفاده شوند. علاوه بر این، این مواد شیمیایی گیاهی در

کاربردهای آرایشی مانند مو، ناخن، پوست، لوسیون‌های ضد باکتری و ضد قارچ نیز استفاده می‌شوند. بذر مرکبات، دارای ترکیبات فنلی و روغن می‌باشند که به صورت بالقوه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند. بازیافت بذر مرکبات ارزش اقتصادی آن‌ها را برای تولید محصولات با ارزش افزوده، ثابت کرده است. به عنوان مثال روغن بذر نارنگی به دلیل عملکرد بالای روغن، اسیدهای چرب ضروری (اسید لینولئیک و اسید اولئیک) و محتویات استری شده، منبع ارزشمندی برای روغن‌های گیاهی خوراکی و تولید بیودیزل است. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل شیمیایی روغن‌های مختلف بذر مرکبات، آن‌ها را به عنوان روغن‌های سالم امیدوارکننده معرفی می‌کند. به ویژه، روغن بذر گریپ‌فروت در بین دانه‌های مرکبات کارایی خود را برای استفاده در ترمیم زخم، آنتی‌اکسیدان، ضدباکتری و داروهای ضددیابت ثابت کرده است. علاوه بر این، در صنایع غذایی به عنوان نگهدارنده و در بسته‌بندی مواد غذایی استفاده می‌شود (Zayed et al., 2021). انتخاب روش‌های استخراج بر روی ویژگی‌های شیمیایی روغن بذرها تأثیر می‌گذارد. بنابراین روش‌هایی که منجر به استخراج بیشتر هم روغن و هم سایر ترکیبات ارزشمند موجود در بذر شود از اهمیت بالایی برخوردار هستند. با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش، از میان روش‌های روغن‌گیری روش سوکسله و از بین دو حلال بکار گرفته شده حلال اتانول در استخراج روغن، ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی مناسب‌تر هستند. به‌طوری که این روغن می‌تواند به تنهایی به عنوان منبع روغن خوراکی استفاده شود و یا در ترکیب با سایر روغن‌های گیاهی در جهت افزایش اثرات فراسودمند آن‌ها بکار رود. همچنین این روغن می‌تواند کاربردهای آرایشی بهداشتی و دارویی نیز داشته باشد که لازمه آن تحقیقات بیشتر در این زمینه می‌باشد.

براساس حلال‌ها و روش‌های بکار رفته در این پژوهش، روش سوکسله با استفاده از حلال اتانول به عنوان روش بهینه انتخاب شد. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که از نظر تغذیه‌ای، روغن بذر لیموترش یک انتخاب قابل توجه می‌باشد که می‌تواند علاوه بر مصارف غذایی، مصارف صنعتی نیز داشته باشد. با توجه به اینکه جهرم یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان لیموترش می‌باشد، بذرهای حاصل از کارخانجات آب لیموگیری در این شهر که به عنوان ضایعات به حساب می‌آیند، می‌توانند منبع قابل اعتمادی از روغن خوراکی و دارویی باشند.

منابع

افخمی سرای، ا.، آزادمرد دمیرچی، ص.، قره‌خانی، م. ۱۴۰۰. استخراج روغن از سیاه دانه همراه با گیاه رزماری با روش پرس سرد و بررسی برخی از ویژگی‌های کیفی آن. مجله علوم و صنایع غذایی ایران. ۱۱۳(۱۸)، ۲۲۵-۲۳۲.

آل نبی امشلی، س.، ۱۳۹۴. تجزیه و تحلیل روند صادرات و واردات محصولات اساسی کشاورزی و نقش آن در ضریب خودکفایی. موسسه پژوهش های برنامه ریزی، اقتصاد کشاورزی و توسعه روستایی. ۳۷.

آمارنامه کشاورزی ایران. ۱۳۷۶. وزارت کشاورزی.

حاجی آقایی، ر.، رضازاده، ش.، غفارزادگان، ر.، محمدنژاد، آ.، توکلی، م. ۱۳۹۷. بررسی تاثیر حلال مصرفی، خوراک ورودی و روش روغن گیریدر تهیه عصاره استاندارد شده سیلی مارین. فصلنامه گیاهان دارویی. ۱۷(۲)، ۱۶۷-۱۷۶.

حامدی، م.، گودرزی، ف. ۱۳۷۹. بررسی امکان استفاده از هسته مرکبات حاصل از ضایعات کارخانه های فرآوری به عنوان منبع روغن خوراکی. کجله علوم کشاورزی ایران. ۳۱(۲)، ۴۰۱-۴۱۳.

گلمکانی، م.ت.، مصباحی، غ.، گرجی، ن.، نیاکوثری، م. ۱۳۹۷. مقایسه تاثیر روش‌های مختلف استخراج بر بازدهی و ترکیب اسید چرب روغن دانه نارنج. علوم و صنایع غذایی. ۷۴(۱۵)، ۱۰۹-۱۱۷.

Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M., and Parenti, A. 2000. Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. Food Chemistry. 71: 553–562.

Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S., Altundag, S. 2009. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja* cuneifolia Ten. Food Chemistry. 112: 874-879.

Shahidi, F., and Zhong, Y. 2005. Citrus Oil and Essences. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. 6th ed. Canada, Memorial University of Newfoundland. PP. 50-51: 53-61.

Taghizadeh-Alisaraei, A., Hosseini, S.H., Ghobadian, B., Motevali, A. 2017. Biofuel production from citrus wastes: A feasibility study in Iran. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Article in press.

Zayed, A., Badawy, M.T., Farag, M.A. 2021. Valorization and extraction optimization of *Citrus* seeds for food and functional food applications. Food Chemistry. 355: 1-15.

The effect of solvent type and different methods of oil extraction on oil content, phenolic compounds and antioxidant activity of lime seeds (*Citrus aurantifolia*)

Saeideh Mohtashami[1*], Yeganeh Maharat[2], Yasna Saadat jou[2]

[1] Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran
[2] Research Center of Dr. Borna, Jahrom, Iran

Abstract

Citrus fruits are one of the most important horticultural products of Iran. Every year, a large amount of waste is produced in Iran due to food processing factories, the lack of suitable conditions for storage and inadequacy of the citrus processing industry. These wastes are often either buried or used as animal feed. Every year, a large amount of lime seeds are produced, which are part of the waste from lemon juice factories. These seeds contain oil and valuable compounds that have nutritional and medicinal properties as well. Therefore, instead of burying them, they can be usefully used. Since solvent type and the method used for oil extraction have an effect on the quantity and quality of the oil obtained, this research was based on the purpose of investigating the effect of solvent type and different methods of oil extraction on the oil content, phenolic compounds and antioxidant activity of lime seeds. Accordingly, two solvent types (ethanol and hexane) and two oil extraction methods (maceration and Soxhlet) with three replication were used. According to the results, Soxhlet method and ethanol solvent were more suitable in extracting oil, phenolic and antioxidant compounds. So that this oil can be used alone as a source of edible oil or combined with other vegetable oils to increase their beneficial effects. Also, it can also has cosmetic-hygienic and medicinal uses, which requires more research in this field.

Keywords : Antioxidant, Soxhlet, maceration, seed, oil

[1]- mohtashamis@yahoo.com

اثر نیتریک اکسید بر رشد و تولید استویوزید در کشت بافت گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

محسن تحویلداری، آیت اله رضایی[1] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران ، ایران

چکیده

نیتریک اکسید در بسیاری از سیستم‌های زنده در پدیده ترارسانی علامت و در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیک، پاتوفیزیولوژیک و همچنین القای تولید متابولیتهای ثانویه دخالت می‌نماید. از طرفی گیاه استویا به عنوان شیرین کننده طبیعی در محصولات غذایی به ویژه برای استفاده افراد دارای اضافه وزن و مبتلا به دیابت دارای اهمیت زیادی است. از این رو در این پژوهش اثر نیتریک اکسید بر استویا در سیستم کشت بافت مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار و ۴ سطح از سدیم نیتروپروساید (منبع تولیدکننده نیتریک اکسید) با غلظت‌های ۰، ۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ میلی‌مولار انجام شد. نتایج نشان داد که نیتریک اکسید موجب کاهش رشد بصورت وزن‌تر و همچنین میزان کلروفیل کل و کارتنوییدها شد. ظرفیت انتی اکسیدانی با افزایش غلظت نیتریک اکسید تا ۰/۰۶۲۵ میلی‌مولار بصورت معنی داری در مقایسه با شاهد افزایش یافت ولی در غلظتهای بالاتر، این شاخص کاهش نشان داد. در تمامی غلظت‌های نیتریک اکسید افزایش معنی داری در فعالیت آنزیم فنیل-آلانین‌آمونیالیاز (PAL) نسبت به کشت شاهد مشاهده گردید. همچنین نیتریک اکسید در غلظت‌های ۰/۰۶۲۵ و ۰/۱۲۵ میلی-مولار سبب افزایش معنی دار در میزان استویوزید در نمونه‌های تیمار شده نسبت به نمونه شاهد شد. اما در غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار نسبت به نمونه شاهد اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. بیشترین محتوای استویوزید با مقدار ۲۰۰/۷ میلی‌گرم در لیتر در کشت تیمار شده با ۰/۰۶۲۵ میلی‌مولار نیتریک اکسید اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج این تحقیق بنظر میرسد نیتریک اکسید با القای پاسخهای دفاعی، باعث افزایش تولید استویوزید گردید.

واژگان کلیدی: استویا، نیتریک اکسید، الیسیتور، متابولیت ثانویه، کشت بافت

۱. مقدمه

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni گیاهی علفی، چند ساله و متعلق به خانواده Asteraceae است. میزان گلیکوزیدها در بین اندام‌های مختلف گیاه و در مراحل رشد، متفاوت است. به‌طوری‌که حداکثر تجمع گلیکوزیدها در برگ و در مرحله قبل از گل‌دهی است، بنابراین برداشت باید قبل از گل‌دهی انجام بگیرد (Singh and Rao, 2005). مقدار گلیکوزیدهای استویول در

arezaei@shahed.ac.ir

استویا به عوامل متعددی وابسته است که ممکن است به ۲۰ درصد وزن خشک برگ برسد (Brandle et al., 1998). توزیع این ترکیبات در اندام‌های گیاهی متفاوت است و بیشترین غلظت آن، در برگ‌های گیاه وجود دارد. عمده گلیکوزیدهای استویول در گیاه، استویوزید و ربودیوزید A است که به ترتیب ۴ تا ۱۳ و ۲ تا ۴ درصد وزن خشک برگ می‌باشند وتنها این دو نوع گلیکوزید استویول به صورت تجاری تولید می‌شوند (Gupta et al., 2016).

نیتریک اکسید یک مولکول گازی کوچک و قابل انتشار است که به صورت درونزا در بسیاری از سیستم‌های زنده در پدیده ترارسانی علامت و همچنین در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک دخالت می‌نماید (Duan et al., 2007). علاوه بر این مطالعات اخیر نقش NO را در القای تولید متابولیت‌های ثانویه گزارش کرده‌اند. به عنوان مثال هنگامی‌که ریشه‌های مویی *Echinacea purpurea* با سدیم نیتروپروساید (منبع تولید کننده NO)، تحت تاثیر قرار گرفتند، تجمع ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و مشتقات اسید کافئیک افزایش نشان داد (Wu et al., 2007). همچنین تولید ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آنتوسیانین‌ها تحت تاثیر غلظت‌های مختلف NO افزایش یافت (اسماعیل‌زاده بهابادی و همکاران، ۱۳۹۴). با توجه به نقش‌های مهم NO در رشد و نمو و القای تولید متابولیت‌های ثانویه در این تحقیق سعی برآن است تا اثر آن بر برخی پارامترهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی از جمله تولید استویوزید در کشت درون شیشه ای استویا مورد بررسی قرار گیرد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تولید گیاهچه و اعمال تیمارها

برای این منظور بذرهای استریل شده گیاه استویا در محیط کشت MS بدون هورمون کشت و در اتاق رشد در شرایط تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از جوانه زنی، نمونه‌ها از تاریکی خارج و به شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. گیاهچه ها در محیط کشت حاوی سدیم نیتروپروساید (SNP) (منبع تولید کننده NO) در چهار غلظت (۰، ۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ میلی‌مولار) کشت شدند و سپس به اتاقک رشد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. بعد از گذشت ۳۰ روز نمونه‌ها برداشت شده و شاخص‌های مورد نظر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۲.۲. اندازه‌گیری شاخص‌های رشد و فیزیولوژیکی

برای این منظور گیاهچه‌ها از محیط کشت خارج و بلافاصله وزن‌تر آن‌ها اندازه‌گیری و یادداشت شد. اندازه‌گیری کلروفیل کل و کارتنوئید به روش آرنون (Arnon,1967)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بروش (Tadhani et al., 2007) و فعالیت آنزیم فنیل-آلانین‌آمونیالیاز (PAL) بروش (D'Cunha et al., 1996) اندازه‌گیری شد. استخراج و اندازه‌گیری میزان استویوزید نیز به کمک HPLC (Knauer، آلمان) و مطابق روش (Hearn and Subedi, 2009) انجام شد.

۳. نتایج

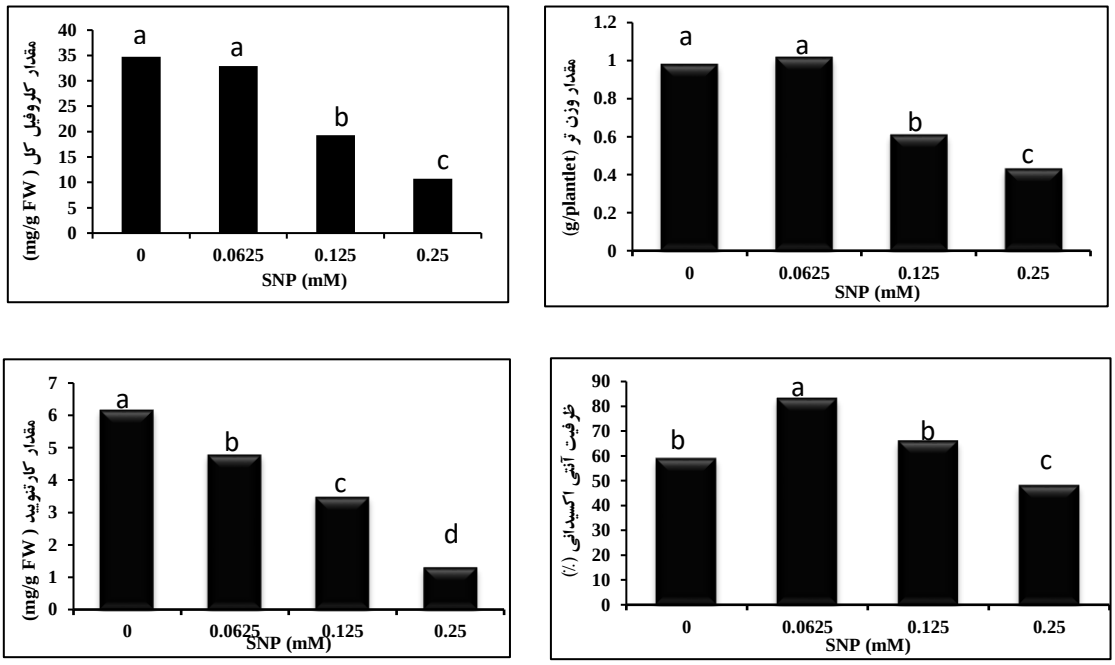
همانطورکه شکل ۱ نشان می‌دهد نیتریک اکسید موجب کاهش رشد بصورت وزن‌تر و همچنین میزان کلروفیل کل و کارتنوییدها شد. میزان رشد و کلروفیل کل در غلظت ۰/۰۶۲۵ میلی‌مولار نیتریک اکسید نسبت به کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت. اما با افزایش غلظت نیتریک اکسید میزان آن‌ها کاهش یافت به طوریکه کمترین میزان مربوط به نیتریک اکسید در غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار بود. اما در خصوص کارتنوییدها، با افزایش سطح تیمار غلظت آنها بصورت معنی داری در مقایسه با نمونه شاهد کاهش یافت. در خصوص ظرفیت انتی اکسیدانی با افزایش غلظت نیتریک اکسید تا ۰/۰۶۲۵ میلی‌مولار این شاخص بصورت معنی داری در مقایسه با شاهد افزایش یافت ولی در غلظت‌های بالاتر تیمار، این شاخص کاهش نشان داد.

مطابق شکل ۲ نیتریک اکسید در تمامی غلظت‌ها سبب افزایش معنی دار فعالیت آنزیم PAL در نمونه‌های تیمار شده نسبت به کشت شاهد گردید. همچنین نیتریک اکسید در سطوح ۰/۰۶۲۵ و ۰/۱۲۵ میلی‌مولار سبب افزایش معنی دار در میزان استویوزید در نمونه‌های تیمار شده نسبت به نمونه شاهد شد. اما در غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار نسبت به نمونه شاهد اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. بیشترین محتوای استویوزید با مقدار ۲۰۰/۷ میلی‌گرم در لیتر در کشت تیمار شده با ۰/۰۶۲۵ میلی‌مولار نیتریک اکسید اندازه‌گیری شد.

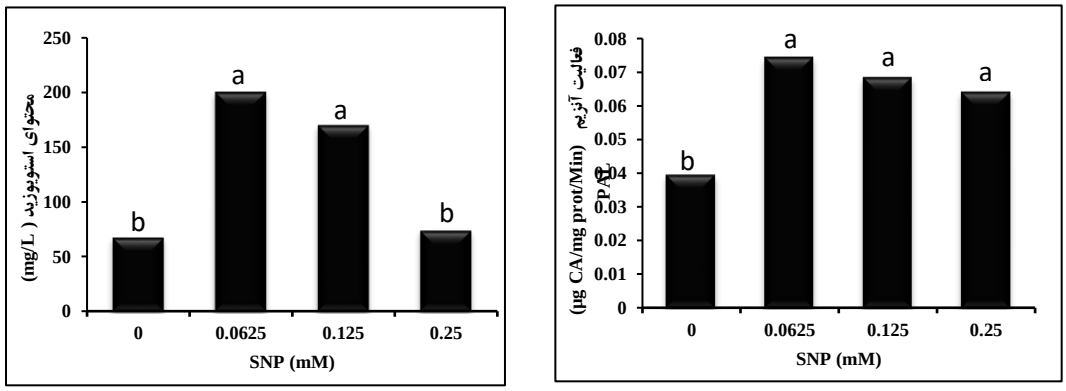
٤. بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق مشاهده گردید که در غلظت‌های بالاتر نیتریک اکسید، رشد گیاهچه‌ها کاهش یافت. گزارش‌هایی در خصوص چنین تاثیری از نیتریک اکسید بر گیاهان وجود دارد. به عنوان مثال نشان داده شد که نیتریک اکسید میزان رشد و پروتیین را در گیاهچه‌های بادرنجبویه کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای کاهش داد (اسماعیل‌زاده بهابادی و همکاران، ۱۹۹۴). نشان داده شد که بیوسنتز رنگیزه های فتوسنتزی تحت اثر نیتریک اکسید کاهش یافت. هماهنگ با این مشاهده، هونگ و همکاران (Wang et al., 2022) کاهش فتوسنتز و تجمع چنین رنگیزه هایی را در مرحله رویشی گوجه فرنگی تحت تاثیر نیتریک اکسید گزارش کردند. مطالعه روی گیاه گوجه فرنگی نشان داد که تیمار ۱ مولار SNP رشد گیاه را مهار کرد، که می تواند نتیجه غلظت فوق بهینه SNP (Hayat et al., 2010) باشد، در حالی که ۲۰۰ میکرومولار SNP و ۱ مولار GSNO اثر منفی بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل نشان دادند (Wodala et al., 2010).

اثر نیتریک اکسید بر ظرفیت انتی اکسیدانی با توجه به غلظت آن متفاوت بود، بطوریکه در غلظت پایین باعث افزایش و در غلظت‌های بالا باعث کاهش آن گردید. در این راستا گزارش گردید که NO با افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی میتوکندریایی، حذف ROS اضافی را بهبود بخشیده، سطح پراکسیداسیون لیپیدی غشای میتوکندریایی را کاهش داده و بدین ترتیب عملکرد فیزیولوژیکی طبیعی میتوکندری حفظ شده و در نتیجه آن از وقوع مرگ برنامه ریزی شده سلولی جلوگیری گردید (He et al. 2019).



شکل ۱. اثر نیتریک اکسید بر میزان رشد، کلروفیل کل، کاروتنویید و ظرفیت آنتی اکسیدانی در گیاهچه‌های استویا. مقایسه میانگین به روش دانکن و مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار میباشد.



شکل ۲. اثر نیتریک اکسید بر میزان فعالیت PAL و استویوزید در گیاهچه‌های استویا. مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن و مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار می‌باشد.

در این تحقیق مشاهده گردید که نیتریک اکسید در کلیه غلظت‌ها فعالیت انزیم PAL را افزایش داد. همانند این یافته گزارش گردید که نیتریک اکسید در تقویت بهبود زخم و افزایش فعالیت آنزیم‌های PAL، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز موثر بود (Yin et al. 2012). همچنین نیتریک اکسید سبب افزایش معنی‌دار در تولید استویوزید در نمونه‌های تیمار شده نسبت به شاهد شد. هماهنگ با این مشاهده، گزارش گردید که NO تولید فنل کل و فلاونوئیدها در ریشه‌های *Echinacea purpurea* (Wu et al., 2007) آرتمیزینین در ریشه‌های مویی *Artemisia annua* (Zheng

et al., 2008) و تاکسول را در سلول‌های *Taxus yunnanensis* (Wang et al., 2006) القا نمود. همچنین نیتریک اکسید تولید پریلنکینون‌ها از جمله هیپوکرلین A و السینوکروم A را در قارچ *Shiraia* افزایش داد (Ma et al., 2021). با توجه به نتایج این تحقیق بنظر می‌رسد نیتریک اکسید با القای پاسخ‌های دفاعی، باعث افزایش تولید استویوزید گردید.

منابع

اسماعیل‌زاده بهابادی، ص.، رضایی،آ.، نجفی، ش. ۱۳۹۴. اثر نیتریک اکسید بر میزان رشد و برخی شاخص‌های فیزیولوژیک گیاهچه‌های بادرنجبویه کشت شده در شرایط *In vitro* . مجله سلول و بافت. ۶(۲)، ۲۰۳-۱۹۵.

Brandle, J., Telmer, P. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. Phytochemistry. 68(14): 1855–1863 .

Duan, X., Su, X., You, Y., Qu, H., Li, Y., Jiang, Y. 2007. Effect of nitric oxide on pericarp browning of harvested longan fruit in relation to phenolic metabolism. Food Chemistry. 104(2): 571–576 .

Gupta, P., Sharma, S., Saxena, S. 2016. Effect of abiotic stress on growth parameters and steviol glycoside content in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) raised *in vitro*. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. 3(4): 160–167.

Hayat, S., Yadav, S., Ali, B., Ahmad, A. 2010. Interactive effect of nitric oxide and brassinosteroids on photosynthesis and the antioxidant system of *Lycopersicon esculentum*. Russian Journal of Plant Physiology. 57: 212–221.

He, H., Oo, T.L., Huang, W. 2019. Nitric oxide acts as an antioxidant and inhibits programmed cell death induced by aluminum in the root tips of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Science Report. 9: 9516.

Ma, Y.J., Li, X.P., Wang, Y., Wang, J.W. 2021. Nitric oxide donor sodium nitroprusside-induced transcriptional changes and hypocrellin biosynthesis of *Shiraia* sp. S9. Microbial Cell Factories. 20(1): 92.

Singh, S., Rao, G. 2005. Stevia: The herbal sugar of 21st Century. Sugar Technology. 7(1): 17–24.

Wang, J.W., Zheng, L.P., Wu, J.Y., Tan, R.X. 2006. Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. Nitric Oxide. 15: 351–358.

Wang, L., Lin, R., Xu, J., Song, J., Shao, S., Yu, J., Zhou, Y. 2022. High nitric oxide concentration inhibits photosynthetic pigment biosynthesis by promoting the degradation of transcription factor HY5 in tomato. International Journal of Molecular Sciences. 23(11): 6027.

Wodala, B., Ordog, A., Horvath, F. 2010. The cost and risk of using sodium nitroprusside as a NO donor in chlorophyll fluorescence experiments. Journal of Plant Physiology. 167: 1109–1111.

Wu, C.H., Tewari, R.K., Hahn, E.J., Paek, K.Y. 2007. Nitric oxide elicitation induces the accumulation of secondary metabolites and antioxidant defense in adventitious roots of *Echinacea purpurea*. Journal of Plant Biology. 50: 636–643.

Yin, J., Bai, S., Wu, F., Lu, G., Yang, H. 2012. Effect of nitric oxide on the activity of phenylalanine ammonia-lyase and antioxidative response in sweet potato root in relation to wound-healing. Postharvest Biology and Technology. 74: 125–131.

Zheng, L.P., Guo, Y.T., Wang, J.W., Tan, R.X. 2008. Nitric oxide potentiates oligosaccharide- induced artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots. Journal of Integrative Plant Biology. 50: 49–55.

Effect of nitric oxide on the growth and production of stevioside in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) plant tissue culture

[*]Mohsen Tahvildari, Ayatollah Rezaei

Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Shahid University, Tehran, Iran

Abstract

In many living systems, nitric oxide is involved in the phenomenon of signal transduction and in various physiological and pathophysiological processes, as well as the induction of the production of secondary metabolites. On the other hand, stevia plant is very important as a natural sweetener in food products, especially for overweight and diabetic people. Therefore, in this research, the effect of nitric oxide on stevia in tissue culture system was studied. The experiment was conducted in the form of a completely randomized design in 3 replications and 4 levels of sodium nitroprusside (nitric oxide producing source) with concentrations of 0, 0.0625, 0.125 and 0.25 mM. The results showed that nitric oxide caused a decrease in growth as well as the amount of total chlorophyll and carotenoids. The antioxidant capacity increased significantly with increasing nitric oxide concentration up to 0.0625 mM compared to the control, but this index decreased at higher concentrations. In all concentrations of nitric oxide, a significant increase in the activity of the phenyl-alanine-ammonialyase (PAL) enzyme was observed compared to the control culture. Also, nitric oxide at concentrations of 0.0625 and 0.125 mM caused a significant increase in the amount of stevioside in the treated samples compared to the control sample. However, no significant difference was observed in the concentration of 0.25 mM compared to the control sample. The highest stevioside content was measured by 200.7 mg/L in culture treated with 0.0625 mM nitric oxide. According to the results of the research, it seems that nitric oxide increased the production of stevioside by inducing defense responses.

Keywords: Stevia, Nitric oxide, Elicitor, Secondary metabolite, Tissue culture

[*]arezaei@shahed.ac.ir

اثرات درمانی گیاهان خانواده درمنه با تأکید بر درمان سرطان سینه

الهه زمانی[1]، کاظم کمالی علی آباد[1]*

[1] دانشجوی دکتری، گروه مدیریت مناطق خشک و بیابانی، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی ، دانشگاه یزد، یزد، ایران
[2] دانشیار گروه مدیریت مناطق خشک و بیابانی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

چکیده

سرطان یکی از کشنده‌ترین بیماری‌هاست که با افزایش صنعتی شدن جامعه، شمار ابتلا به این بیماری افزایش پیدا کرده است. سرطان سینه در بین زنان بیشترین و کشنده‌ترین نوع سرطان است. شیمی درمانی و استفاده از داروهای رایج برای درمان این بیماری، اثرات جانبی بسیاری داشته و داروهای مورد استفاده اثرات نامطلوب بر برخی بخش‌های بدن از جمله کلیه و قلب می‌گذارند. گیاهان دارویی به عنوان مواد طبیعی محسوب هستند که می‌توان با بهره‌گیری از نوع مواد مؤثره موجود در آن‌ها و به کار بردن آن‌ها در زندگی، از اثرات مفید آن‌ها استفاده کرد. اصولاً گیاهان دارویی به عنوان پیشگیری کننده و مکمل برای درمان همراه با داروهای رایج استفاده می‌شوند تا اثرات جانبی ناشی از مواد شیمیایی را از بین برده و اثرات مثبت درمان را افزایش دهند. خانواده درمنه یکی از خانواده‌های گیاهان دارویی با فواید بسیار است که مطالعاتی در رابطه با اثرات این گیاهان بر سرطان سینه انجام شده است. در این مقاله با مروری مختصر در رابطه با مواد موثره گیاهان این خانواده، برخی از پژوهش‌های انجام شده در رابطه با بررسی اثر عصاره‌های گیاهان این خانواده بر سرطان سینه بیان شده است.

واژگان کلیدی: آرتمیزیا، سرطان پستان، مواد مؤثره، متابولیت‌های ثانویه، ترکیبات فعال

ایمیل نویسنده مسئول:
kkamali@yazd.ac.ir

۱. مقدمه

سرطان یک بیماری کشنده است که سال به سال نرخ ابتلا به آن در حال افزایش است (Kamarya, Lijie, and Jinyao 2022). سرطان تکثیر کنترل نشده سلول‌هاست که در بیشتر موارد منجر به تشکیل تومورهای جامد می‌شود (Rahim et al. 2021). سرطان سینه یکی از رایج‌ترین انواع سرطان در بین زنان سراسر جهان است. در مردان یک درصد امکان ابتلا به سرطان سینه وجود دارد. سرطان سینه ۲۳ درصد از کل سرطان‌ها و ۱۳/۷ مرگ و میر ناشی از سرطان را تشکیل می‌دهد (Irani et al. 2022).

یکی از روش‌های درمان سرطان، شیمی درمانی است. میزان موفقیت شیمی درمانی بر اساس میزان پاسخ هدف بعد از شیمی درمانی، ۴۰-۲۰ درصد است. شیمی درمانی باعث ایجاد اثرات نامطلوب بر کبد، کلیه، قلب و سایر اندام‌ها می‌گردد (Sugiharto and Budijitno 2022). استفاده از داروهای شیمی درمانی رایج، باعث مهار و سرکوب سلول‌های سرطانی می‌شود اما عوارض جانبی شدیدی دارد. با وجود تمام پیشرفت‌ها در درمان سرطان، مقاومت سلول‌های سرطانی در برابر شیمی درمانی و ایجاد عوارض جانبی شدید در طول درمان، ضرورت کشف و معرفی داروهای جدید را برجسته می‌کند (Sánchez-López et al. 2019). به‌طور مثال، داروی رایج داکسوروبیسین (Doxorubicin) می‌تواند مشکلات قلبی ایجاد کرده و باعث نارسایی قلبی شوند. ترکیب عوامل شیمی درمانی با محصولات طبیعی برای درمان سلول‌های سرطانی، به عنوان یک رویکرد جدید بوده که نتایج مطالعات مختلف نیز امیدوار کننده هستند (Huang et al. 2021; Motlagh et al. 2021).

اهمیت گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها

تحقیقات زیادی در رابطه با نقش گیاهان دارویی در درمان سرطان وجود دارد. امروزه حدود ۶۰ درصد از داروهای ضد سرطانی که برای درمان سرطان استفاده می‌شوند، از منابع طبیعی به دست می‌آیند (Irani et al. 2022). طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی، حدود ۷۰ درصد از جمعیت جهان ترجیح می‌دهند از داروهای سنتی و گیاهی برای درمان بیماری‌های خود استفاده کنند. در ایران استفاده از مکمل‌های جایگزین شده طبیعی در دهه‌های گذشته به طور قابل توجهی افزایش داشته است (Ebrahimi, Teimouri, and Pooladi 2021). استفاده از داروهای گیاهی و ترکیبات جدید با سمیت، هزینه و عوارض جانبی کمتر، مورد توجه تحقیقات پزشکی در درمان سرطان است (Ehsanfar, Teimouri, and Pooladi 2020). گیاهان دارویی بسیاری در سراسر جهان وجود دارد که برای پیشگیری و درمان بیماری‌ها استفاده می‌شوند. گیاهان دارای انواع متابولیت‌های ثانویه هستند که بسیاری از آن‌ها فعالیت‌های فارماکولوژیک دارند (Mir et al. 2019; Ullah et al. 2018). درمان بر پایه محصولات طبیعی به‌عنوان یک استراتژی مهم در درمان بیماری‌ها محسوب می‌شود و گیاهان منبع بسیاری از داروهای مؤثر برای سرطان مانند پاکلیتاکسل (Paclitaxel) و وینکریستین (Vincristine) هستند (Knörr et al. 2020).

گیاهان خانواده درمنه

گیاهان خانواده آستراسه (Asteraceae) دارای تنوع مورفولوژیکی زیادی هستند و خواص متنوعی را از خود نشان می‌دهند (Kazemi, Shafiee, and Yazdiniapour 2022). Artemisia از کلمه Artemis گرفته شده است که در طب عامیانه برای بیماری‌های زنان استفاده می‌شود. این گیاه دارای حدود ۱۰۷ مترادف لاتین در وب سایت‌های معتبر است. درمنه که متشکل از گیاهان خشن و گاهاً درختچه‌ای است، به خاطر روغن‌های فرارشان شناخته می‌شوند و به‌طور گسترده در سراسر جهان مورد

استفاده قرار می‌گیرند. یکی از خصوصیات بارز این گیاهان آن است که به صورت مهاجمی رشد می‌کنند و می‌توان از قطعه کوچکی از ریزوم آن‌ها برای تکثیر استفاده کرد (Siwan, Nandave, and Nandave 2022). تاکنون بیش از ۲۰ هزار گونه درمنه در سراسر جهان شناسایی شده است که دارای خواص متفاوت ضد باکتری، ضد تومور، آنتی اکسیدان و خواص دیگر هستند. در ایران حدود ۳۴ گونه درمنه وجود دارد.

فواید درمانی درمنه

درمنه می‌تواند برای غذاهای کاربردی مختلف، لوازم آرایشی و بهداشتی، به‌عنوان دارو و برای التهابات احتمالی، به جهت اثرات آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی در برابر پیری، بیماری‌های عفونی و کاربردهای علوم غذایی، به وفور مورد استفاده قرار گیرد (Siwan et al. 2022). درمنه داری خواص باز کنندگی عروق، نرم کنندگی، رقیق کنندگی و اشتهاآور بودن است و طبع آن قابض و تلخ است. مسهل صفرا و ترشحات صفرا است که در معده جمع می‌شود. همچنین این ماده ادرارآور است و مقدار زیاد آن برای باز شدن قاعدگی مؤثر است. یکی از اثرات مهم آن، پاکسازی عروق سینه و ریه است. دافع کرم روده است و تقویت کننده معده و گوارش است. در مورد اثرات ضد توموری درمنه، اخیراً مطالعاتی صورت گرفته است.

بیشترین مواد مؤثره گیاهان درمنه

بسیاری از گیاهان خانواده درمنه دارای متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند فلاونوئیدها (flavonoid)، ابسیتین (abscitin)، کومارین (coumarin)، استروئید (steroids)، پلی اتیلن (polyethylene) و مونو و سزکویی‌ترپن (mono and sesquiterpene) هستند که خواص درمانی متفاوتی دارند (Teimouri and Pooladi 2022). این مواد به‌عنوان القا کننده آپوپتوز و مهار کننده تکثیر سلولی در انواع بدخیمی‌های سرطان پستان شناخته می‌شوند. استفاده از موادی که بتوانند مرگ آپوپتوتیک سلول‌های سرطانی را القا کنند، اکنون یکی از روش‌های حیاتی در درمان سرطان است (Ebrahimi et al. 2021).

اثر گیاه درمنه بر سرطان

آرتمیزیا ولگاریس (*Artemisia vulgaris*) به‌عنوان کمک کننده به شیمی درمانی استفاده می‌شود. این گیاه دارای اثرات سیتوتوکسیک انتخابی روی سلول‌های سرطانی است و به‌عنوان عامل کمکی در درمان سرطان عمل می‌کند (Sugiharto and Budijitno 2022).

آرتمیزینین یک ماده مؤثره موجود در گیاهان درمنه است که از انگل گرفته تا باکتری، قارچ و سلول‌های سرطانی را می‌کشد در حالیکه هیچ اثری بر روی سلول‌های سالم ندارد (Eskiler et al. 2018). آرتمتر (artemether)، آرتسونات (artesunate) و دی هیدروآرتمیزینین (dihydroartemisinin) با تنظیم مسیر سیگنال برای القای مرگ سلولی، تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن را افزایش می‌دهد. ماده آرتسونات با القای توقف سلولی در فاز G2/M، از رشد سلول‌های سرطان سینه رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 جلوگیری می‌کند. آرتمیزینین یک ماده مؤثره پرکاربرد موجود در گیاهان خانواده درمنه است. این ماده باعث سرکوب سلول‌های T-reg و افزایش ایمنی می‌گردد(Sugiharto and Budijitno 2022). پژوهش‌هایی در رابطه با اثرات این ماده روی سرطان انجام شده است. به‌طور مثال جیا و همکاران (Jia et al. 2016) با پژوهش خود به این نتیجه رسیدند که آرتمیزینین باعث مهار فاز G1 شده و گونه‌های فعال اکسیژن را افزایش می‌دهد و در نتیجه باعث فروپاشی غشای میتوکندری می‌گردد، سیتوکروم C در سیتوپلاسما آزاد شده و کاسپاز-۳ فعال می‌شود. در نتیجه گیاهان این خانواده می‌توانند

به‌عنوان عوامل کمک درمان در درمان‌های اولیه باشند. همچنین این ماده از تکثیر و القای آپوپتوز سلول‌های سرطانی سینه رده سلولی SK-BR3 جلوگیری می‌کند (Greenshields, Fernando, and Hoskin 2019). مطالعات بیان می‌کنند که ماده دی هیدروآرتمیزینین ((Dihydroartemisinin (DHA) باعث مهار بیان u-PA در سلول‌های سرطان سینه رده سلولی MDAMB-231 می‌شود (Zhu et al. 2020).

تحقیقات نشان داده است که اسانس گیاه درمنه ولگاریس (*A. vulgaris*) خاصیت ضد رگ‌زایی و آنتی اکسیدانی روی سلول‌های سرطان سینه رده سلولی MCF-7 دارد (Irani et al. 2022). استفاده از عصاره این گیاه روی سلول‌های سرطانی باعث القای آپوپتوز شده و تکثیر سلول‌های سرطانی را مهار می‌کند. لیردپراپامنگل و همکاران (Lirdprapamongkol et al. 2010) بیان نمودند که عصاره بخش‌های هوایی گیاه *A. vulgaris* باعث ایجاد سمیت در سلول‌های سرطانی MDA-MB-4 و MDA-MB-4 شده است.

گیاه درمنه گونه *A. annua* فعالیت ضد توموری امیدوار کننده‌ای را نشان داده است که فرصتی برای کشف استفاده از آن‌ها به‌عنوان عوامل درمانی یا به‌عنوان عامل شیمی درمانی فراهم می‌کند. عصاره این گیاه دارای سطح بالایی از مواد کریزوسپلنول D ((chrysosplenol D (CHD))، کاستیسین (casticin) و آرتمیزینین B (artemisinin B) است که القای آپوپتوز را در سلول‌های سرطان سینه باعث می‌شوند (Ko et al. 2020; Lang et al. 2019). کو و همکاران (Ko et al. 2016) بیان نمودند که عصاره گیاه *A. annua* باعث جلوگیری از تهاجم سلول‌های سرطان سینه رده سلولی MDA-MB-231 می‌شود. عصاره این گیاه می‌تواند بیان MMP-2 و MMP-9 را کاهش داده و با مهار مسیر کیناز تنظیم شده با سیگنال خارج سلولی، تهاجم سلول‌های سرطانی را سرکوب می‌کند (Kamarya et al. 2022).

پلسیا و همکاران (Plescia et al. 2022) بیان نمودند که عصاره گیاه *A. arborescens* باعث کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطان سینه رده سلولی MDA-MB-231 شده است. همچنین نتایج پژوهش‌های فو و همکاران (Fu et al. 2020) نشان داده است که عصاره گیاه *A. argyi* باعث القای آپوپتوز سلول‌های اپیتلیال سینه می‌شود که این عملکرد به‌وجود ماده مؤثره Jaceosidin نسبت داده می‌شود. کاظمی و همکاران (Kazemi et al. 2022) اثرات ضد سرطانی عصاره گیاه *A. kermanensis* را علیه سلول‌های سرطان سینه رده‌های سلولی CF-7، MDA-MB-213 و HUVEC بیان نمودند. نتایج آن‌ها اثرات مثبت عصاره گیاه بر سمیت سلول‌های سرطانی را نشان داد. تیموری و همکاران (Teimouri and Pooladi 2022) با انجام پژوهش خود روی سلول‌های سرطان سینه رده سلولی BRC-03 بیان نمودند که نانوذرات لیپیدی حاوی عصاره گیاه *A. absinthium* اثرات سمیت روی سلول‌های سرطانی را نشان میدهد.

۲. نتیجه گیری

گیاهان دارویی امروزه به‌عنوان عوامل درمانی یا مکمل‌های درمان به وفور توسط قشر عظیمی از جامعه مصرف می‌شوند. گیاهان خانواده درمنه، یکی از خانواده‌های گیاهی با مواد مؤثره بسیار زیاد است که این مواد مؤثره می‌توانند در درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها مؤثر باشند. امروزه بیماری‌هایی مانند سرطان به‌سرعت در حال گسترش است و در این بین سرطان سینه در زنان آمار زیادی را به‌خود اختصاص می‌دهد. بنابراین با بهره‌گیری از اثرات مفید گیاهانی مانند گیاهان خانواده آرتمیزیا می‌توان باعث بهبود شرایط درمان شده و سرعت درمان را افزایش داد.

منابع

Ebrahimi, Mahsa, Maryam Teimouri, and Mehdi Pooladi. 2021. "The Synergistic Anticancer Traits of Graphene Oxide plus Doxorubicin against BT474 and MCF7 Breast Cancer Stem Cells in Vitro." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 193(11):3586–3601.

Ehsanfar, Parya, Maryam Teimouri, and Mehdi Pooladi. 2020. "Investigating Characterizations and Antifungal Effects of Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) Loaded with Essential Oil of Citrus Aurantifolia on Isolated Malassezia Strains." *Archives of Advances in Biosciences* 11(3):43–55.

Eskiler, Gamze Guney, Gulsah Cecener, Gokhan Dikmen, Unal Egeli, and Berrin Tunca. 2018. "Solid Lipid Nanoparticles: Reversal of Tamoxifen Resistance in Breast Cancer." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 120:73–88.

Fu, Wen-Rong, Ji-Lei Chen, Xue-Yi Li, Jia-Xin Dong, and Yi Liu. 2020. "Bidirectional Regulatory Mechanisms of Jaceosidin on Mitochondria Function: Protective Effects of the Permeability Transition and Damage of Membrane Functions." *The Journal of Membrane Biology* 253:25–35.

Greenshields, Anna L., Wasundara Fernando, and David W. Hoskin. 2019. "The Anti-Malarial Drug Artesunate Causes Cell Cycle Arrest and Apoptosis of Triple-Negative MDA-MB-468 and HER2-Enriched SK-BR-3 Breast Cancer Cells." *Experimental and Molecular Pathology* 107:10–22.

Huang, Cuiyun, Shi Qiu, Xiangcheng Fan, Guangyang Jiao, Xun Zhou, Mei Sun, Nan Weng, Shouhong Gao, Xia Tao, Feng Zhang, and Wansheng Chen. 2021. "Evaluation of the Effect of Shengxian Decoction on Doxorubicin-Induced Chronic Heart Failure Model Rats and a Multicomponent Comparative Pharmacokinetic Study after Oral Administration in Normal and Model Rats." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 144:112354. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112354.

Irani, Mahjoubeh, Masoud Homayouni Tabrizi, Touran Ardalan, and Toktam Nosrat. 2022. "Artemisia Vulgaris Essential Oil Nanoemulsions (AVEO-NE), a Novel Anti-Angiogenic Agent and Safe Apoptosis Inducer in MCF-7 Human Cancer Cells." *Inorganic and Nano-Metal Chemistry* 52(3):417–28. doi: 10.1080/24701556.2021.1980022.

Jia, Jianguang, Yiyu Qin, Ligong Zhang, Chenxu Guo, Yaguo Wang, Xicheng Yue, and Jun Qian. 2016. "Artemisinin Inhibits Gallbladder Cancer Cell Lines through Triggering Cell Cycle Arrest and Apoptosis." *Molecular Medicine Reports* 13(5):4461–68.

Kamarya, Yasin, Xia Lijie, and Li Jinyao. 2022. "Chemical Constituents and Antitumor Mechanisms of Artemisia." *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* 22(10):1838–44.

Kazemi, Elahe, Fatemeh Shafiee, and Zeinab Yazdiniapour. 2022. "Cytotoxic and Apoptotic Effects of Flavonoids and a Geraniol Derivative from Artemisia Kermanensis on Normal and Breast Cancer Cell Lines." *Research Journal of Pharmacognosy* 9(3):61–69. doi: 10.22127/rjp.2022.316551.1814.

Knörr, Fabian, Laurence Brugières, Marta Pillon, Martin Zimmermann, Stephanie Ruf, Andishe Attarbaschi, Karin Mellgren, G. Amos A. Burke, Anne Uyttebroeck, Grażyna Wróbel, Auke Beishuizen, Nathalie Aladjidi, Alfred Reiter, and Wilhelm Woessmann. 2020. "Stem Cell Transplantation and Vinblastine Monotherapy for Relapsed Pediatric Anaplastic Large Cell Lymphoma: Results of the International, Prospective ALCL-Relapse Trial." *Journal of Clinical Oncology* 38(34):3999–4009. doi: 10.1200/JCO.20.00157.

Ko, Young Shin, Eun Joo Jung, Se-il Go, Bae Kwon Jeong, Gon Sup Kim, Jin-Myung Jung, Soon Chan Hong, Choong Won Kim, Hye Jung Kim, and Won Sup Lee. 2020. "Polyphenols Extracted from Artemisia Annua L. Exhibit Anti-Cancer Effects on Radio-Resistant MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells by Suppressing Stem Cell Phenotype, β-Catenin, and MMP-9." *Molecules* 25(8):1916. doi: 10.3390/molecules25081916.

Ko, Young Shin, Won Sup Lee, Radha Panchanathan, Young Nak Joo, Yung Hyun Choi, Gon Sup Kim, Jin-Myung Jung, Chung Ho Ryu, Sung Chul Shin, and Hye Jung Kim. 2016. "Polyphenols from Artemisia Annua L Inhibit Adhesion and EMT of Highly Metastatic Breast Cancer Cells MDA-MB-231." *Phytotherapy Research* 30(7):1180–88.

Lang, Sophia J., Michael Schmiech, Susanne Hafner, Christian Paetz, Carmen Steinborn, Roman Huber, Menna el Gaafary, Katharina Werner, Christoph Q. Schmidt, Tatiana Syrovets, and Thomas Simmet. 2019. "Antitumor Activity of an Artemisia Annua Herbal Preparation and Identification of Active Ingredients." *Phytomedicine* 62:152962. doi: 10.1016/j.phymed.2019.152962.

Lirdprapamongkol, Kriengsak, Hiroaki Sakurai, Shunsuke Suzuki, Keiichi Koizumi, Orawin Prangsaengtong, Amornrat Viriyaroj, Somsak Ruchirawat, Jisnuson Svasti, and Ikuo Saiki. 2010. "Vanillin Enhances TRAIL-Induced Apoptosis in Cancer Cells through Inhibition of NF-KB Activation." *In Vivo* 24(4):501–6.

Mir, Numra Tariq, Uzma Saleem, Fareeha Anwar, Bashir Ahmad, Izhar Ullah, Sundas Hira, Tariq Ismail, Tahir Ali, and Muhammad Ayaz. 2019. "Lawsonia Inermis Markedly Improves Cognitive Functions in Animal Models and Modulate Oxidative Stress Markers in the Brain." *Medicina* 55(5):192. doi: 10.3390/medicina55050192.

Motlagh, Parisa Esmaili, Arefeh Ghafari Novin, Fatemeh Ghahari, Amin Nikzad, Mohadeseh Khoshandam, Saba Mardani, Hashem Khanbabaei, Alireza Farsinejad, Thozhukat Sathyapalan, Amirhossein Sahebkar, and Hossein Pourghadamyari. 2021. "Evaluation of the Effect of Crocin on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1328:143–53. doi: 10.1007/978-3-030-73234-9_10/FIGURES/5.

Plescia, Fabiana, Fabio Venturella, Marianna Lauricella, Valentina Catania, Giulia Polito, Domenico Schillaci, Antonio Palumbo Piccionello, Daidone Giuseppe, Antonella D'Anneo, and Demetrio Raffa. 2022. "Chemical Composition, Cytotoxic Effects, Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Artemisia Arborescens (Vaill.) L. Growing Wild in the Province of Agrigento, Sicily, Italy." *Plant Biosystems* 156(6):1336–45. doi: 10.1080/11263504.2022.2048276.

Rahim, Shebeer A., T. T. Nikhil, M. A. Joseph, and T. Hanas. 2021. "In Vitro Degradation and Mechanical Behaviour of Calcium Phosphate Coated Mg-Ca Alloy." *Materials Technology* 36(12):738–46.

Sánchez-López, Elena, Mariana Guerra, João Dias-Ferreira, Ana Lopez-Machado, Miren Ettcheto, Amanda Cano, Marta Espina, Antoni Camins, Maria Luisa Garcia, and Eliana B. Souto. 2019. "Current Applications of Nanoemulsions in Cancer Therapeutics." *Nanomaterials* 9(6):821.

Siwan, Deepali, Dipali Nandave, and Mukesh Nandave. 2022. "Artemisia Vulgaris Linn: An Updated Review on Its Multiple Biological Activities." *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* 8(1). doi: 10.1186/s43094-022-00436-2.

Sugiharto, Jonathan, and Selamat Budijitno. 2022. "Effects of Artemisia Vulgaris Extract on Apoptotic Index and Caspase-8." *Bioscientia Medicina: Journal of Biomedicine and Translational Research* 6(4):1636–40.

Teimouri, Maryam, and Mehdi Pooladi. 2022. "Toxicity Effects of Lipid Nanoparticles Containing Artemisia Absinthium L Essential Oil on BRC-03 Breast Cancer Cell Line." *Journal of Advanced Biomedical Sciences*. doi: 10.18502/jabs.v12i1.8870.

Ullah, Ihsan, Fazal Subhan, Javaid Alam, Muhammad Shahid, and Muhammad Ayaz. 2018. "Suppression of Cisplatin-Induced Vomiting by Cannabis Sativa in Pigeons: Neurochemical Evidences." *Frontiers in Pharmacology* 9. doi: 10.3389/fphar.2018.00231.

Zhu, Lili, Xinhuan Chen, Yanyan Zhu, Jiace Qin, Tingting Niu, Yongwei Ding, Yang Xiao, Yanan Jiang, Kangdong Liu, and Jing Lu. 2020. "Dihydroartemisinin Inhibits the Proliferation of Esophageal

Squamous Cell Carcinoma Partially by Targeting AKT1 and P70S6K.” *Frontiers in Pharmacology* 11:587470.

Therapeutic effects of Artemisia with emphasis on breast cancer treatment

[*]Elaheh Zamani[1], Kazem Kamali Aliabad[2]

[1] Ph.D. Student, Department of Arid Land and Desert Management, Natural Resources Faculty, Yazd University, Yazd, Iran
[2] Assistant professor of soil science department, faculty of agriculture, natural resources and desertification, Yazd University, Yazd, Iran

Abstract

Cancer is one of the deadliest diseases, and its prevalence has increased as society has industrialized. Breast cancer is the most common and deadly type of cancer among women. Chemotherapy and the use of common drugs to treat this disease have many side effects, and the drugs used have adverse effects on some parts of the body, including the kidney and heart. Medicinal plants are considered natural substances that can be used for their beneficial effects by using the types of effective substances in them and using them in life. Basically, medicinal plants are used as preventives and supplements for treatment along with common drugs to eliminate the side effects caused by chemical substances and increase the positive effects of treatment. Artemisia is one of the medicinal plant families with many benefits, and studies have been conducted on the effects of these plants on breast cancer. In this article, with a brief overview of the effective ingredients of this family of plants, some of the research conducted on the effects of plant extracts from this family on breast cancer is stated.

Keywords: Artemisia, breast cancer, active substances, secondary metabolites, active compounds

[*] kkamali@yazd.ac.ir

ارتباط طبیعت گیاهان دارویی با بیماری ها(به عنوان مثال کلیه)

فاطمه ربیع زاده*

[۱] گروه زیست شناسی، استادیار پردیس فرزانگان، دانشگاه سمنان، ایران

چکیده

بیان گیاهان دارویی مفید برای کلیه که در مخزن الادویه ذکر شده است با مزاج و ترکیبات شیمیایی و ارتباط بین آنها بررسی گردید. گیاهان دارویی طب سنتی مفید برای کلیه و مزاج آنها از کتاب مخزن الادویه استخراج و ترکیبات شیمیایی هر کدام از گیاهان مقالات مربوطه بررسی شد .ارتباط بین مزاج کلیه و گیاهان مفید و ترکیبات شیمیایی با استفاده از محاسبات آماری و گرافیک نشان داده شد. فهرستی از گیاهان دارویی طب سنتی ایران مفید کلیه و مزاج آنها و ترکیبات شیمیایی اصلی که در همه گیاهان بیشترین وجود دارد، ارائه شده است .پنج ترکیب مهم شناسایی شده در این تحقیق عبارتند از: پینن، کاریوفیلن، لیمونن، کامفن و فلاونوئیدها .اکثر گیاهانی که حاوی این ترکیبات شیمیایی موثره اصلی هستند دارای مزاج گرم و خشک (۷۰ تا ۱۰۰٪) و کمترین آنها مزاج گرم و مرطوب (۴ تا ۵٪) دارند .این ترکیبات شیمیایی موثره و مزاج گیاهان و کلیه رابطه نزدیکی وجود دارد .شناسایی ترکیبات شیمیایی موثره اصلی گیاهان دارویی طب سنتی ایران مفید کلیه، راه جدیدی را برای تولید داروهای مفید برای بیماری های کلیوی می گشاید.

واژگان کلیدی: کلیه، گیاهان دارویی طب سنتی، طبع، ترکیب شیمیایی

* E-mail: f.rabizade@semnan.ac.ir

۱. مقدمه

بیماری های کلیوی اغلب به آرامی پیشرفت می کنند. بنابراین قبل از ایجاد هر گونه شکایتی باعث اختلال در قسمت بزرگی از عملکرد کلیه می شوند و گاهی افراد مبتلا به بیماری شدید کلیوی نیز هیچ علامتی ندارند (Arzani, 1992).

بنابراین کلیه را می توان به عنوان اعضای اصلی (قلب، کبد و مغز) مانند برخی از حکیمان طب قدیم توجیه کرد. از سوی دیگر عناوین بیماری کلیوی در گیاهان دارویی طب سنتی ایران گسترده است. مانند: بیماری کلیه و ضعف آن، آتروفی و جرب، زخم و تورژی، سنگ کلیه، دیابت و غیره (Aghili Khorasani, 1992).

درمان این بیماری ها به طور گسترده در ادبیات طب سنتی توضیح داده شده است. یکی از درمان های مهم استفاده از گیاهان دارویی است. مخزن الادویه کتابی است که در میان منابع دیگر گیاهان دارویی را به طور کامل شرح می دهد. کتاب مخزن الادویه که توسط محمدحسین عقیلی خراسانی طبیب بزرگ قرن دوازدهم تألیف شده است کتابی است دایره المعارف غذا و طب سنتی و یکی از مفصل ترین و شناخته شده ترین و همچنین معتبرترین کتب در زمینه دانش پزشکی مواد سنتی که در اختیار دانشجویان علوم پزشکی قرار گرفته است. نویسنده از ده ها کتاب گیاهان دارویی طب سنتی ایران استفاده کرده است که به طور مکرر به آنها مراجعه می کند و بیان تجربیات خود و معلمانش برای آن منحصر به فرد است.

از سوی دیگر، مؤلف صرفاً بدون تحقیق به نقل و تقلید نمی‌پردازد، بلکه گاه به نقد سخنان بزرگان نیز احترام می‌گذارد.

همه این جنبه ها باعث می شود این کتاب برای بسیاری از پزشکان پس از او مفید باشد و هنوز هم یکی از منابع معتبر گیاه شناسی است.

این مقاله به معرفی گیاهان دارویی مفید کلیه که در مخزن الادویه اشاره شده است می پردازد و رابطه بین گیاهان و خواص دارویی آنها را مطالعه کنید. این رابطه می تواند به پزشکی فعلی در شناسایی سایر گیاهان مفید برای کلیه کمک کند. ذکر این نکته ضروری است که نام گیاهان قدیمی با نام علمی و خانواده دقیق ذکر شده است.

۲. مواد و روش‌ها

در این بررسی فهرستی از گیاهان دارویی سنتی کلیه از مخزن الدویه تهیه شده است. برای شناسایی نام علمی و خانواده این گیاهان از دو کتاب «مطابق نام گیاهان دارویی با نام های علمی»(Ghahraman & Okhovat , 2017) و «شرح تطبیقی گیاهان دارویی کهن »(Ghahraman & Okhovat , 2009) استفاده شد.

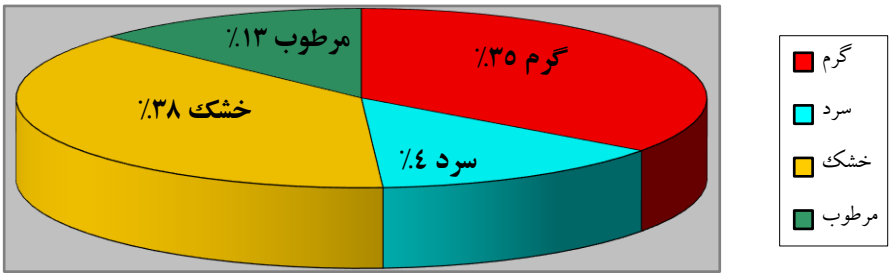
گیاهان مورد تجزیه و تحلیل ترکیبات شیمیایی موثره توسط مقالات و کتاب گیاهان دارویی مشخص شدند و از میان آنها که بیشترین درصد را در گیاهان دارویی مربوط به کلیه داشته اند با استفاده از محاسبات آماری ارائه شده است.

۳. نتایج

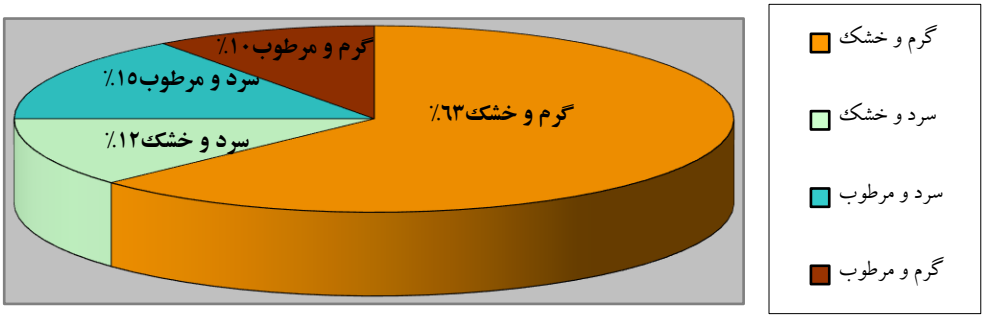
نتایج حاصل از بررسی گیاهان دارویی طب سنتی ایران از کتب نسخ مخزن الادویه نشان داد که ۴۳ خانواده مفید برای کلیه معرفی شده اند و مهم ترین خانواده ها عبارتند از: Apiaceae (۷ مورد)، Fabaceae (۵ مورد)، Asteraceae (۴ مورد)، Lamiaceae (۴ مورد)، Lauraceae (۳ مورد)، Anacardiaceae (۲ مورد) ، Araceae (۲ مورد)، Liliaceae (۲ مورد)،

Malvacea (۲ مورد)، Moraceae (۲ مورد)، Piperaceae (۲ مورد)، Primulaceae (۲ مورد)، Rosaceae (۲ مورد)، Valerianacea (۲ مورد).

درصد طبیعت گیاهان دارویی مفید کلیه در نمودار (۱) و (۲) نشان داده شده است.

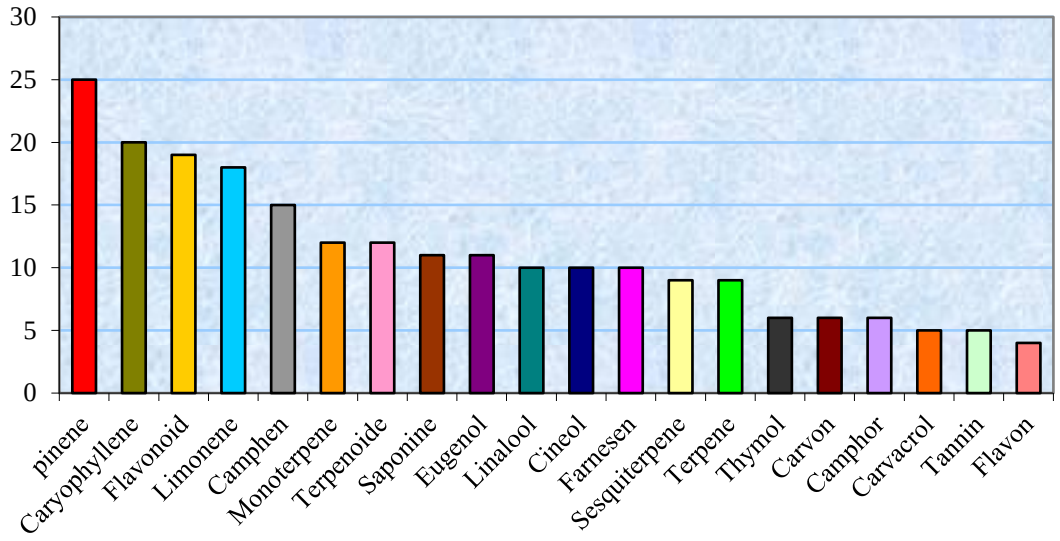


نمودار (۱): درصد گیاهان مفید برای بیماری کلیه با طبیعت مفرد



نمودار (۲): درصد گیاهان مفید برای بیماری کلیه با طبیعت مرکب

با بررسی مواد فیتوشیمی گیاهان مفید کلیه با استفاده از منابع علمی جدید درصدی از ترکیبات شیمیایی موجود در این گیاهان در نمودار ۳ نمایش داده شده است.



نمودار ۳: بیست مورد از رایج ترین ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان مفید کلیه
(Wei Deng, 2010; Sharif, 2018)

از بین مواد موثره های موجود در گیاهان دارویی طب سنتی ایران مفید کلیه پنج ترکیب شیمیایی که بالاترین درصد را در بین سایر اجزا دارند، انتخاب شده اند.

جدول (۱): ترکیب شیمیایی در ارتباط با و درصد مزاج گیاه حاوی آنها

تعداد	ترکیب شیمیایی	درصد گیاهانی که این ترکیب را داشته اند	طبیعت گیاهان حاوی این ترکیبات شیمیایی
۱	Pinene	٪۲۵	گرم و خشک : ٪۸۶ ؛ سرد و خشک: ٪۷؛ سرد و تر:٪۴؛گرم و تر:٪۴
۲	Caryophyllene	٪۲۰	گرم و خشک : ٪۸۳؛ سرد و خشک: ٪۵؛ سرد و تر:٪۵؛گرم و تر:٪۷
۳	Flavonoid	٪۱۹	گرم و خشک : ٪۷۷؛ سرد و خشک: ٪۱۴؛ سرد و تر:٪۵؛گرم و تر:٪۵

۴	Limonene	٪۱۸	گرم و خشک : ٪۹۵؛ سرد و خشک: ٪۵؛ سرد و تر:٪۰؛ گرم و تر:٪۰
۵	Camphen	٪۱۵	گرم و خشک : ٪۱۰۰؛ سرد و خشک: ٪۰؛ سرد و تر:٪۰؛گرم و تر:٪۰

براساس نتایج حاصل از جدول ۱، بیشترین درصد گیاهان دارای بیشترین درصد ترکیب شیمیایی در گیاهان مزاج گرم و خشک مشاهده شدند(۷۰ ٪ تا ۱۰۰٪) و کمترین درصد مربوط به مزاج گرم و مرطوب است. (۴٪-۵٪)

٤. بحث و نتیجه‌گیری

از آنجایی که طبیعت کلیه "گرم و مرطوب" است، مقایسه درصد طبیعت های مفرد و مرکب گیاهان مفید برای کلیه به این نتیجه می رسد که: گیاهان مناسب کلیه دارای طبیعت مفرد "گرم" یا طبیعت مرکب "گرم و خشک" است.

طبق جدول ۱، بیشترین درصد گیاهان دارای بیشترین درصد ترکیبات موثره شیمیایی دارای مزاج گرم و خشک هستند. بنابراین احتمالاً ترکیبات شیمیایی معرفی شده دارای مزاج گرم و خشک هستند و همچنین گیاهان دارویی با این طبیعت برای کلیه مفید است.

گیاهان دارویی مفید برای بیماری کلیوی در منابع فعلی دارای گیاهان مشترک با گیاهان دارویی طب سنتی ایران بودند. این گیاهان رایج به شرح زیر است:

Cyperus rotundus، *Capparis spinosa*، *Asparagus officinalis*، *Carum carvi*، *Allium sativum*، *Allium cepa*، *Capparis spinosa Linum usitatisimum*، *Ajuga iva*، *Glycyrrhiza glabra*، *Alhagi maurorum*، *Trigonella foenum- graecum*، *Betacumine vulanis* است.

گیاهانی که هم در منابع سنتی و هم در منابع جدید هستند ممکن است عملکرد بهتری برای درمان بیماری کلیوی داشته باشند.

اگرچه تمام ترکیبات موثره شیمیایی در اینجا ذکر نشده است و تنها ترکیباتی معرفی شده اند که بیشترین وجود را در گیاهان دارویی دارند. اما سعی شده است مدل خوبی برای معرفی ترکیبات موثره شیمیایی ارائه دهد. مدلی که می تواند ما را به شناسایی گیاهان مفید ناشناخته برای اندام مربوطه با استفاده از ترکیبات موثره شیمیایی سوق دهد. به عنوان مثال در این مطالعه ساپونین به عنوان یک ترکیب موثره شیمیایی مفید برای کلیه شناسایی شده است که گیاه *Cyperus rotundus* حاوی این ترکیب موثره شیمیایی است.

در حالی که بالاترین سطح ساپونین در *Saponaria mesogitana* است. بنابراین با شناسایی ترکیبات موثره شیمیایی مفید می توان برای درمان بیماری های کلیوی به جای گیاهان دارویی سنتی استفاده کرد.

منابع

Aghili Khorasani MH.1992. Makhzan al Adviyah.Islamic Revolution's Publications and training Press. Tehran.

Arzani MA. 1992.Tebb-e-akbari. Institute of Medical History, Islamic and Complementary Medicine, Iran University of Medical Sciences. Tehran.

Fang, R., C. Hong Jiang, X. Yi Wang, H. Ming Zhang, Z. Long Liu, L. Zhou,

Ghahraman A., Okhovat AR., 2017.Comparative description of ancient herbs. Tehran University Publications. Tehran.

Ghahraman A., Okhovat AR., 2009.Matching names of ancient herbs, with scientific names. Tehran University Publications. Tehran.

Wei Deng S. Sh. Du, Z., 2010. Insecticidal Activity of Essential Oil of Carum Carvi Fruits from China and Its Main Components against Two Grain Storage Insects. Molecules, 15, 9391-9402; doi:10.3390.

Sharif M. Al-Reza, R. Atiqur, L. Jonghwi, K. Sun Chul, 2018. Potential roles of essential oil and organic extracts of Zizyphus jujube. Food Chemistry 119, 981–986

The relationship between the nature of medicinal plants and diseases (For example, kidney)

Fatemeh Rabizadeh*

[1] Department of Biology, Farzanegan Campus, Semnan University, Semnan, Iran.

Abstract

The expression of medicinal plants useful for kidneys mentioned in Makhzan al-Adviyah repository was investigated with temperament and chemical compounds and the relationship between them. Medicinal plants of traditional medicine useful for kidneys and their temperament were extracted from the book " Makhzan al-Adviyah" and the chemical compositions of each of the plants in the relevant articles were examined. The relationship between kidney temperament and useful plants and chemical compounds was shown using statistical and graphic calculations. A list of herbal medicinal plants of Iran's traditional medicine useful for kidney and temperament and the main chemical compounds that are most present in all herbs are provided. Five important compounds identified in this research are: pinene, caryophyllene, limonene, camphene and flavonoids. Most of the plants that contain these main effective chemical compounds have hot and dry temperament (70 to 100%) and the least of them have hot and humid temperament (4 to 5%). These chemical compounds are effective and the temperament of plants and all are closely related. Identifying the main effective chemical compounds of Iranian traditional medicine medicinal plants useful for kidney opens a new way to produce useful drugs for kidney diseases.

Keywords: Kidney, medicinal plants of traditional medicine, nature, chemical composition

* E-mail: f.rabizade@semnan.ac.ir

ارزیابی گیاه دارویی بادرشبو (رقم بومی مراغه) از لحاظ فعالیت سوپراکسید دسموتاز تحت تنش شوری

سعیده یوسف پور[1]*، علیرضا پورمحمد[1]، محمدرضا مرشد لو[2]

[1]گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه

[2]گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه

چکیده

به منظور بررسی تأثیر شوری، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی گروه مهندسی تولید وژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه در سال ۱۴۰۰ اجرا شد. سطوح شوری شامل سه سطح ۱۵۰، ۷۵ و صفر (شاهد) میلی‌مولار NaCl روی رقم بومی بادرشبو اعمال گردید. بعد از اعمال شوری، نمونه‌های برگی در مرحله برداشت جمع‌آوری شدند و در آزمایشگاه فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز (SOD) مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه واریانس نشان داد که بین سطوح شوری برای فعالیت SOD اختلاف معنی‌دار وجود داشت. با افزایش شوری، میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی سوپراکسید دسموتاز افزایش یافت و بیشترین فعالیت آنزیمی، در ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم حاصل شد که تفاوت معنی داری با ۷۵ میلی مولار نداشت و کمترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید در سطح شاهد به دست آمد. می‌توان نتیجه گرفت که شوری، فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دسموتاز را در رقم بومی بادرشبو تحت تاثیر قرار می‌دهد و رقم بومی بادرشبو برای سطوح شوری اعمال شده دارای تحمل نسبی می‌باشد که از آن می‌توان در اهداف اصلاحی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: آنزیم، آنتی اکسیدان، تجزیه واریانس

* E-mail: s.yoosefpoor@yahoo.com

۱. مقدمه

گیاه بادرشبو (*Dracocephalum moldavica*)، متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae)گیاهی علفی، بومی آسیای مرکزی و اهلی شده در مرکز و شرق اروپا است که می‌باشد . (کمالی زاده و همکاران، ۱۳۹۴). اسانس آن دارای خاصیت ضدباکتریایی بوده و برای مداوای دل‌درد و نفخ شکم و همچنین در صنایع غذایی، نوشابه‌سازی و صنایع بهداشتی و آرایشی مورد استفاده قرار می گیرد (امیدبیگی، ۱۳۷۶). گل و اندام‌های رویشی بادرشبو (برگ‌ها و ساقه‌ها) دارای بیشترین درصد اسانس می-باشند. (Abd El-Baky and El-Baroty, 2008).

گیاهان دارویی از لحاظ تحمل نسبت به املاح تجمع یافته در محیط ریشه تا حدود زیادی باهم تفاوت دارند که به عواملی مانند میزان تجمع یون‌ها در بافت، ممانعت از ورود برخی یون‌ها عمدتا پتاسیم به درون بافت و قابلیت تولید تنظیم کننده‌های اسمزی بستگی دارد (امید بیگی، ۱۳۷۶).

۲. مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تأثیر شوری، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه در سال ۱۴۰۰ اجرا شد. سطوح شوری شامل سه سطح ۱۵۰، ۷۵ و صفر (شاهد) میلی‌مولار NaCl روی رقم بومی بادرشبو اعمال گردید. ابتدا بذور سالم در گلدان‌هایی از جنس پلاستیک با قطر دهانه ۳۰ سانتیمتر و ارتفاع ۳۰ سانتیمتر و دارای زهکشی مناسب به صورت کپه‌ای و در چهار نقطه از خاک گلدان کاشته شد. پس از سبز شدن بذور در مرحله دو برگی، تنک کردن صورت گرفت به طوری که در هر نقطه یک گیاهچه سالم (پنج بوته در هر گلدان) از بین آن‌ها باقی ماند. با استقرار کامل گیاه، در مرحله شش برگی آبیاری با آب شور هر دو روز یکبار انجام شد. نمونه‌های برگی در مرحله برداشت جمع‌آوری شدند و ابتدا عصاره پروتئینی استخراج شد و فعالیت آنتی اکسیدانی سوپراکسید دسموتاز با استفاده از روش سان و همکاران (۲۰۱۸) تعیین شد. برای انجام تجزیه واریانس از نرم افزار آماری SPSS استفاده شد.

۳. نتایج

همانطوری که در جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) مشاهده می‌شود تاثیر شوری روی فعالیت آنتی اکسیدانی سوپراکسید دسموتاز در رقم بومی گیاه دارویی بادرشبو معنی‌دار بود. می‌توان نتیجه گرفت که شوری، فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دسموتاز را در رقم بومی بادرشبو تغییر نمی‌دهد. به عبارت دیگر رقم بومی بادرشبو برای سطوح شوری اعمال شده دارای تحمل نسبی می‌باشد که از آن می‌توان در اهداف اصلاحی استفاده کرد.

جدول ۱- تجزیه واریانس فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دسموتاز در رقم بومی بادرشبو

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۲	۰/۸۹۸**
خطا	٦	۰/۷۲

** معنی دار در سطح احتمال یک درصد

با افزایش میزان تنش شوری میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی سوپراکسید دسموتاز افزایش یافت و بیشترین فعالیت آنزیمی، در ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم حاصل شد که تفاوت معنی داری با ۷۵ میلی مولار نداشت و کمترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید در سطح شاهد به دست آمد (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین سطوح شوری برای فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دسموتاز

سطح شوری (mM)	SOD
صفر	۲٦/۷۵a
۷۵	۲٦/۸۷a
۱۵۰	۲۷/۷۵b

میانگین‌های دارای حداقل حرف مشترک اختلاف آماری معنی‌داری ندارند

٤. بحث

بسیاری از اثرهای تنش شوری می‌تواند منتهی به تنش اکسیداتیو شود که پراکسیداسیون لیپید و افزایش تجمع گونه های اکسیژن فعال مانند هیدروژن پراکسید و یون های سوپراکسید را در پی داشته و منجر به ایجاد آسیب پروتئین ها و لیپید و اسید نوکلئوئیک می شود (Soundararajan *et al.*, 2017) . تنش‌های اسمزی از قبیل شوری سبب تجمع غیرکنترل شده گونه های اکسیژن فعال مانند رادیکال های سوپراکسید، هیدروژن پراکسید، رادیکال های هیدرکسیل و غیره شده که باعث آسیب به کلروپلاست، برهم خوردن آرایش در غشاء و اختلال در دیگر فرایندهای فیزیولوژیکی، آسیب به DNA ، غیرفعال سازی آنزیم ها و واسرشته شدن پروتئین ها در سلول های گیاهی می شود (Hernandez Viezcas *et al.*, 2000).

منابع

امید بیگی، ر. (۱۳۷۶). رهیافت‌های تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد دوم. طراحان نشر. ۴۲۴ صفحه.

کمالی زاده، م. ، بیهمتا، م.، پیغمبری، س.ع.، و هادیان، ج. (۱۳۹۴)۱۳۹۴. اثر سطوح مختلف نانوذره دیاکسید تیتانیوم بر دو ترکیب فنلی مهم در گیاه دارویی بادرشبو. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۳۱، ۴۲۸-۴۳۵.

Abd El-Baky, H., El-Baroty, G. 2008. Chemical and biological evaluation of the essential oil of (*Dracocephalum moldavica* L.). International Journal of Integrative Biology, 3: 202-208.

Hernandez Viezcas, J.A., Jimenez, A., Mullineaux, P. and Sevilla, F., 2000. Tolerance of pea (Pisum sativum L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. Plant, Cell & Environment. 23: 853-862.

Soundararajan, P., Manivannan, A., Ko, C.H. and Jeong, B.R., 2017. Silicon enhanced redox homeostasis and protein expression to mitigate the salinity stress in Rosa hybrida 'Rock Fire'. Journal of Plant Growth Regulation, 37(1): 16-34.

Evaluation of the Moldavian balm (local variety of Maragheh) in terms of activity of the superoxide dismutase enzyme under salt stress.

, Alireza Pourmohammad[1], Mohammad Reza Morshedloo[2*]Saeedeh Yousefpour[1]

[1]Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran

[2]Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran

Abstract

For evaluation of the salinity effect, an experiment was carried out based on completely randomized design (CRD) in three replications in the Research Greenhouse of the Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Maragheh. The salinity (0, 75 and 150 mM NaCl) were imposed on the local cultivar Moldavian balm. After applying salinity, leaf samples were collected at the harvest stage and the activity of superoxide dismutase (SOD) enzyme was evaluated in the laboratory. Analysis of variance showed that there was significant difference between salinity levels for SOD activity. With increasing salinity, the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase increased and the highest enzyme activity was obtained at 150 mM NaCl, which was not significantly different with 75 mM, and the lowest level of superoxide enzyme activity was obtained at the control level. It can be concluded that salinity changed the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase in the local cultivar Moldavian balm. In other words, the local variety of Moldavian balm has relative tolerance for applied salinity levels, which can be used for improvement purposes.

Keywords: Essential oil, Dry matter, ANOVA

* s.yoosefpoor@yahoo.com

استخراج آنتوسیانین ها از میوه آلوخاکی (*Prunus salicina*) و بررسی خواص ضد میکروبی آن

فهیمه مرتاضی*، رشید جامعی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

چکیده

در این مطالعه، آنتوسیانین های استخراج شده از میوه آلوخاکی (*Prunus salicina*) توسط تکنیک‌های کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و اسپکتروفتومتری تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR) شناسایی و جداسازی شده، و سپس محتوای آنتوسیانینی آن توسط روش اختلاف pH اندازه‌گیری شد. با استفاده از روش دیسک دیفیوژن خاصیت ضد میکروبی عصاره‌ی آنتوسیانینی بر روی باکتری‌های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس ارزیابی شد. نتایج FTIR و TLC حاکی از وجود رنگیزه های آنتوسیانین در میوه آلوخاکی بود، که میزان آنتوسیانین مونومری میوه آلوخاکی (۰/۵±۲۳/۶۶) بود. علاوه بر این‌ها، نتایج بررسی خاصیت ضد باکتریایی نشان داد میوه‌ی آلوخاکی داری خاصیت ضد میکروبی در برابر باکتری‌های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس است.

واژگان کلیدی: آنتوسیانین ؛ آلوخاکی؛ تست آنتی بیوگرام؛ خاصیت ضد میکروبی

* e-mail: hobab7470@yahoo.com

۱. مقدمه

امروزه مصرف‌کنندگان به طور فزاینده ای در مورد نگهدارنده های شیمیایی در غذا نگران هستند و تمایل دارند محصولات غذایی طبیعی، ایمن و دارای مزایای سلامتی چندگانه را انتخاب کنند (Lacombe et al., 2010). همچنین بیماری‌های منتقله از غذا می‌تواند منجر به عوارض مرگ و میر بالا و خسارات اقتصادی زیادی شوند. برخی از بیماری‌های منتقله از غذا با مقاومت آنتی‌بیوتیکی مرتبط هستند که یک مشکل مهم در دنیا است. برای کاهش آسیب‌های ناشی از آنتی‌بیوتیک‌ها، یافتن جایگزین هایی که مانع از آلوده شدن مواد غذایی می‌شود مهم است (Ma et al., 2019). گیاهان به دلیل مزایای سلامتی و اثرات ضد میکروبی خود به طور فزاینده ای در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Lacombe et al., 2010).

آنتوسیانین ها، گونه ای از پلی فنل های گیاهی با خواص پاداکسایشی قوی هستند. این ترکیبات مهارکننده‌های رشد عوامل بیماری‌زا هستند (Ma et al., 2019).این رنگدانه های طبیعی در شرایط اسیدی پایدار هستند و در مقادیر pH بالاتر ناپایدار می‌شوند در نتیجه به علت تغییر رنگ با تغییر pH می‌توان مستقیماً به مواد بسته‌بندی اضافه کرد. بسته‌بندی هوشمند مواد غذایی می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد شرایط حمل و نقل و نگهداری محصولات غذایی ارائه دهد و بنابراین شاخص‌های واقعی کیفیت و ایمنی مواد غذایی را قبل از مصرف ایجاد کند (Koosha and Hamedi, 2019). همچنین ثابت شده است که آنتوسیانین ها بر رشد هر دو نوع باکتری گرم منفی (سیتروباکتر فروندی، اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا انتریکا سر. تیفی موریوم) و گرم مثبت (لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس، استافیلوکوکوس و استافیلوکوکوس آ) اثر مهاری دارند. آنتوسیانین ها می‌توانند از طریق فعل و انفعالات غشایی و درون سلولی باعث بی‌ثباتی غشای سیتوپلاسمی، نفوذپذیری غشای پلاسمایی، مهار ترشح آنزیم خارج سلولی، اثر مستقیم بر متابولیسم سلولی و جلوگیری از تحویل مواد مورد نیاز برای رشد باکتری‌ها شوند (Koosha and Hamedi, 2019).

آلو یک درخت میوه مهم متعلق به جنس Prunus از خانواده Rosaceae است (Liu et al., 2020). این میوه به طور گسترده‌ای در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی و سایر صنایع استفاده می‌شود. مزایای سلامتی متعددی در ارتباط با مصرف آلو وجود دارد، مانند اثرات ضد دیابت، محافظت قلبی، مهار چربی‌زایی و التهاب و پیشگیری از اکسیداسیون LDL. فعالیت‌های بیولوژیکی آلو عمدتاً به محتوای بالای ترکیبات فنلی آن نسبت داده شده است. محتوای پلی فنول ها در آلو از ۱۸۶/۴ میلی‌گرم تا ۳۹۱/۲ میلی‌گرم معادل اسید گالیک / (۱۰۰GAE) گرم FW متغیر است. حدود ۴۰ فنولیک منفرد به طور عمده شامل اسیدهای کلروژنیک و پروآنتوسیانیدین ها در آلو شناسایی شده است (Yu et al., 2021). آلو سرشار از آنتوسیانین است که عمدتاً سیاندار-۳- گلوکوزید و سیاندار-۳- روتینوزید است و غلظت آن‌ها در بین ارقام متفاوت است و به میوه رنگ مشخص می‌دهد. اسید کلروژنیک و نئوکلروژنیک اسید از ترکیبات فنلی اصلی هستند که تفاوت غلظت زیادی در بین ارقام دارند (Roussos et al., 2016).

عصاره برگ آلو یک جایگزین عملی به عنوان عوامل ضد باکتریایی و پاداکسایشی برای جلوگیری از خراب شدن مواد غذایی ذخیره شده توسط باکتری‌ها و اکسیداسیون است. فعالیت ضد میکروبی در برابر لیستریا اینوکوا و اشریشیا کلی تأیید و مشخص شده است که با محتوای فنلی بالا مرتبط است. آلو به عنوان یک غذای دارویی سنتی در انسان برای تقویت ایمنی در برابر عوامل عفونی و برای درمان سرطان استفاده شده است. میوه آلو یک غذای بسیار مغذی است که سرشار از ترکیبات فنلی است. همبستگی مثبتی بین محتوای فنلی کل عصاره‌های گیاهی و ظرفیت پاداکسندگی مرتبط گزارش شده است. با توجه به مشکلات و عوارض نامطلوب ناشی از مصرف افزودنی‌های شیمیایی مصنوعی، عصاره‌های طبیعی گونه‌های مختلف گیاهی مورد توجه جامعه پژوهشی قرار گرفته است. با توجه به نتایج فوق، به نظر می‌رسد که تولید پاداکسنده‌های طبیعی و بازدارنده‌های باکتریایی

از برگ آلو مهم است، و این ممکن است راه خوبی برای استفاده گسترده از منبع Prunus باشد (Delgado-Adámez et al., 2012).

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. جمع‌آوری نمونه و استخراج آنتوسیانین

میوه‌های کاملاً رسیده نمونه آلوخاکی (*Prunus salicina*) شکل(۱) در مهر ماه ۱۴۰۰ از باغات کوزه کنان جمع‌آوری و جهت شناسایی و تعیین نام علمی، شیت های هرباریومی توسط هرباریوم گروه زیست شناسی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. نمونه‌ها با آب مقطر شسته شده و پس از خشک شدن در ظروف پلاستیکی درب دار در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده منجمد و نگهداری شدند (Parisa et al., 2007).



شکل ۱. میوه آلوخاکی

جهت استخراج آنتوسیانین ، پس از برطرف شدن یخزدگی نمونه‌ها در دمای اتاق، یک کیلوگرم میوه بدون هسته همراه با مقداری از اتانول اسیدی به مدت ده دقیقه در مخلوط کن هم زده شدند. سپس به مدت سه الی چهار ساعت روی هم زن مغناطیسی قرار گرفتند. عصاره حاصل ابتدا با گاز استریل و سپس با کاغذ واتمن شماره ۱ توسط قیف بوخنر صاف شد در نهایت عصاره صاف شده توسط دستگاه تبخیر در خلاء در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد روتاری شده و تغلیظ گردید (Tan et al., 2022).

۲/۲. اندازه‌گیری محتوای آنتوسیانین با استفاده از روش اختلاف pH

جهت تعیین غلظت آنتوسیانین و آنتوسیانین مونومری از بافرهای کلرید پتاسیم با pH مساوی ۱ و استات سدیم با pH مساوی ۵ /۴ استفاده شد. به این صورت که ۱ میلی لیتر از هر بافر به همراه ۰/ ۸ میلی لیتر از آنتوسیانین های میوه آلوخاکی در لوله‌های آزمایش قرار داده شد. در ادامه محتویات هر لوله خوب هم زده شد تا رنگ محلول کاملاً یکنواخت گردد. سپس میزان جذب در طول موج ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. از داده‌های حاصل، برای تعیین غلظت آنتوسیانین و همچنین تعیین میزان آنتوسیانین مونومری کل به شرح زیر استفاده شد (Singh et al., 2022).

۳/۲. تعیین غلظت آنتوسیانین

میزان آنتوسیانین، با اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها در طول موج nm ۵۲۰ طبق معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{میزان آنتوسیانین} \quad (\text{mg/ml}) = \frac{DF(A_{pH1.0} - A_{pH4.5})}{0.577}$$

در اینجا DF (فاکتور رقت) با تقسیم حجم نهایی محلول رقیق شده بر حجم اولیه عصاره محاسبه گردید. که برای آنتوسیانین های آلوخاکی برابر با ۲/۲۵ بود. مقدار آنتوسیانین مونومری کل با اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها در دو طول موج ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر با استفاده از معادلات زیر محاسبه شد (Karaaslan et al., 2016; Wang et al., 2012).

$$\text{محتوای آنتوسیانین مونومری کل} \quad (\text{mg/kg}) = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\varepsilon}$$

$$A = (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH1.0} - (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH4.5}$$

MW (وزن مولکولی): برابر با g/mol ۴۴۹/۲

I (ضخامت سل اسپکتروفتومتر): برابر با cm ۱

ε (ضریب جذب مولار): برای آنتوسیانین سیانیدین ۳-گلوکوزید برابر با L/mol/cm ۲۶۹۰۰

عدد ۱۰۰۰ : جهت تبدیل گرم به میلی‌گرم

٤/۲. جداسازی رنگیزه های آنتوسیانین با استفاده از تکنیک TLC

جداسازی رنگیزه های آنتوسیانین با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک انجام شد. در این تکنیک از ورقه‌های سیلیکاژل TLC به عنوان سطح جاذب به شرح زیر استفاده شد. ورقه‌های سیلیکاژل TLC به صورت صفحاتی با اندازه ۲/۵×۲ سانتی‌متر برش داده شدند. لکه‌گذاری به گونه ای انجام شد که به اندازه‌ی cm ۱ از گوشه‌های کاغذ فاصله داشته باشند. همچنین دقت شد که از فاز حلال حاوی اسیدهای قوی استفاده نشود، زیرا با از بین رفتن لایه سیلیکاژل نور فلوئورسنت در دستگاه UV از ورقه ها منعکس نشده و لکه‌ها نمایان نمی‌شوند (Filip et al., 2012). سپس ورقه‌های آماده شده در داخل بشر حاوی فاز حلال به صورت عمودی قرار گرفته بعد از اتمام حرکت فاز متحرک، نمونه‌ها زیر دستگاه UV(nm ۲۸۰- ۲۶۰) گذاشته شده و لکه‌های جدا شده ظاهر شدند، که بدین ترتیب مقدار R_f (عامل احتباس) که نسبت بین مسافت طی شده توسط مولکول و حلال است اندازه‌گیری شد (Filip et al., 2012).

$$R_f = \frac{X_1}{X_2}$$

در اینجا X_1 فاصله طی شده توسط نمونه و X_2 فاصله طی شده توسط حلال می‌باشد.

برای انجام کروماتوگرافی از چندین سیستم به عنوان فاز حلال به شرح زیر تهیه و استفاده گردید:

پروپانول:اتیل استات:آب (۲:۱:۷) (Cieśla et al., 2008) /بوتانول: اسید استیک: آب مقطر(۳:۱:۱)(Fatchiyah et al., 2020) / اتانول: فرمیک اسید:اسید استیک:آب (۲۶:۱۱:۱۱:۱۰۰) (Hema et al., 2012) / هگزان: اتیل استات (۲:۲) (Yao et al., 2022) / آب: هیدروکلرویک اسید:فرمیک اسید (۲۴/۹: ۲۳/۷: ۵۱/۵) (Filip et al., 2012).

۵/۲. شناسایی آنتوسیانین با استفاده از تکنیک FTIR

برای شناسایی و تأیید وجود آنتوسیانین ها در عصاره های استخراج شده، از تکنیک FTIR که توسط دستگاه (Thermo Nicolet nexus 670, USA) انجام گرفت؛ استفاده شد. برای این منظور مقدار ۵ میلی‌گرم از عصاره های غلیظ شده، با استفاده از قرص های KBr (بروميد پتاسیم) با فشار بیش از ۱۰psi به یک دیسک نازک برای اسکن FTIR تبدیل شد.طیف ها در ناحیه طول موج cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۰۰ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

۶/۲. تست آنتی بیوگرام

بعد از ایزوله کردن باکتری‌های کشت داده شده در محیط کشت نوترینت آگار، چند کلنی را در سرم فیزیولوژیکی استریل به گونه ای حل می کنیم تا کدورت نمونه برابر با نیم مک فارلند باشد؛ به این کار در اصطلاح استاندارد نمودن تعداد باکتری می گویند زیرا تعداد کم و یا زیاد باکتری منجر به یافته های اشتباه می‌شود به همین دلیل استفاده از تعداد مناسب باکتری مورد آزمایش بسیار اهمیت دارد. پس از آماده سازی سوسپانسیون باکتری، سواپ استریل را به لوله آغشته کرده بر روی محیط مولرهینتون آگار در تمام جهات کشت داده تا در سطح پلیت کاملاً تلقیح گردند. سپس دیسک های آغشته به عصاره‌های استخراجی آلوخاکی و زالزالک را با استفاده از پنس استریل با فاصله ۲۰ میلی‌متر از لبه پلیت و ۲۵ میلی متر از یکدیگر در سطح پلیت قرار داده در انتها پلیت ها به صورت واژگون جهت جلوگیری از تعریق سطح پلیت به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انتقال گردید ومناطق مهار شده پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون مشاهده شد و نتایج ثبت شد. در این آزمایش دیسک های مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های توبرامایسین (TOB)، سیپروفلوکساسین (CP) و نیتروفورانتوئین (FM) جهت مقایسه خاصیت ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفتند. دیسک کاغذی عاری از هر گونه ماده هم به عنوان کنترل منفی استفاده شد (Mapipa et al., 2022).

۳. نتایج

۱/۳. بررسی آنتوسیانین استخراج شده

وزن جامد عصاره ی آنتوسیانینی غلیظ شده بعد از اتمام فرآیند استخراج اندازه‌گیری شد، که مقدار آن در میوه آلوخاکی۵۶/۷۲ گرم بود. نتایج حاصل از FTIR، غلظت و میزان آنتوسیانین مونومری کل و همچنین نتایج TLC آنتوسیانین ها استخراج شده از هر دو میوه به شرح زیر می باشند:

۲/۳. غلظت و میزان آنتوسیانین مونومری کل

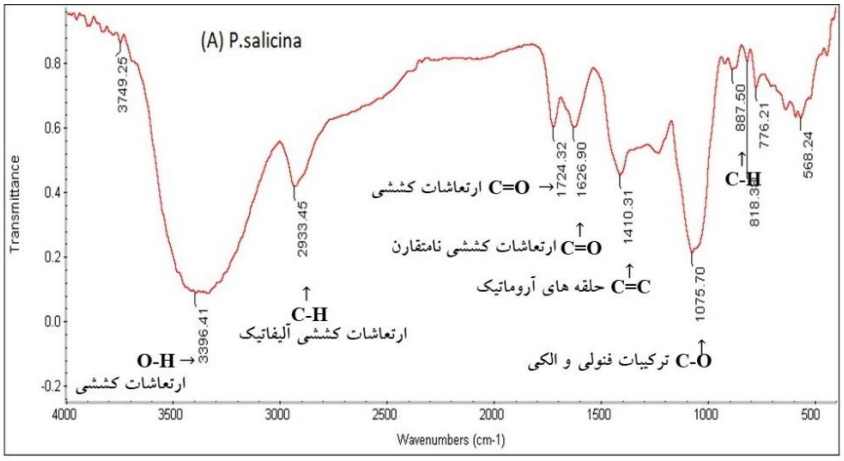
میزان غلظت و آنتوسیانین مونومری کل بر اساس آنتوسیانن سیانیدین ۳- گلوکوزید با وزن مولکولی g/mol ۴۴۹/۲ و جذب مولار L/mol/cm در میوه‌ی آلوخاکی به شرح جدول ۱ به دست آمد.

جدول ۱. غلظت و میزان آنتوسیانین مونومری کل در میوه‌ی آلوخاکی

میوه	غلظت آنتوسیانین (mg/ml)	میزان آنتوسیانین مونومری کل (mg/kg)
آلوخاکی	۲/۴۹±۰/۰۶	۲۳/۶۶±۰/۵

۳/۳. مطالعات FTIR

وجود آنتوسیانین در میوه آلوخاکی توسط تکنیک FTIR شناسایی و تأیید شد(شکل۲). طبق نتایج طیفی به دست آمده در جدول(۲) ، باند جذبی پهن در اعداد موجی cm^{-1} ۳۳۹۶ مربوط به ارتعاش کششی گروه عاملی O-H بر روی حلقه ها بوده است. باند جذبی در cm^{-1} ۲۹۳۳ را می‌توان به ارتعاشات کششی C-H های آلیفاتیک در CH2 و CH3 نسبت داد. باند جذبی در cm^{-1} ۱۷۲۴ را میتوان به ارتعاشات کششی متقارن C=O و باند جذبی cm^{-1} ۱۶۲۶ مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن C=O نسبت داد که عمدتا در فلاونویید ها وجود دارند. باند جذبی cm^{-1} ۱۴۱۰ را میتوان به ارتعاشات کششی باند دوگانه C=C در حلقه های آروماتیک نسبت داد. باند جذبی cm^{-1} ۱۰۷۵ مربوط به ارتعاشات کششی C-O در C-OH های متصل به حلقه ها در ترکیبات فنلی و الکلی نسبت داد. باند جذبی cm^{-1} ۸۸۷ را میتوان به ارتعاش خمشی C-H در موقعیت های مختلف حلقه های آروماتیک نسبت داد. بدین ترتیب وجود آنتوسیانین در عصاره استخراج شده از میوه آلوخاکی تأیید و شناسایی شد (Ghareaghajlou et al., 2022).



شکل۲. نتایج طیف های FTIR به دست آمده از عصاره ی آنتوسیانین استخراج شده از میوه آلوخاکی

جدول ۲. شناسایی و تعیین گروه های عاملی مربوط به ساختار آنتوسیانین در محدوده اعداد موجی cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۰۰ در میوه آلوخاکی

گروه های عاملی	اعداد موجی (cm^{-1})
C-H (ارتعاشات کششی)	۲۹۳۳
C=C	۱۴۱۰
C-OH	۸۸۷
C=O	۱۷۲۴
C=O (ارتعاشات کششی نامتقارن)	۱۶۲۶
O-H	۳۳۹۶
C-O	۱۰۷۵

٤/٣. رنگیزه های جداشده با تکنیک TLC

آنتوسیانین ها ترکیبات فنلی هستند که بدون مشتق سازی روی صفحه سیلیس قابل مشاهده هستند و دارای حداکثر طول موج بین ۵۰۰ تا ۵۵۰ نانومتر از طیف UV هستند به همین منظور برای مشاهده رنگیزه ها از نور UV استفاده شد (Ockun et al., 2022). بهترین فاز حلال برای جداسازی رنگیزه های آنتوسیانین در میوه آلوخاکی بوتانول:استیک اسید:آب بود، طبق شکل(۳)تعداد رنگیزه های جدا شده بر روی سطح سیلیکاژل برای میوه آلوخاکی دوعدد بود. نتایج به دست آمده از بقیه فازهای حلالی به علت جدا نشدن رنگیزه ها نامشخص بوده و یا رنگ لکه‌ها به سرعت ناپدید می شد.



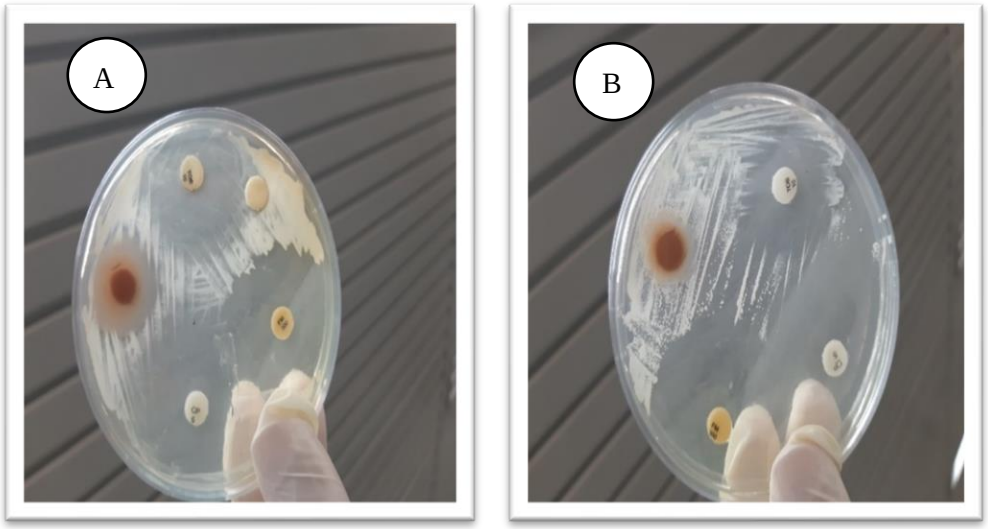
شکل۳. رنگیزه های جدا شده توسط تکنیک TLC بر روی سیلیکاژل در میوه آلوخاکی

جدول ۳. مقدار ارزش R_f رنگیزه های جدا شده در میوه ی آلوخاکی بر روی صفحات سیلیکاژل

رنگیزه های جدا شده	ارزش R_f (×۱۰۰)
باند ۱	۵۰
باند ۲	۶۲/۵

٥/٣. نتایج آزمایش بررسی خاصیت ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن

در این تحقیق اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی آنتوسیانینی میوه آلوخاکی بر روی باکتری‌های اشرشیا کلی واستافیلوکوکوس بررسی شد. عصاره آنتوسیانینی آلو خاکی ناحیه مهاری به قطر ۲۰ و ۱۴ میلی متر به ترتیب برای باکتری اشرشیا کلی واستافیلوکوکوس نشان داد. مجموعه کنترل در این آزمایش که جهت مقایسه خاصیت ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفتند دیسک های آنتی‌بیوتیکی شامل توبرامایسین (TOB)، سیپروفلوکساسین (CP) و نیتروفورانتوئین (FM) بود. که هرکدام به ترتیب ناحیه بازداری ۳۰،۲۷و۳۰ میلی متر را برای باکتری اشرشیا کلی و ۳۰،۳۰،۲۱ میلی متر را برای باکتری استافیلوکوکوس نشان دادند. با مقایسه قطر نواحی بازدارندگی دیسک های آنتی‌بیوتیکی و عصاره آنتوسیانینی مشخص شدعصاره آنتوسیانینی میوه آلوخاکی دارای پتانسیل ضد باکتریایی امیدوارکننده ای در برابر باکتری‌های اشرشیا کلی واستافیلوکوکوس است.



شکل٤. ناحیه مهاری ایجاد شده عصاره آنتوسیانین آلوخاکی در برابر (A) اشریشیا کلای و (B) استافیلوکوکوس

جدول ٤. قطر ناحیه مهار دیسک های آلوخاکی و آنتی‌بیوتیکی

دیسک	باکتری اشرشیا کلی (قطر مهار)	باکتری استافیلوکوکوس (قطر مهار)
آنتوسیانین آلوخاکی	۲۰ mm	۱۴ mm
توبرامایسین (TOB)	۲۷ mm	۲۱ mm
سیپروفلوکساسین (CP)	۳۰ mm	۳۰ mm
نیتروفورانتوئین (FM)	۳۰ mm	۳۰ mm

٤. بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق نشان داده شد که میوه آلوخاکی حاوی آنتوسیانین بوده و نتایج FTIR و TLC نشان داد که در این میوه رنگیزه آنتوسیانین وجود دارد. آنتوسیانین ها به دلیل دارا بودن خواص پاداکسندگی داری اثر ضد باکتریایی هستند که در این تحقیق مشخص شد میوه آلوخاکی دارای خاصیت ضد میکروبی بر روی باکتری‌های اشرشیا کلی واستافیلوکوکوس است.

منابع

Cieśla, Ł., Bogucka-Kocka, A., Hajnos, M., Petruczynik, A., Waksmundzka-Hajnos, M. 2008. Two-dimensional thin-layer chromatography with adsorbent gradient as a method of chromatographic fingerprinting of furanocoumarins for distinguishing selected varieties and forms of *Heracleum* spp. Journal of Chromatography A. 1207(1-2): 160-168.

Delgado-Adámez, J., Fernández-León, M.F., Velardo-Micharet, B., González-Gómez, D. 2012. In vitro assays of the antibacterial and antioxidant activity of aqueous leaf extracts from different *Prunus salicina* Lindl. cultivars. Food and Chemical Toxicology. 50(7): 2481-2486.

Fatchiyah, F., Sari, D.R.T., Safitri, A., Cairns, J.R. 2020. Phytochemical compound and nutritional value in black rice from Java Island, Indonesia. Systematic Reviews in Pharmacy. 11(7): 414-421.

Filip, M., Vlassa, M., Copaciu, F., Coman, V. 2012. Identification of anthocyanins and anthocyanidins from berry fruits by chromatographic and spectroscopic techniques to establish the juice authenticity from market. JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC. 25(6): 534-541.

Ghareaghajlou, N., Hallaj-Nezhadi, S., Ghasempour, Z. 2022. Nano-liposomal system based on lyophilization of monophase solution technique for encapsulating anthocyanin-rich extract from red cabbage. Dyes and Pigments. 202: 110263.

Hema, A., Palé, E., Duez, P., Luhmer, M., Nacro, M. 2012. Two diglucosylated anthocyanins from *Combretum paniculatum* flowers. Natural Science. 4(3): 166-169.

Karaaslan, M., Yılmaz, F. M., Karaaslan, A., Vardin, H. 2016. Synthesis and accumulation of anthocyanins in sour cherries during ripening in accordance with antioxidant capacity development and chalcone synthase expression. European Food Research and Technology. 242(2): 189-198.

Koosha, M., Hamedi, S. 2019. Intelligent Chitosan/PVA nanocomposite films containing black carrot anthocyanin and bentonite nanoclays with improved mechanical, thermal and antibacterial properties. Progress in Organic Coatings. 127: 338-347.

Lacombe, A., Wu, V.C., Tyler, S., Edwards, K. 2010. Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157: H7. International Journal of Food Microbiology. 139(1-2): 102-107.

Liu, C., Hao, J., Qiu, M., Pan, J., He, Y. 2020. Genome-wide identification and expression analysis of the MYB transcription factor in Japanese plum (*Prunus salicina*). Genomics. 112(6): 4875-4886.

Ma, Y., Ding, S., Fei, Y., Liu, G., Jang, H., Fang, J. 2019. Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens Escherichia coli and Salmonella. Food Control. 106: 106712.

Mapipa, Q., Digban, T.O., Nwodo, U.U. 2022. Antibiogram and detection of virulence genes among *Klebsiella pneumoniae* isolates from rustic hospital drains. Gene Reports. 26: 101440.

Ockun, M.A., Baranauskaite, J., Uner, B., Kan, Y., Kırmızıbekmez, H. 2022. Preparation, characterization and evaluation of liposomal-freeze dried anthocyanin-enriched *Vaccinium arctostaphylos* L. fruit extract incorporated into fast dissolving oral films. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 103428.

Parisa, S., Reza, H., Elham, G., Rashid, J. 2007. Effect of heating, UV irradiation and pH on stability of the anthocyanin copigment complex. Journal of Biological Sciences. 10: 267-272.

Roussos, P.A., Efstathios, N., Intidhar, B., Denaxa, N.K., Tsafouros, A. 2016. Plum (*Prunus domestica* L. and *P. salicina* Lindl.) in nutritional composition of fruit cultivars (ed. Simmonds, M. & Preedy, V.) 639–666.

Singh, M.C., Price, W.E., Kelso, C., Charlton, K., Probst, Y. 2022. Impact of molar absorbance on anthocyanin content of the foods. Food Chemistry. 386: 132855.

Tan, J., Han, Y., Han, B., Qi, X., Cai, X., Ge, S., Xue, H. 2022. Extraction and purification of anthocyanins: A review. Journal of Agriculture and Food Research. 100306.

Wang, Y., Chen, X., Zhang, Y., Chen, X. 2012. Antioxidant activities and major anthocyanins of myrobalan plum (*Prunus cerasifera* Ehrh.). Journal of Food Science. 77(4): C388-C393.

Yao, H., Dong, X., Xiong, H., Liu, J., Zhou, J., Ye, Y. 2022. Functional cotton fabric-based TLC-SERS matrix for rapid and sensitive detection of mixed dyes. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 121464.

Yu, J., Li, W., You, B., Yang, S., Xian, W., Deng, Y., Yang, R. 2021. Phenolic profiles, bioaccessibility and antioxidant activity of plum (*Prunus Salicina* Lindl). Food Research International. 143: 110300.

Extraction of anthocyanins from plum fruit (*Prunus salicina*) and investigation of its antimicrobial properties

, Rashid Jamei(s)[*]Fahimeh mortazi(s)

Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University

Abstract

In this study, anthocyanins extracted from plum fruit (Prunus salicina) were identified and separated by thin layer chromatography (TLC) and Fourier transform infrared spectrophotometry (FTIR) techniques, and then its anthocyanin content was measured by pH difference method. By using disk diffusion method, the antimicrobial properties of anthocyanin extract were evaluated on *Escherichia coli* and Staphylococcus bacteria. FTIR and TLC results indicated the presence of anthocyanin pigments in plum fruit, and the amount of monomeric anthocyanin in plum fruit was 23.66±0.5. In addition, the results of the investigation of antibacterial properties showed that plum fruit has antimicrobial properties against Escherichia coli and Staphylococcus bacteria.

Keywords: anthocyanin, earthen plum, Antibiogram test, antimicrobial property

[*] e-mail: hobab7470@yahoo.com

استخراج و بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس خزه *Pseudoleskeella catenulata* (Brid .ex schrad.) در ایران

امین جزعاشوری[۱] ، کاظم مهدیقلی[۲]*، راحله دوستی[۳]، مهشید مجیدی نوا[۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی علوم گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران
[۲] استادیار دانشکده زیست‌شناسی، گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران
[۳] محقق گیاهان دارویی و فیتوشیمی، دانشگاه تهران
[۴] دانشجوی کارشناسی ارشد سیستماتیک گیاهی و اکولوژی، گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران

چکیده:

خزه‌گیان، به عنوان اولین گروه از گیاهان خشکی‌زی شناخته می‌شوند. از خزه‌ها در طب سنتی برای درمان بیماری‌هایی نظیر برونشیت، ورم لوزه، سوختگی و شکستگی استخوان استفاده شده‌است. در این مطالعه به بررسی ترکیبات موجود در اسانس یک گونه خزه‌ای در ایران با نام *Pseudoleskeella catenulata (Brid .ex schrad.)* [Leskeaceae] برای اولین بار پرداخته شده‌است؛ برای تهیه‌ی اسانس این گیاه، دستگاه کلونجر و تقطیر آبی مورد استفاده قرار گرفت. ۹۳.۹۵٪ ترکیبات موجود در اسانس با۵۷ نوع ترکیب شناسایی و فراوان‌ترین ترکیب آن Anethole با فراوانی ۴۳.۸۵٪ گزارش شد. این ترکیب پیش از این در مطالعات انجام شده در خصوص جگرواش‌ها و همینطور گیاهان عالی مورد بررسی قرار گرفته بود. از Anethole در صنایع غذایی، عطرسازی و داروسازی به واسطه‌ی مزه‌ی شیرین و رایحه‌ی آن استفاده می‌شود.

واژگان کلیدی: خزه‌گیان، اسانس، تقطیرآبی، آنتول

Email: Kmahdigholi@ut.ac.ir

۱. مقدمه:

خزه‌گیان، گیاهانی بدون آوند هستند که در مقایسه با سایر گیاهان از لحاظ ترکیبات فیتوشیمیایی و مطالعات تاکسونومیک کم‌تر مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌اند. با این حال، این گیاهان تنوع قابل توجهی درمیان گیاهان بدون گل دارند؛ درمیان خزه‌گیان، شواهدی درمورد خواص ضدمیکروبی و ضد قارچی گزارش شده‌است. همچنین از این گیاهان درگذشته و در طب سنتی برای درمان برونشیت، ورم‌لوزه، سوختگی و شکستگی استخوان استفاده شده‌است (Ando,1983). طیف وسیعی از ترکیبات زیستی فعال مانند: پلی‌فنول‌ها، ترپنوئیدها ،اسیدهای آلی، قندها، الکل‌ها، اسیدهای چرب، ترکیبات آلیفاتیک، استوژنین‌ها، فنل‌کوئینون‌ها، ترکیبات آروماتیک و همچنین ترکیبات فنولی در خزه‌ها شناسایی شده‌اند (Asakawa, 1995).

خزه‌ها برای رشد و نمو خود و همچنین گسترش در رویشگاه‌های مختلف نیازمند شرایطی هستند که رطوبت محیط، از مهم‌ترین آنها به شمار می‌رود(Zare et al., 2017). جنگل‌های هیرکانی زیستگاه مناسبی برای خزه‌ها محسوب می‌شوند و به همین دلیل، در این مناطق از تنوع زیستی بالایی نیز برخوردار هستند (Naqinezhad et al., 2007). برای سازگاری با محیط و تضمین رشد، حفظ بقا و تولیدمثل، متابولیت‌های اولیه و ثانویه‌ی متنوعی در این گیاهان تکوین می‌یابند که این سازگاری با محیط در طی تکامل ایجاد شده است؛ بنابراین وجود و یا عدم وجود یک ترکیب خاص می‌تواند به عنوان ابزاری مفید برای مطالعات رده‌بندی استفاده شود (Buchanan et al., 2015). *Pseudoleskeella catenulata* از جمله‌ی گونه‌های بومی جنگل‌های هیرکانی ایران است

(Zare et al. 2017). هدف از انجام این پژوهش، استخراج و بررسی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس *Pseudoleskeella catenulata* برای اولین بار در ایران است.

۲.مواد و روش‌ها:

۲.۱. جمع‌آوری و تهیه‌ی نمونه:

نمونه‌های گیاهی از پارک جنگلی جوارم در استان مازندران و در سال ۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند؛ سپس نمونه‌ی جمع‌آوری شده توسط کلیدهای شناسایی در آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشگاه تهران شناسایی شد.

۲.۲. بررسی فیتوشیمیایی:

۲۰ گرم از نمونه ی تهیه شده پودر و سپس به مدت ۲۴ ساعت درون آب مقطر خیسانده شد. اسانس این گیاه، با استفاده از دستگاه کلونجر (متصل به منبع یخ -۱۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) و تقطیر آبی به مدت ۴ ساعت استخراج شد. پس از پایان اسانس‌گیری، با افزودن n-Hexane فاز مربوط به اسانس و آب از یکدیگر تفکیک شدند.

در نهایت این دو فاز تشکیل شده، با استفاده از سدیم سولفات آب‌گیری شد و اسانس تهیه شده درون ویالی پوشیده با فویل آلومینیومی و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد تا انجام آنالیز مربوط به گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی نگهداری شد. ترکیبات اسانس استخراج شده‌ی این گیاه با استفاده از دستگاه GC-MS مورد بررسی قرار گرفت.

۳. نتایج:

نتایج حاصل از بررسی فیتوشیمیایی:

همانطور که در جدول شماره‌ی ۱ آمده است؛ ۵۷ نوع ترکیب که نشان دهنده‌ی ۹۳.۹۵٪ کل ترکیبات موجود در اسانس این گیاه است مورد شناسایی قرار گرفت. عمده‌ترین این ترکیبات به ترتیب فراوانی شامل: (43.85%) Anethole، آلکان‌ها (28.55%)، (9.67%) Benzen 4- ethenyl 1,2 dimetoxy هستند.

شماره	RT (دقیقه)	نام ترکیب	درصد
۱	۴.۱۱۳	**Decane, 5,6-dimethyl-**	۰.۱۷
۲	۴.۲۹۱	**Heptane, 4-ethyl-**	۱.۴۴
۳	۴.۴۶۴	**Octane, 3-methyl-**	۱.۲۰
۴	۴.۹۱	**Cyclohexane, 1-ethyl-2-methyl-, trans-**	۰.۲۴
۵	۵.۲۰۹	**Nonane**	۱.۸۴
۶	۵.۴۳۴	**Pentane, 3-methyl-**	۰.۱۸
۷	۵.۸۱۲	**Cyclohexyl propionate**	۰.۲۱
۸	۵.۹۵۸	**Hexane, 2,2,5,5-tetramethyl-**	۰.۱۳
۹	۶.۱۳۱	**Cyclohexane, propyl-**	۰.۴۳
۱۰	۶.۲۴۷	**Octane, 2,6-dimethyl-**	۰.۶۴
۱۱	۶.۴۹۳	**Heptane, 3-ethyl-2-methyl-**	۰.۳۱
۱۲	۶.۹۸۱	**Decane, 2,2,8-trimethyl-**	۰.۴۱
۱۳	۷.۲۰۶	**Nonane, 4-methyl-**	۰.۳۴
۱۴	۷.۳۰۶	**Hexadecane, 3-methyl-**	۰.۳۱
۱۵	۷.۵۴۷	**Octane, 2,6-dimethyl-**	۰.۴۰
۱۶	۸.۶۵۸	Decane	۱.۵۰

۱۷	۹.۵۷۵	Decane, 4-methyl-	۰.۴۲
۱۸	۹.۸۹۵	2-Ethylthiolane, S,S-dioxide	۰.۱۴
۱۹	۱۱.۱۸۵	Hexane, 2,3,5-trimethyl-	۰.۱۵
۲۰	۱۱.۳۴۷	Decane, 2-methyl-	۰.۲۰
۲۱	۱۱.۶۲۵	Decane, 3-methyl-	۰.۱۸
۲۲	۱۲.۹۴۱	Undecane	۰.۹۳
۲۳	۱۷.۴۷	Dodecane	۰.۷۶
۲۴	۱۸.۱۴۱	Undecane, 2,6-dimethyl-	۰.۱۸
۲۵	۲۱.۵۶۹	Tetradecane	۰.۱۵
۲۶	۲۱.۷۵۸	Anisole, p-propenyl-	۴۳.۸۵
۲۷	۲۲.۵۱۲	Tridecane	۰.۶۴
۲۸	۲۶.۷۰۶	Tetradecane	۰.۴۵
۲۹	۲۸.۹۵	2-Methyldecane	۰.۲۱
۳۰	29.395	.gamma.-himachalene	۱.۴۱
۳۱	29.652	ar-Curcumene	۰.۳۱
۳۲	29.914	Decane, 2-methyl-	۰.۱۶
۳۳	30.108	Dodecane (CAS)	۰.۶۹
۳۴	30.26	Pentadecane	۰.۴۲
۳۵	30.742	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	۲.۲۰
۳۶	31.025	CIS-ISOCROWEACIN	۰.۱۹
۳۷	31.568	Undecane, 2,9-dimethyl-	۰.۳۴
۳۸	۳۳.۳۹۵	Benzene, 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)-	۱.۹۸
۳۹	۳۴.۲۸۱	(+) spathulenol	۰.۴۱
۴۰	۳۴.۴۷۵	Nonadecane, 2-methyl-	۰.۱۴
۴۱	۳۵.۷۵۹	Heneicosane	۰.۱۶
۴۲	۳۵.۸۸۵	Apiole	۱.۷۳
۴۳	36.509	Hexacosane	۰.۲۶
۴۴	36.613	Pentadecane	۱.۱۹
۴۵	36.849	Docosane	۰.۲۴
۴۶	37.803	Docosane	۰.۴۶
۴۷	38.076	(E)-1-(P-METHOXYPHENYL)-2-METHOXYETHYLENE	۰.۶۴
۴۸	39.051	Octadecane	۰.۲۹
۴۹	39.759	Isopropyl myristate	۰.۲۵
۵۰	40.162	Benzene, 4-ethenyl-1,2-dimethoxy-	۹.۶۷

۵۱	40.802	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl octyl ester	۰.۳۹
۵۲	41.541	2,6-Dimethyl-3-(methoxymethyl)-p-benzoquinone	۲.۸۳
۵۳	42.191	Heptacosane	۱.۰۳
۵۴	43.155	Dibutyl phthalate	۰.۵۰
۵۵	46.348	Heneicosane	۲.۹۹
۵۶	47.181	Tricosane	۰.۹۰
۵۷	۵۰.۴۲۱	Tricosane	۶.۱۴

بحث و نتیجه‌گیری: ٤.

تاکنون مطالعاتی درمورد ترکیبات موجود در اسانس گونه‌های مختلفی از خزه‌ها، انجام شده‌است؛ در گذشته، مطالعات درخصوص ترکیبات فرار در خزه‌ها به منظور مطالعه‌ی ترکیبات آلدهیدی و ترپنوئیدی آغاز شد. در مطالعات ابتدائی انجام شده، مشخص شد که در اسانس خزه‌ها ترکیبات ترپنوئیدی به ندرت یافت می‌شوند؛ اگرچه در مطالعات آتی انجام شده، مشخص شد که اسانس این گیاهان دارای طیف گسترده‌ای از ترکیبات ترپنی و همینطور ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک هستند (ÜÇÜNCÜ et al., 2010). با این حال طیف وسیعی از این ترکیبات فرار موجود در اسانس خزه‌ها همچنان مورد شناسایی قرار نگرفته‌اند(Valarezo et al.,2018). Anethole، دارای قابلیت نسبی انحلال در آب است، در حالیکه این قابلیت در اتانول قابل توجه‌تر می‌باشد. این ترکیب تا 13 برابر شیرین‌تر از قندها است و به دلیل رایحه‌ی مطلوب آن، در تهیه‌ی محصولاتی مانند دهانشویه‌ها و خمیرهای دندان مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ همچنین در صنایع غذایی به عنوان افزودنی در ساخت آبنبات و آدامس مورد استفاده قرار گرفته است. تاکنون مقادیر بالایی از این ترکیب درگیاهان تیره‌ی چتریان مانند رازیانه مشاهده شده‌است که از آن در طب رایج میان مردم، به عنوان یک ترکیب مدر، درمان بیماری‌های مربوط به انقباض دستگاه گوارش، قاعده‌آور و شیرآور مورد استفاده گرفته‌است(Oktay et al., 2003).

در مطالعاتی که برروی ترکیبات موجود در اسانس خزه‌های *Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp و *Leucodon sciuroides (Hedw.)* Schwagr. در ترکیه انجام شده‌است؛ به ترتیب ۷۵.۴٪ و ۸۷.۶٪ کل ترکیبات موجود در اسانس استخراجی از این گیاهان، مورد شناسایی واقع شده‌است. در این بررسی، آلکان‌ها ۱۱.۷٪ و ۱۰.۸٪ کل اسانس مربوط به این خزه‌ها را تشکیل می‌دهند (Cansu et al., 2013).

بررسی‌های انجام گرفته در خصوص ترکیبات اسانس مربوط به *Homalothecium lutescens* (Hedw.) H.Rob. منجر به شناسایی۸۴٪ کل ترکیبات موجود در اسانس این گیاه شد. ترکیبات آلکانی ۱۲٪ ترکیب این اسانس را تشکیل می‌دهند. علاوه‌براین؛ سزکوئی‌ترپن Gamma- Himachalene نیز با فراوانی ۱.۴٪ یافت شد(ÜÇÜNCÜ et al., 2010).

مطالعه‌ای که برروی ۱۲ گونه از بریوفیت‌ها در ارتفاعات کامرون مالزی انجام گرفته‌است؛ ۳۰ نوع ترکیب مختلف گزارش شده‌است. بیشتر ترکیبات فرار موجود در این گونه‌ها از آلکان‌ها و ترکیبات ترپنی تشکیل شده‌اند. در میان ۱۲ گونه‌ی مورد بررسی، *Bazzania loricata*(Reinw., Blume & Nees) Trevis. که یک جگرواش است دارای بیشترین ترکیب فرار بوده است. Anethole، تشکیل‌دهنده‌ی ۲.۵٪ محتوای اسانس استخراج شده از این جگرواش است (Koid et al., 2022).

باتوجه به مطالعات انجام شده درمورد ترکیبات موجود در اسانس خزه‌ها، Anethole برای اولین‌بار در اسانس استخراج شده از یک گونه خزه‌ی مربوط به ایران گزارش می‌شود.

منابع:

Ando, H. *China Proc Bryol Soc Jpn*, **1983**, *3*, 124.

Miller, N. G., Miller H. *Holticulture*, **1979**, *57*, 40.

Schutze-Motel, W. Advances in Bryology, vol. 2. Germany: Cramer-Vaduz, 1984, p.224.

Asakawa Y. Chemical constituents of the Bryophytes. in Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Springer, Vienna, 1995: Vol. 65; pp. 1-618.

Zare, H.; Hedenäs, L., Akbarinia, M., Amini, T., The Importance of Moss Biodiversity Conservation in Iran, Nature 2017, 4 (2), 56- 59. (In Persian)

Naqinezhad, A.; Saeidi Mehrvarz, S.; Noroozi, M.; Faridi, M., Contribution to the vascular and bryophyte flora as well as habitat diversity of the Boujagh National Park, N. Iran. Rostaniha 2007, 7 (2), 125-126.

Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L., Biochemistry and molecular biology of plants. John wiley & sons: 2015.

ÜÇÜNCÜ, O., CANSU, T. B., ÖZDEMİR, T., KARAOĞLU, E. A., & YAYLI, N. (2010b).

Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of mosses (Tortula muralis Hedw., Homalothecium lutescens (Hedw.) H. Rob., Hypnum cupressiforme Hedw., and Pohlia nutans (Hedw.) Lindb.) from Turkey. *Turkish Journal of Chemistry*.

Kanimozhi D an Bai VR. Evaluation of Phytochemical antioxidant antimicrobial activity determination of bioactive components of ethanolic extract of aerial and underground parts of *Cynodon dactylon* L. International Journal of Scientific Research and Reviews, 1; 2012: 33- .84

Valarezo, E., Vidal, V., Calva, J., Jaramillo, S. P., Febres, J. D., & Benitez, A. (2018). Essential Oil Constituents of Mosses Species from Ecuador. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *21*(1), 189–197.

Oktay M, Gulcin I, Kufrevioglu O. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (Foeniculum vulgare) seed extracts. Lebensm Wiss Technol. 2003;36:263-.172`

CANSU, T., YAYLI, B., ÖZDEMİR, T., BATAN, N., KARAOĞLU, Ş. and YAYLI, N. (2013). Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of mosses (Hylocomium splendens (Hedw.) Schimp. and Leucodon sciuroides (Hedw.) Schwägr.) growing in Turkey. *Turkish Journal of Chemistry*, [online] 37(2), pp.213–219.

Koid, C.W., Shaipulah, N.F.M., Lee, G.E., Gradstein, S.R., Asakawa, Y., Andriani, Y., Mohammed, A., Norhazrina, N., Chia, P.W. and Ramlee, M.Z. (2022). Volatile Organic Compounds of Bryophytes from Peninsular Malaysia and Their Roles in Bryophytes. *Plants*, 11(19), p.2575.

A study on the essential oil collection and composition of the moss *Pseudoleskeella catenulata* (Brid .ex schrad.) in Iran

Amin joz Ashouri[1], Kazem Mahdigoli[*2], Rahele Doosti[3], Mahshid Majidi nava[4]

[1] Bachelor's student of Plant Biology, University of Tehran

[2]Assistant professor, Ph.D., School of Biology, University of Tehran

[3] Researcher of medicinal plants and phytochemistry, University of Tehran

[4] Master's student of Plant systematics and Ecology, University of Tehran

Abstract:

Bryophytes are the primary land plants containing three groups of non-vascular plants: Liverworts, Hornworts, and Mosses. Bryophytic taxons of Iran consist of 2 hornworts, 69 liverworts, and 442 mosses. Mosses have been used as traditional remedies for the treatment of bronchitis, and burns in China, India, and Europe. Furthermore, numerous biological activities of mosses such as antimicrobial and antiseptic were reported. The chemical composition of essential oil from all parts of *Pseudoleskeella catenulata* [Leskeaceae] was analyzed by Gas chromatography/Mass spectrometry (GC-MS). The mosses were collected from the Javaram location in Mazandaran province in 2018. The powdered mosses were soaked in distilled water for 2 days. The essential oil of mosses was collected by Clevenger and hydrodistillation for 4h. Subsequently, n-Hexan had been used for separating the water and essential oil content. Each essential oil sample was dried over anhydrous sodium sulphate and stored at 4°C and protected from light until being analyzed by GC-MS. Using GC-MS 95.93% of essential oil content that consists of 57 constituents was identified. The major components were Anisole (43.85%), Alkanes (28.55%), and Benzen 4-ethenyl 1,2-dimethoxy (9.67%). Anisole was identified as the most abundant component of the essential oil with 43.85%. Anisole was identified as one of the most significant components of essential oils of liverworts and higher plants. Anisole is used in pharmaceutical industries and also in perfume manufacturing. The results were shown that the essential oil of these moss should be studied for industrial activities in the next investigations.

Keywords: Bryophytes, Essential oil, Hydrodistillation, Anethole

Email: Kmahdigholi@ut.ac.ir

استفاده از کورکومین برای مقابله با استرس اکسیداتیو القاء شده در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت توسط دی- ۲-اتیل هگزیل فتالات

محجوبه لک[۱]*، محمدحسین آبنوسی[۲]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک

[۲] دانشیار بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک

چکیده

سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان (BMSCs) قابلیت تقسیم و تمایز داشته و پیش ساز سلول‌های استئوبلاست هستند. استئوبلاست‌ها در مواقع آسیب بافت وظیفه‌ترمیم و تولید ماتریکس استخوان را به عهده‌دارند. انسان مرتباً از طریق غذا، تنفس و تماس با انواع محصولات مصرفی و پزشکی در معرض DEHP قرار می‌گیرد. BMSCs از طریق خون به DEHP آلوده‌شده و تکثیر و تمایز آنها تحت تأثیر قرارگرفته، لذا جمعیت آن‌ها و استئوبلاست‌ها کاهش میابد. کورکومین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی از BMSCs در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از DEPH محافظت می‌کند. لذا در این پژوهش توانائی کورکومین در کاهش اثرات نامطلوب DEHP بر BMSCs بررسی شد. روش کار: BMSCs با غلظت‌های منتخب ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP و ۰/۱ میکرومولار کورکومین به مدت ۹۶ ساعت تیمار و توانایی زیستی، میزان پروتئین سلول‌ها، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (CAT و SOD)، غلظت مالون‌دی‌آلدئید(MDA) و میزان آنتی‌اکسیدان‌کل(TAC) اندازه‌گیری شد. نتایج: داده‌ها نشان داد DEHP باعث کاهش توانایی زیستی و تکثیری BMSCs، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاهش TCA، افزایش میزان MDA شد. غلظت‌های کم کورکومین (۰/۰۵ تا ۰/۲۵ میکرومولار) اثر نامطلوبی بر توان زیستی سلول ها نداشته اما غلظت ۰/۱ میکرومولار کورکومین باعث افزایش معنی دار ($p<0.05$) توان تکثیری سلول‌های BMSCs شد. تیمار هم‌زمان کورکومین توانست اثر سمی DEHP را بهبود بخشد ولی نتوانست اثر نامطلوب این آلاینده زیست محیطی را در مقایسه با گروه کنترل کاملاً برطرف کند. نتیجه‌گیری: از آنجا که تیمار ۹۶ ساعته کورکومین نتوانست اثرات نامطلوب DEHP بر BMSCs بهبود ببخشد، پیشنهاد می‌شود تیمار با این ترکیب گیاهی در طولانی مدت انجام شود.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان، دی-۲-اتیل هگزیل فتالات، کورکومین، استرس اکسیداتیو

* Mahjobe.lak.1372@gmail.com

۱. مقدمه

مغز استخوان مرکز اصلی تولید سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان (BMSCs)[1] است (Arutyunyan, et al, 2016; Lee, et al., 2019). سلول‌های بنیادی چند توان می‌باشند که قادر به تمایز به انواع سلول‌ها (استئوبلاست‌ها، کندروسیت‌ها، میوسیت‌ها، ادیپوسیت‌ها، سلول‌های عصبی) در محیط آزمایشگاه و در محیط بدن هستند (Buenrostro, et al., 2014; Galli, et al., 2014). سلول‌های بنیادی مزانشیم تقریباً در همه بافت‌ها وجود دارند و ظرفیت خود نوسازی و پتانسیل تمایز به انواع سلولی را دارند. تحت شرایط فیزیولوژیکی و تجربی خاص، سلول‌های بنیادی مزانشیم به سلول‌های تخصصی تمایز می‌یابند. سلول‌های بنیادی مزانشیم را می‌توان از بافت عصبی، بافت چربی، مغز استخوان، مایع آمنیوتیک، بند ناف، جفت، خون قاعدگی و حتی پالپ دندان جدا کرد(Musina, et al., 2008). فتالات ها گروهی از مواد شیمیایی هستند که در حال حاضر به‌طور گسترده در سراسر جهان به‌عنوان نرم‌کننده استفاده می‌شوند. فتالات ها همچنین به‌عنوان افزودنی در محصولات صنعتی، محصولات مراقبت شخصی مورداستفاده قرار می‌گیرند. این مواد نرم‌کننده معمولاً به مواد دیگر، به‌ویژه PVC و پلیمرهای دیگر نظیر لاستیک و استیرن، اضافه می‌شوند تا آن‌ها را انعطاف‌پذیر و کشسان کنند (Sheikh and Beg, 2019). ۲۵ ترکیب شیمیائی در خانواده فتالات ها حضور دارند که از میان آنها شش فتالاتی که بیشترین کاربرد را در صنعت پلاستیک دارند عبارت‌اند از دی ـ۲ـ اتیل هگزیل فتالات (DEHP)[2]،دی بوتیل فتالات (DBP)[3]، دی ـ اتیل فتالات (DEP)[4]، دی اکتیل فتالات (DnOP)[5]، دی متیل فتالات (DMP)[6] و بوتیل بنزیل فتالات (BBP)[7] است Sheikh and Beg, 2019; Latini, 2005; He, et al., 2015).دی اتیل هگزیل فتالات (DEHP) یکی از رایج‌ترین فتالات‌ها است که مورداستفاده قرار می‌گیرد (Wormuth, et al, 2006). به دلیل پیوند ضعیف بین فتالات ها و ترکیبات پلاستیکی، این ترکیبات به‌آسانی به محیط‌زیست واردشده به صورتی که امروزه به‌عنوان آلاینده‌های زیست‌محیطی و فراگیر در نظر گرفته می‌شوند (Shariati, et al, 2021).

فتالات ها از راه‌های مختلفی ازجمله آب، خاک، هوا و محصولات پلاستیکی وارد زنجیره غذایی شده و امنیت هرم غذایی موجودات زنده را کاهش می‌دهند (Tan, et al., 2016 ; Larsson, et al., 2017, Lee, et al., 2019). DEHP از نظر شیمیایی به پلیمر متصل نشده و در زمان استفاده بدلیل تغییر دما از پلیمر جداشده و می‌تواند از طریق آب، غذا و استفاده از وسایل پزشکی باعث آلودگی انسان شود (Elsisi, et al, 1985 ; Bornehag, et al, 2004). کیسه‌های ذخیره‌سازی خون و فراورده‌های خونی، وسایل تزریق و همودیالیز ولوله‌های تراشه، حاوی مقادیر زیادی DEHP هستند.

[1] Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells
[2] Di Ethyl Hexyl Phthalate
[3] Di Buthyl Phthalate
[4] Di Ethyl Phthalate
[5] Di Octyl Phthalate
[6] Di Methyl phthalate
[7] Buthyl Benzyl phthalate

مقـــادیر زیـــادی از DEHP در خـــون و بافت های بیمارانی که به‌دفعات زیاد انتقـال خـون انجـام می‌دهند، یافت می‌شود (Ishihara, et al., 2000). غلظت DEHP در خون که در کیسه‌های پلاستیکی نگهداری میشود ۵۲/۶ تا ۵۵/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر است، این غلظت وابسته به زمان نگهداری افزایش میابد. میانگین DEHP موجود در خون پس از نگهداری در کیسه‌های پلاستیکی به مدت دو هفته ۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بعد از سه هفته ۴۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش‌شده است. میزان مصرف قابل‌تحمل روزانه برای DEPH، ۰/۰۵میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن است (Gilbo and Coles, 1975; Sasakawa and Mitomi,1978).

مطالعات آبنوسی و علی‌یاری درسال ۲۰۱۹ نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP به مدت ۴۸ ساعت تغییری در توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان ایجاد نکرد. همچنین بررسی دو برابر شدگی جمعیت سلولی (PDN) به مدت ۴۸ ساعت نیز بدون تغییر گزارش‌شده است. این در حالی است که در تیمار سلول‌ها به مدت ۴ و ۸ روز کاهش PDN مشاهده شد. در این مطالعات نشان داده شد که DEHP باعث القا استرس اکسیداتیو در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت قبل و بعد از تمایز شده است. بنابراین DEHP با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در کوتاه‌مدت بر توانائی زیستی و تکثیر بی‌تأثیر است ولی در طولانی‌مدت اثر سمی دارد (Abnosi and Aliyari Babolghani, 2022).

در مطالعه دیگری، آبنوسی و همکاران در سال ۲۰۲۳ اثر DEHP بر سیکل سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت مطالعه نمودند. آن‌ها نشان دادند DEHP باعث توقف چرخه سلولی در مرحله G0/G1 می‌شود. همچنین DEHP با توجه به کاهش میزان پروکاسپاز ۳ و۹ و همچنین شکستگی DNA توسط آزمون کامت باعث القاء آپوپتوزیس در سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت شد (Abnosi , et al., 2023).

متابولیت‌های ثانویه ترکیبات آلی هستند که از اهمیت خاصی در درمان و پیشگیری از بیماری‌ها برخوردار می‌باشند. فنول‌ها و ترکیبات فنولیک خانواده ای از متابولیت‌های ثانویه گیاهان می‌باشند(Alam, et al., 2007) که خواص آنتی‌اکسیدانی گیاهان بیشتر به دلیل ترکیبات فنولی موجود در آن‌هاست که در تمام قسمت‌های گیاهان مثل میوه‌ها، دانه‌ها و برگ‌ها وجود دارد(Shah, et al., 2014).

اسیدهای فنولیک، پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها ترکیبات آنتی‌اکسیدانی حفاظت کننده سلول‌ها در برابر تنش‌های اکسیداتیو هستند که با به دام انداختن و مهار رادیکال‌های آزاد نقش مهمی را در سلامت گیاهان و جانوران ایفا می‌نمایند. کورکومین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان از سلول‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت کرده و ROS را از بین می‌برد، بنابراین از این طریق در کاهش استرس اکسیداتیو نقش دارد (Verma and Mishra, 2013). کورکومین یک محصول طبیعی فنولیک است که از ریزوم (Curcuma longa) زردچوبه جداشده و به‌عنوان یک مکمل گیاهی، مواد آرایشی، طعم‌دهنده غذا، و رنگ خوراکی استفاده می‌شود..

با توجه به اهمیت سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان در سلامت استخوان، در مطالعه حاضر توان محافظتی کورکومین در جبران اثر اکسیداتیو DEHP بر این سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت موردبررسی قرار گرفت

است. در این مطالعه توان‌زیستی و تکثیری، میزان دوبرابرشدگی جمعیت، میزان پر اکسیداسیون لیپید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در حضور DEHP بررسی و از طرفی توان کورکومین در افزایش میزان آنتی‌اکسیدان کل سلول و افزایش توان سلول در مقابله با استرس اکسیداتیو ناشی از DEHP موردبررسی قرار گرفت.

۲ مواد و روش‌ها

برای مطالعات و بررسی‌ها در این پژوهش از رت های نر نژاد ویستار دوماهه که تحت شرایط استاندارد دما، تغذیه و نور مناسب نگهداری شدند استفاده‌شده است.

۱.۲. کشت سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان:

برای جداسازی و کشت سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان ابتدا در شرایط استریل استخوان ران و ساق جدا گردید. بعد از جدا کردن بافت های پیوندی استخوان‌ها به فالکون حاوی محیط کشت کامل (DMEM+penicillin and streptomycin+15%FBS[1]) با حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. در اتاق کشت ، زیر هود لامینار با قیچی استریل دو سر استخوان‌ها قطع و به‌وسیله محیط کشت کامل با عمل شست‌وشو مغز استخوان را خارج و به ۳ میلی‌لیتر محیط کشت کامل انتقال داده شد. پس از پیپتاژ کردن محیط کشت حاوی مغز استخوان فالکون به مدت ۵ دقیقه در سانترفیوژ با دور ۶۹۰ (g) قرار گرفت. مایع رویی را خارج کرده و به رسوب حاصل ۱میلی‌لیتر محیط کشت DEMEM حاوی ۱۰٪ FBS، پنی‌سیلین و استرپتومایسین اضافه و در فلاسک T25 مخصوص کشت سلول به انکوباتور با شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، 5% CO2 و دارای رطوبت منتقل شد.

بعدازاینکه سلول‌ها کف فلاسک را پر کردن، عمل پاساژ انجام شد. برای عمل پاساژ سلول‌های چسبیده به کف فلاسک را با تریپسین EDTA[2] جدا و به فلاسک های جدید منتقل شدند. طی پاساژ سلول‌ها به خلوص ۹۲٪ (با توجه به بررسی‌های فلوسایتومتری) رسید و برای انجام آزمون‌ها استفاده شد.

۲.۲. انتخاب دوز مؤثر:

با توجه به مطالعات آبنوسی و علی‌یاری در سال ۲۰۲۲ از غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP برای بررسی تأثیر این آلاینده بر توانائی خود نوزائی به مدت ۴ روز استفاده شد. از طرفی با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از توانائی زیستی غلظت ۰/۱ میکرومولار کورکومین که بیشترین توانایی تکثیر سلولی را داشت برای بررسی اثر مهارکنندگی DEHP استفاده شد. گروه‌های آزمایشی با سه تکرار برای هر آزمون به ترتیب زیر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

گروه اول (Control): سلول‌ها تنها با محیط کشت کامل بدون حضور DEHP یا کورکومین تیمار شدند.

گروه دوم (DEHP): سلول‌ها با محیط کشت کامل در حضور DEHP تیمار داده شدند.

گروه سوم (کورکومین): سلول‌ها با محیط کشت کامل در حضور کورکومین تیمار داده شدند.

[1] Fetal Bovine Serum
[2] Ethylene Diamine Tetra Acetic acid

گروه چهارم تیمار همزمان (DEHP+CURCUMIN): سلول‌ها به‌صورت همزمان با محیط کشت کامل و غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP به همراه ۰/۱ میکرومولار کورکومین تیمار داده شدند.

۳.۲. اندازه‌گیری زنده‌مانی سلول‌ها بر اساس آزمون تریپان بلو:

در هر چاهک پلیت ۹ خانه تعداد ۵۰۰۰۰ سلول به مدت ۲۴ ساعت برای چسبیدن سلول به کف پلیت کشت داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت محیط رویی سلول‌ها خارج و محیط کشت کامل جدید حاوی غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰۰ میکرومولار DEHP و غلظت ۰/۱ میکرومولار کورکومین به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از ۴ روز محیط رویی خارج و سلول‌ها با PBS شستشو شدند، سپس چاهک‌ها را تریپسینه کرده و با محیط کشت کامل خنثی شدند. به ۱۰میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی به نسبت ۱:۱ رنگ تریپان بلو ۰/۴ درصد اضافه گردید. پلیت ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سلول‌ها به‌وسیله لام نئوبار شمارش و تعداد سلول‌های مرده (آبی‌رنگ) و سلول‌های زنده (بی‌رنگ) مشخص گردید. درصد زنده‌مانی سلول‌ها در هر غلظت با استفاده از فرمول زیر و با توجه به ضریب رقت (2X) محاسبه گردید.

$$\text{درصد توانایی زیستی} = \frac{\text{تعداد سلول زنده}}{\text{تعداد کل سلول}} \times 100$$

۴.۲. بررسی توان تکثیری سلول‌ها بر اساس دو برابر شدگی جمعیت (PDN)[1]:

دو برابر شدگی جمعیت به‌صورت عددی میانگین کل جمعیت را بیان کرده و نشان‌دهنده سرعت‌های مختلف تقسیم است. ۵۰۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی سلول‌ها تخلیه و محیط کشت کامل همراه غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP، ۰/۱ میکرومولار کورکومین، و مخلوط غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP و ۰/۱ میکرومولار کورکومین به سلول‌ها اضافه شد. هر سه روز یک‌بار به مدت ۹۶ ساعت محیط کشت تعویض گردید. سلول‌ها تریپسینه و شمارش شدند. با استفاده از فرمول زیر دو برابر شدگی جمعیت اندازه‌گیری شد. در فرمول زیر N تعداد سلول‌ها بعد از شمارش و .N تعداد سلول‌های اولیه است.

$$PDN=(\log N/N. \times 3.32)$$

۵.۲. تیمار و استخراج عصاره سلولی:

سلول‌های پاساژ سه در فلاسک T25 کشت و پس از ۹۶ ساعت تیمار، دو بار با بافر Tris-HCl-NaCl شستشو، سپس تریپسینه و به اپندورف منتقل شد. برای لیز کردن سلول‌ها از روش انجماد و ذوب استفاده و با دور ۱۰۲۰۰ (g)، ۱۰ دقیقه سانترفیوژ و برای بررسی‌های بعدی از محلول رویی حاوی عصاره سلولی استفاده شد.

۶.۲. اندازه‌گیری میزان پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش لاوری:

برای بررسی میزان فعالیت آنزیمی سلول ابتدا با استفاده از روش لاوری میزان پروتئین نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. ازسرم آلبومین گاوی[2](BSA) به‌عنوان استاندارد لاوری استفاده شد.

[1] Population Doublling Number
[2] Bovine serum albumin

برای ساخت محلول لاوری در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر، ۰/۴ گرم سود و ۲ گرم سدیم کربنات حل شد. در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر ۰/۱ گرم سولفات مس حل گردید. در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر ۰/۲ گرم سدیم پتاسیم تارتارات حل شد. برای تهیه محلول کمپلکس لاوری به ۹۸ میلی‌لیتر از محلول مرحله اول، ۱ میلی‌لیتر از محلول مرحله دوم و ۱ میلی‌لیتر از محلول مرحله سوم اضافه شد.

در لوله‌آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره سلولی معرف فولین سیکالتیوی و ۵ میلی‌لیتر از محلول واکنش اضافه شد و لوله‌ها ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شدند. جذب هر نمونه را با دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۵۰ نانومتر خوانده و پس از رسم نمودار استاندارد از فرمول خطی $Y=0/0015X + 0/0224$ با $R^2=0/9984$ برای محاسبه غلظت پروتئین در نمونه‌ها استفاده شد. مقداری از نمونه‌ها که حاوی غلظت مساوی پروتئین بود برای آنالیزهای بعدی استفاده شد.

۷.۲. اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD):

SOD آنزیمی است که واکنش تجزیه رادیکال سوپر اکسید و تولید پراکسید هیدروژن را تسهیل می‌کند. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم مطابق روش Giannopolitis انجام شد. برای ساخت محلول واکنش ابتدا حاوی ۱/۹ میلی‌گرم متیونین، ۷/۹ میلی‌گرم ریبوفلاوین ، ۶/۱ میلی‌گرم نیتروبلوتترازولیوم و ۳/۳ میلی‌گرم EDTA هرکدام به‌صورت جداگانه در حداقل بافر فسفات پتاسیم حل شدند. درنهایت محلول‌ها باهم ترکیب‌شده و حجم نهایی محلول به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. عصاره سلولی به همراه ۱میلی‌لیتر از محلول واکنش در لوله‌آزمایش ترکیب شد. کنترل و شاهد این آزمون محلول فاقد عصاره بود. نمونه شاهد در تاریکی و سایر نمونه‌ها به مدت ده دقیقه در اتاقک نور قرار داده شدند. جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز برحسب یک واحد در دقیقه به ازای یک میلی‌گرم از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{فعالیت سوپراکسیددیسموتاز} = \frac{\text{OD کنترل} - OD \text{ نمونه}}{OD \text{ کنترل}}$$

فعالیت یک واحد آنزیم برابر با مقدار آنزیمی که از احیای ۵۰٪ نیتروتترازولیوم جلوگیری می‌کند در نظر گرفته شد.

۸.۲. اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT):

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از این نظر حائز اهمیت است که هیدروژن پراکسید توسط آنزیم کاتالاز تجزیه می‌شود. جذب H2O2 در بافر PBS در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر در ۰/۴ تنظیم و نقطه شروع اندازه‌گیری سرعت واکنش در نظر گرفته شد. به لوله‌آزمایش ۵۰ میکرولیتر از عصاره سلولی، ۲۰۰ میکرولیتر بافر PBS و ۳۰۰ میکرولیتر H2O2 اضافه شد. با اضافه کردن نمونه‌ها پس از گذشت ۲ دقیقه سرعت حذف H2O2 اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس سرعت مصرف پراکسید هیدروژن در دقیقه و با استفاده از فرمول زیر و ضریب خاموشی $39/4\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه شد.

$$\text{فعالیت کاتالاز} = \frac{\text{اختلاف جذب}}{39/4}$$

۹.۲. اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA):

به عصاره سلولی ۱ میلی‌لیتر محلول‌تری کلرو استیک اسید ۲۰٪ حاوی تیوباربیتوریک اسید ۵٪ اضافه شد. ترکیب حاصل در حمام آبگرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. لوله‌های آزمایش حاوی نمونه را از حمام آبگرم خارج کرده و سریعاً ده دقیقه در یخ قرار داده شدند. نمونه‌ها ده دقیقه با دور ۶۹۰ (g) سانترفیوژ شدند. چون در طول‌موج ۵۲۳ نانومتر بعضی از ترکیبات به عنوان ترکیبات مزاحم جذب دارند، پس جذب محلول در ۶۰۰ نانومتر نیز خوانده و از جذب خوانده شده در ۵۲۳ نانومتر کم شد. این جذب بر اساس تشکیل کمپلکس تیوباربیتوریک-مالون دی آلدئید است. غلظت کمپلکس تیوباربیتوریک اسید-مالون دی آلدئید از فرمول $A = \varepsilon bc$ و ضریب خاموشی $\varepsilon = ۱۵۵ mmol^{-۱} cm^{-۱}$ برحسب میکرومولار محاسبه گردید.

۱۰.۲. اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) بر اساس روش FRAP:

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل با استفاده از روش Benzie and Strain اندازه‌گیری شد. در لوله‌آزمایش ۱۵۰ میکرولیتر عصاره سلولی، ۸۵۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر و ۱۷۰۰ میکرولیتر محلول واکنش FRAP ریخته شد. برای ساخت محلول واکنش ابتدا سه محلول زیر به‌صورت جداگانه تهیه و با نسبت ۱:۱:۱ یکدیگر مخلوط شدند: محلول اول (بافر استات سدیم ۳۰۰ میلی مولار): ۰/۷۳ گرم استات سدیم در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر حل‌شده و pH روی ۳/۶ تنظیم شد. محلول دوم (TPTZ): در محلول ۴۰ میلی مولار اسیدکلریدریک (در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر ۰/۰۳۲ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک حل شد)، ۰/۰۰۳۱ گرم TPTZ حل شد. محلول سوم (محلول کلرید آهن ۲۰ میلی مولار): ۰/۰۰۵۴گرم کلرید آهن در ۱ میلی‌لیتر آب حل شد.

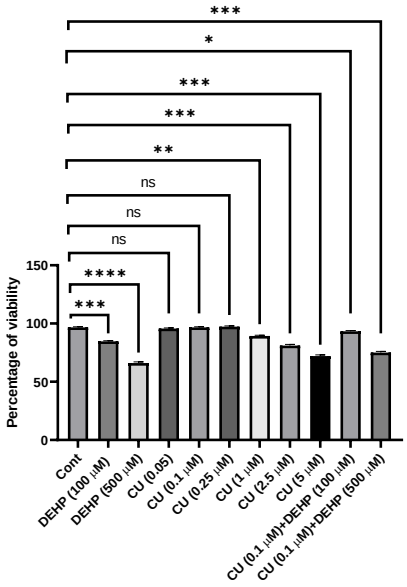
لوله‌ها ۱۰ دقیقه در تاریکی قرارگرفته سپس جذب نمونه‌ها در۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از رقت‌های مختلف سولفات آهن پس از رسم منحنی استاندارد با استفاده از فرمول خطی $Y=0/0059X + 0/0552$ با $R^2=0/9982$ میزان آنتی‌اکسیدان کل نمونه‌های تیماری برحسب میکرو مول آهن/ میلی‌گرم پروتئین اندازه‌گیری شد.

۳. نتایج

۱.۳. تأثیر کورکومین و DEHP بر زنده‌مانی و توانائی تکثیر سلول‌ها:

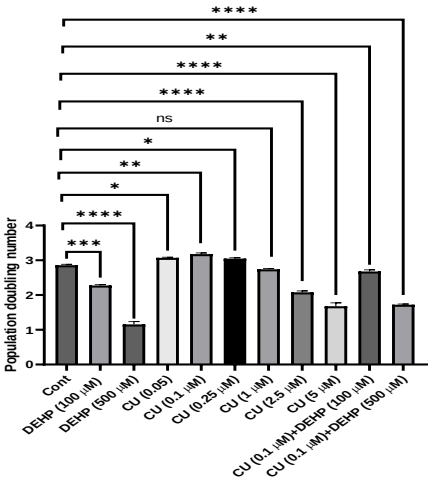
همان‌طور که در نمودار۱ مشاهده می‌شود نتایج حاصل از آزمون تریپان بلو نشان داد تیمار با DEHP در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌ها شده که این کاهش معنی‌دار ($p<0.05$) وابسته به دوز بود. از طرفی تیمار با کورکومین در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲۵ هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری ($p>0.05$) در توانائی زیستی BMSCs بوجود نیاورد، این در حالی است که غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میکرومولار باعث کاهش معنی‌دار توانائی زیست سلول‌ها شد. تیمار سلول‌های با غلظت ۰/۱ میکرومولار کورکومین و ۱۰۰ میکرومولار DEHP توانست اثر سمی

این آلاینده را کاهش دهد. این در حالی است که در تیمار هم‌زمان غلظت ۰/۱ میکرومولار کورکومین و ۵۰۰ میکرومولار DEHP اثر جبرانی مشاهده نشد.



نمودار ۱. نتایج حاصل از آزمون تریپان بلو.

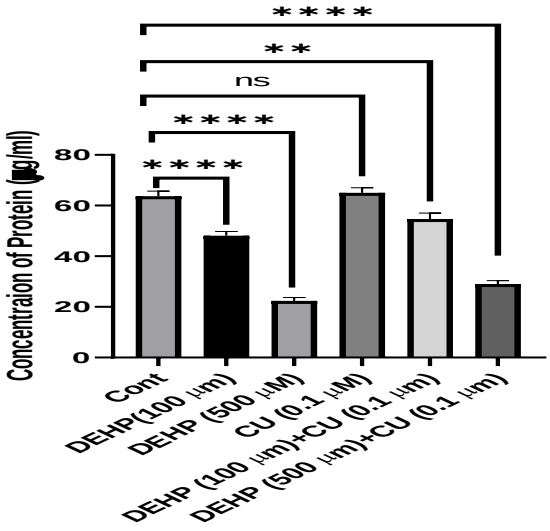
از طرفی آزمون دو برابر شدگی جمعیت (نمودار۲) نشان داد بالاترین میزان توانایی تکثیر سلولی در تیمار با غلظت ۰/۱ میکرومولار از کورکومین بوده است. لذا با توجه به نتایج حاصل از آزمون تریپان بلو و PDN، غلظت ۰/۱ میکرومولار از کورکومین برای بررسی توان این متابولیت ثانویه در کاهش اثر اکسیداتیو غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار انتخاب گردید.



نمودار۲. نتایج حاصل از آزمون PDN.

۲.۳. اندازه‌گیری میزان پروتئین:

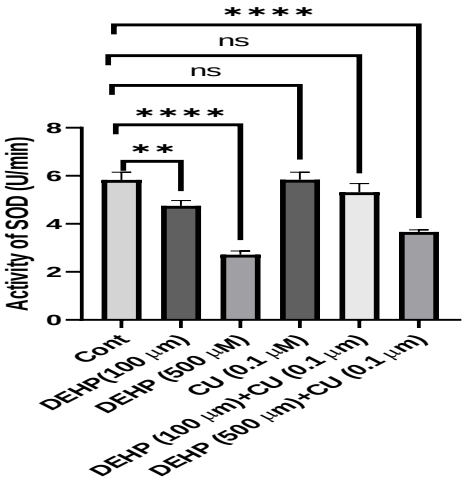
تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف DEHP در مقایسه با کنترل باعث کاهش معنی‌داری ($p<0.05$) میزان پروتئین سلولی به‌صورت وابسته به دوز شد. از طرفی گروه تیمار شده با کورکومین در مقایسه با گروه تیمار شده با DEHP باعث افزایش میزان پروتئین سلول‌ها گردید این در حالی است که در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی‌داری ($p>0.05$) مشاهده نشد. تیمار سلول‌ها با کورکومین و DEHP به‌صورت هم‌زمان باعث کاهش اثر این آلاینده زیست‌محیطی در مقایسه با گروه‌های تیماری با DEHP شد ولی نتوانست در مقایسه با گروه کنترل اثر سمی DEHP را مرتفع سازد (نمودار۳).



نمودار۳. اندازه‌گیری میزان پروتئین سلولی به روش لاوری.

۳.۳. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز:

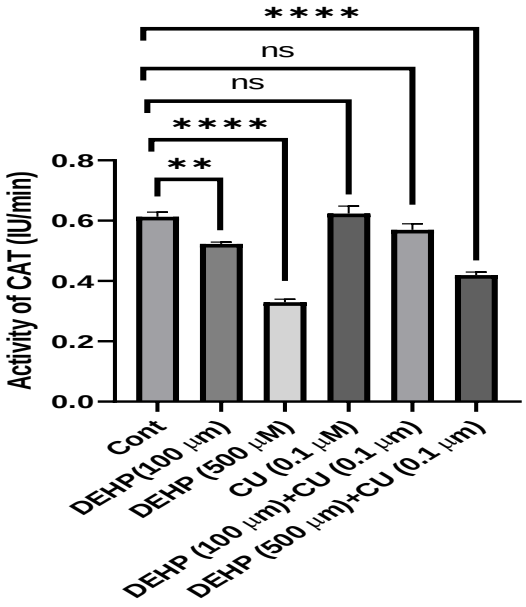
همان‌طور که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود گروه تیمار شده با غلظت‌های مختلف DEHP در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش معنی‌دار ($p<0.05$) فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز گردید. از طرفی، اگرچه تیماری با کورکومین در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی‌داری نداشته است ولی این آنتی اکسیدان طبیعی در تیمار هم‌زمان با غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP توانست اثر این آلاینده زیست محیط را مرتفع سازد، به صورتی که تغییر آن در مقایسه با گروه تیمار شده با ۱۰۰ میکرومولار DEHP معنی‌دار ($p<0.05$) بود. از طرفی آنالیز داده‌ها نشان داد کورکومین نتوانسته است اثر غلظت ۵۰۰ میکرومولار DEHP را مرتفع سازد.



نمودار۴. فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز.

٤.٣. اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالیز:

همان‌طور که در نمودار۵ می‌بینید گروه تیمار شده با DEHP در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش معنی‌دار ($p<0.05$) فعالیت آنزیم کاتالاز گردید. این در حالی است که نتایج حاصل از تیمار سلول‌ها با کورکومین و DEHP مشابه نتایج آن در بررسی فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز است. غلظت ۰/۱ میکرومولار کورکومین توانست اثر غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP را جبران نماید ولی در جبران اثر ۵۰۰ میکرومولار موفق نبود.

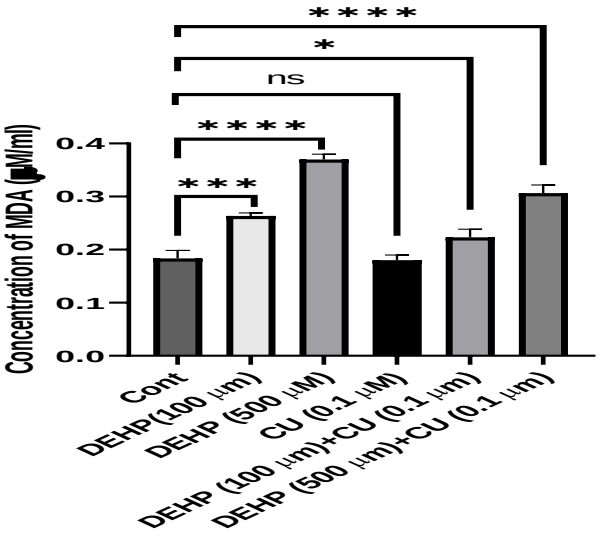


نمودار۵. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز.

۵.۳.بررسی پراکسیداسیون لیپید:

MDA به عنوانی شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء اندازه‌گیری شد، در گروه تیمار شده با DEHP در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار ($p<0.05$) میزان MDA دیده شد. از طرفی در گروه تیماری با کورکومین در مقایسه با گروه

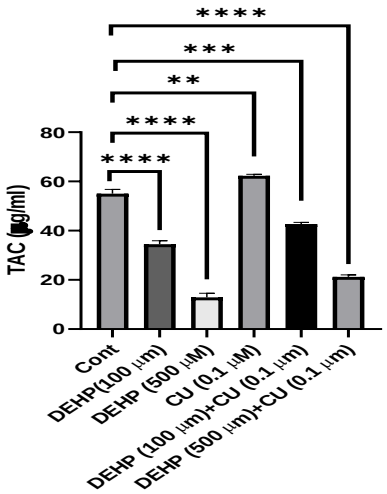
تیماری با DEHP کاهش معنی‌دار (p<0.05) MDA دیده شد. اگرچه در مقایسه با گروه کنترل،کورکومین نتوانست اثر سمی DEHP را برطرف کند (نمودار۶)



نمودار۶. اندازه‌گیری میزان پر اکسیداسیون لیپید.

٦.٣. اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل:

همان‌طور که در نمودار۷ مشاهده می‌شود، کورکومین در مقایسه با گروه کنترل باعث افزایش معنی‌دار (P<0.05) آنتی‌اکسیدان‌کل سلول‌ها شده است. اگرچه در تیمار هم‌زمان کورکومین و DEHP با توجه به حضور این آلاینده میزان آنتی‌اکسیدان‌کل سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌دار (p<0.05) داشته است.



نمودار۷. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان کل سلول.

٤. بحث و نتیجه‌گیری:

نتایج این بررسی‌ها نشان داد، غلظت‌های کم (۰/۰۵ تا ۰/۱ میکرومولار) کورکومین دارای اثر سمی بر سلول‌های BMSCs نیست، از طرفی غلظت ۰/۱ میکرومولار باعث افزایش توانائی تکثیر این سلول‌ها گردید. اگرچه با توجه به اثر آنتی‌اکسیدانی کورکومین این محصول طبیعی گیاهی توانست اثر اکسیداتیو غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP را مرتفع سازد ولی در مقایسه با گروه کنترل این جبران غیر معنی‌دار نبود. لذا دلایل مختلفی ممکن است باعث عدم موفقیت کامل کورکومین شده باشد، که مهم‌ترین آن کوتاه بودن زمان تیمار است که پیشنهاد می‌شود تیمار با این محصول گیاهی در زمانه‌ای بیشتر از ۴ روز باشد. اگرچه مطالعات متعددی در خصوص اثر آنتی‌اکسیدانی کورکومین وجود دارد ولی نیاز به بررسی‌های بیشتر در خصوص این متابولیت ثانویه گیاهی دیده می‌شود. بر اساس بررسی‌های فارموکینتیک انجام‌شده، مشخص‌شده است که جذب کورکومین به‌صورت خوراکی بسیار کند و کم بوده و از طرفی حلالیت آن در آب نیز کم می‌باشد (Jäger 2014; Lopresti 2018;) ، لذا پیشنهادشده است که با افزایش زمان تیمار و بهینه‌سازی غلظت امکان افزایش اثر بیولوژیک کورکومین وجود دارد. به‌عنوان نتیجه‌گیری با توجه به مطالعات فوق‌الذکر، احتمالاً افزایش زمان تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان می‌تواند به بهبود نتایج حاصل از مطالعه حاضر کمک کند

منابع

Abnosi MH, Aliyari Babolghani Z. Diethylhexyl phthalate induced oxidative stress and caused metabolic imbalance in bone marrow mesenchymal stem cells.(2022) ; 26(1). 88-100.

Abnosi MH, Sargolzaei J, Shayganfar Z. Induction of Caspase-dependent Apoptosis in Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells due to Di-2-Ethylhexyl Phthalate Toxicity was found to arrest the Cell Cycle at the G1 stage.(2023).

Alam MS, Kaur G, Jabbar Z, Javed K, Athar M. Eruca sativa seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity. (2007). 45(6). 910-920.

Arutyunyan I, Elchaninov A, Makarov A, Fatkhudinov T. Umbilical cord as prospective source for mesenchymal stem cell-based therapy. (2016).

Bornehag C, Sundell CJ, Weschler T, Sigsgaard B, Lundgren M, Hasselgren L. The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case–control study. (2004). 112(14). 1393-1397.

Buenrostro D, Park I, Sterling J. Dissecting the role of bone marrow stromal cells on bone metastases. (2014). Elsisi A, Carter D, Sipes I. Dermal absorption and tissue distribution of phthalate esters. (1985). 5. 246-247.

Galli D, Vitale M, Vaccarezza M. Bone marrow-derived mesenchymal cell differentiation toward myogenic lineages: facts and perspectives. (2014).

Gilbo C, Coles N. Di (2-ethylbexyl) phthalate Content of Plasma Fractions Prepared by Low Temperature Ethanol (Cohn) Fractionation. (1975). 29(4). 242-247.

Ishihara M, Itoh MK, Miyamoto S, Suna Y, Takeuchi I, Takenaka F. Spermatogenic disturbance induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate is significantly prevented by treatment with antioxidant vitamins in the rat. (2000). 23(2). 85-94.

Jäger R, Lowery RP, Calvanese AV, et al. Comparative absorption of curcumin formulations. Nutr J. 2014; 13(11).

Larsson KCH, Lindh BA, Jönsson G, Giovanoulis M, Bibi M, Bottai A, Bergström M. Phthalates, non-phthalate plasticizers and bisphenols in Swedish preschool dust in relation to children's exposure. (2017). 102. 114-124.

Latini G. Monitoring phthalate exposure in humans. (2005). 361(1-2). 20-29.

Lee GY, Jeong SY, Lee HR, Oh IH. Age-related differences in the bone marrow stem cell niche generate specialized microenvironments for the distinct regulation of normal hematopoietic and leukemia stem cells. (2019). 9(1). 1007.

Lopresti AL. The Problem of Curcumin and Its Bioavailability: Could Its Gastrointestinal Influence Contribute to Its Overall Health-Enhancing Effects?, Advances in Nutrition. 2018; 9(1): 41–50

.Lee YS, Lee S, Lim JE, Moon HB. Occurrence and emission of phthalates and non-phthalate plasticizers in sludge from wastewater treatment plants in Korea. (2019). 692. 354-360.

Musina R, Belyavski A, Tarusova O, Solovyova E, Sukhikh G. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood.(2008). 145. 539-543.Sasakawa S, Mitomi Y. Di-2–ethylhexylphthalate (DEHP) Content of Blood or Blood Components Stored in Plastic Bags. (1978). 34(2). 81-86.

Shah MA, Bosco SJD, Mir SA. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products.(2014). 98(1): 21-33.

Shariati S, Pourbabaei AA, Alikhani HA, Rezaei KA, Shariati F. Phthalic Acid Esters as Pervasive Emerging Pollutants in the Environment and Their Role in Threatening Food Security and Human Health: A Review. (2021). 52(8).2253-2277.

Sheikh IA, Beg MA. Structural characterization of potential endocrine disrupting activity of alternate plasticizers di-(2-ethylhexyl) adipate (DEHA), acetyl tributyl citrate (ATBC) and 2, 2, 4-trimethyl 1, 3-pentanediol diisobutyrate (TPIB) with human sex hormone-binding globulin. (2019). 46-53.

Tan W, Zhang Y, He X, Xi B, Gao R, Mao X, Huang C, Zhang H, Li D, Liang Q. Distribution patterns of phthalic acid esters in soil particle-size fractions determine biouptake in soil-cereal crop systems.(2016). 6(1). 31987.

Verma SA, Mishra A. Gallic acid: molecular rival of cancer. (2013). 35(3): 473-485.

Wormuth M, Scheringer M, Vollenweider M, Hungerbühler K. What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans.(2006). 803-824.

Investigating the ability of curcumin to counteract the oxidative effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in rat bone marrow mesenchyme cells

Mahjuba Lak[1], Mohammad Hossein Abnoosi[2]

[1]Master's student in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak

[2] Associate Professor of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak

Abstract:

Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) with proliferate and differentiate ability are the precursors of osteoblasts, responsible for repairing and producing bone matrix in case of tissue damage. Humans are regularly exposed to DEHP through food, breathing and contact with medical equipment. BMSCs are contaminated with DEHP through blood and their proliferation is affected which causes the population of osteoblast to reduce. Curcumin, with antioxidant properties, protects cells from oxidative damage, therefore in this study, protecting effect of curcumin as a strong antioxidant to reduce the adverse effects of DEHP on the proliferation of BMSCs was investigated. Methodology: after BMSCs culture, treatment with selected concentrations of 100 and 500 µM DEHP and 0.1 µM curcumin for 96 hours was carried out then, the viability of cells, interacellular protein level, activity of antioxidant enzymes (CAT and SOD), level of malondialdehyde(MDA) and total antioxidant capacity(TAC) were measured. Results: data showed that DEHP decreased the biological and proliferative ability of BMSCs, decreased the activity of antioxidant enzymes, decreased the total antioxidant power, and increased the amount of lipid peroxidation. Low concentrations (0.05 and 0.25µM) of curcumin did not have an adverse effect on the biological ability of cells, but the concentration of 0.1 µM curcumin showed the highest proliferation ability. Curcumin co-treatment could improve the toxic effect of DEHP but could not completely compensate the adverse effect as compared to control. Conclusion: Curcumin treatment for 96 hours could not improve the adverse effects of DEHP on BMSCs, we suggest longer treatment.

Key words: bone marrow mesenchyme stem cell, di-2-ethylhexyl phthalate, curcumin, oxidative stress

Mahjobe.lak.1372@gmail.com

القای رشد سلولی و تولید تاکسول توسط پیش‌ماده در کشت سلولی فندق (*Corylus avellana*)

آیت اله رضایی[1]

گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

چکیده

عوامل مختلف از جمله پیش‌ماده‌ها یکی از استراتژی‌های مهم جهت القای تولید متابولیت‌های دست ورزی کشت‌های سلولی به کمک ارزشمند در بیوتکنولوژی گیاهی میباشد. بدین منظور اثر پیش ماده‌های فنیل آلانین، استات سدیم و اسید بنزوییک (با غلظت‌های ۰، ۲/۵، ۵، ۱۰ میلی‌مولار) روی رشد و برخی از پارامترهای فیزیولوژیک در کشت سلولی فندق مورد بررسی قرار گرفت. تیمارها در ۳ تکرار در قالب کرت‌های کاملاً تصادفی اعمال گردید. پارامترهای مورد مطالعه عبارت بود رشد سلولی، مقدار پروتئین، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز(PAL)، مقدار تولید ترکیبات فنلی، فلاونوییدی و تاکسول. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت تیمارها تا ۵ میلی مولار ابتدا رشد سلولی و تولید پروتئین افزایش یافت و سپس کاهش یافت. افزایش تولید ترکیبات فنلی و فلاونوییدها و فعالیت آنزیم PAL در کشت‌های تیمار شده با پیش ماده‌ها در غلظت ۵ میلی‌مولار بیشترین مقدار تولید این ترکیبات و فعالیت آنزیم PAL نسبت به کشت‌های شاهد مشاهده گردید. بیشترین مقدار تولید تاکسول را به ترتیب با مقادیر ۱۶/۲۳، ۱۳/۵۶ و ۱۵/۳۴ میکروگرم در گرم وزن خشک القاء نمودند. بنظر می‌رسد افزایش تولید مواد موثره از جمله تاکسول توسط تیمارها احتمالاً در اثر القای مسیرهای بیوسنتزی و پاسخ‌های دفاعی سلول‌ها می باشد.

واژگان کلیدی: فندق (*Corylus avellana*)، کشت سلولی، پیش‌ماده، تاکسول

[1] arezaei@shahed.ac.ir

۱. مقدمه

تاکسول یکی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی است که اولین بار از پوست درخت سرخدار (*Taxus brevifolia*) به‌دست آمد و خیلی سریع در بین داروهای با منشاء گیاهی در بازار دارو و همچنین دنیای پزشکی جا باز کرد و به علت پتانسیل بالای مهار رشد تومورها در صدر داروهای ضد سرطان قرار گرفت (Christen et al., 1991). تولید متابولیت ثانویهٔ گیاهی با خصوصیات دارویی از طریق کشت سلولی در شرایط آزمایشگاهی، فواید زیادی در مقایسه با استخراج این ترکیبات از گیاهان، تحت شرایط طبیعی دارد. کنترل دقیق پارامترهای مختلف سبب می‌شود که کیفیت مواد حاصل در طول زمان تغییر نکند، درحالی که در شرایط طبیعی مرتبًا تحت تأثیر شرایط آب و هوایی و آفات است.

قسمت‌های مختلف گیاه فندق حاوی انواع مهمی از متابولیت های دارویی با اثرات ضد سرطانی و ضد میکروبی بسیار ارزشمند می‌باشد. کشف تولید تاکسان ها در گیاه فندق و کشت‌های سلولی آن علایق و امیدهای زیادی را برای مطالعه و کاربرد کشت سوسپانسیون سلولی فندق به عنوان یک راهکار زیست فناوری برای تولید تاکسول و سایر تاکسان‌ها ایجاد کرده است. تولید تاکسول توسط گیاه کامل فندق (برگ، غلاف دانه، پوسته چوبی دانه و ساقه) و همچنین در کشت سلولی این گیاه نشان داده شده است (Hoffman and Shahidi, 2009; Bestoso et al., 2006). برخی مطالعات اثرات القایی پیش ماده‌ها در رشد و تولید متابولیت‌ها را در کشتهای سلولی گزارش کرده اند. به عنوان مثال وجود گلوتامین و فنیل الانین باعث افزایش رشد سلول‌ها (Cusido et al., 1999) و یا فنیل آلانین منجر به افزایش تولید تاکسول در کشت سلولی سرخدار (Khosroushahi et al., 2006) گردید. با توجه به اینکه کشت سلول گیاهی منبعی جایگزین، تجدید پذیر و سازگار با محیط زیست برای تولید انواع ترکیبات است و همچنین امکان بکارگیری راهکارهای مختلف برای افزایش تولید از این طریق وجود دارد در این تحقیق سعی بر آن است تا با استفاده از برخی پیش ماده‌های تاکسول نظیر فنیل‌آلانین، استات سدیم و اسید بنزوییک در محیط کشت، ضمن اندازه-گیری رشد و برخی پارامترهای فیزیولوژیک، عملکرد سلول‌ها از نظر تولید تاکسول نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

۲. مواد و روشها

۱.۲. راه اندازی کشت سلولی و تیمار سلول‌ها

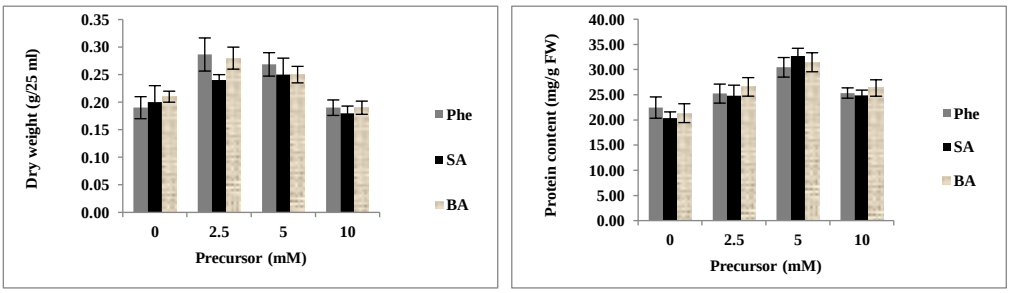
در این تحقیق از کالوس بدست آمده از لپه‌های بذر فندق (رقم گرد اشکور) پس از بهینه سازی شرایط کشت در محیط MS استفاده شد. برای تهیه کشت تعلیقی حدود ۲ گرم کالوس نرم و سفید به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت MS با ترکیبات هورمونی (2,4-D ۱ میلیگرم در لیتر و BA ۰/۵ میلی گرم در لیتر) اضافه شد. پیش ماده‌ها شامل فنیل آلانین، استات سدیم و اسید بنزوییک هر یک با غلظت‌های (۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار) بعد از استریل شدن روز هفتم بعد از واکشت به محیط کشت سلول‌ها اضافه شدند. کشت‌ها روز چهاردهم برداشت شده با ازت مایع منجمد و سپس در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد جهت انجام آنالیزها در مواقع لازم نگهداری شدند.

۲.۲. اندازه‌گیری رشد سلولی و ترکیبات بیوشیمیایی

رشد سلولی با اندازه‌گیری افزایش در وزن خشک سلول‌ها تعیین شد. مقدار پروتئین در نمونه‌ها به روش برادفورد (۱۹۷۶) تعیین شد. ترکیبات فنلی و فلاونوییدی در سلول‌ها به روش (Djeridane et al., 2006) اندازه‌گیری گردید. فعالیت PAL بر اساس مقدار تولید اسید سینامیک به روش(Ochoa-Alejo and Gmez-Peralta, 1993) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری مقدار تاکسول تولیدی از HPLC (Knauer, Germany) استفاده شد. ستون مورد استفاده (C18, 25 Cm x 4.6 mm I.D., 5 µm)، فاز متحرک متانول و آب (۴۰/۶۰ v/v) هر یک حاوی ۰/۱ ٪ اسید استیک به صورت گرادیان با فلوی ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و طول موج مورد استفاده ۲۲۷ نانومتر بود (Yuan et al., 2002).

۳. نتایج

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت و سطح تیمارها، رشد سلولی و محتوای پروتئین ابتدا اندکی افزایش و سپس کاهش یافت (شکل ۱). تغییر در تولید زیتوده خشک با توجه به نوع پیش ماده و غلظت آن متفاوت بود. بیشترین مقدار زیتوده بدست آمد. در خصوص مقدار پروتئین، روند تغییرات تحت اثر تیمارها مشابه بود و Phe۰/۲۹) در غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار g/25 ml (۳۲/۷) در غلظت ۵ میلی‌مولار سدیم استات اندازه‌گیری شد. تولید مواد موثره از جمله ترکیبات فنلی، mg/g FWبیشترین مقدار آن (نیز در سلول‌های تیمار شده افزایش یافت (شکل ۲). PALآنتوسیانین‌ها، فلاونوییدها و تاکسول و همچنین فعالیت آنزیم



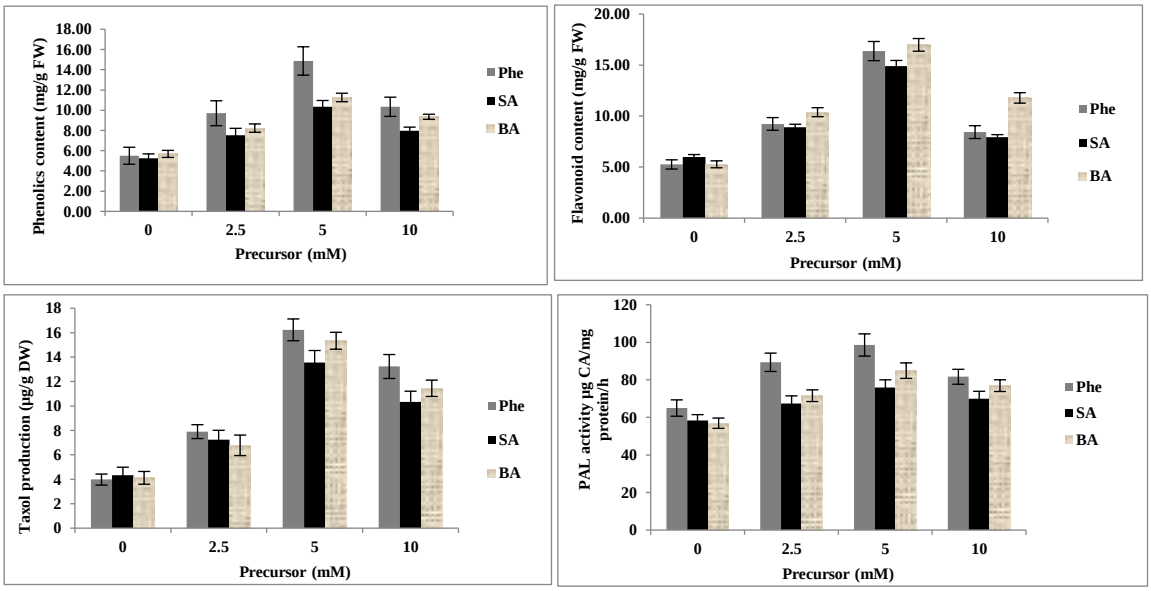
شکل ۱. تغییر در میزان رشد و پروتئین سلولها تحت تأثیر فنیل آلانین (Phe)، استات سدیم (SA) و اسید بنزوئیک (BA) در کشت سلولی فندق (*Corylus avellana* L.). مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و SE ± میباشد.

در غلظت ۵ میلی‌مولار تیمارها اندازه‌گیری شد. پیش‌ماده‌های فنیل آلانین، PALبیشترین مقدار تولید این ترکیبات و فعالیت آنزیم استات سدیم و اسید بنزوییک در غلظت ۵ میلی‌مولار تولید تاکسول را به ترتیب با مقادیر ۱۶/۲۳، ۱۳/۵۶ و ۱۵/۳۴ میکروگرم در گرم وزن PALخشک القاء نمودند. در بیشترین سطح تیمارها یک افت محسوسی در مقایسه با سطح سوم در تولید این ترکیبات و فعالیت آنزیم مشاهده گردید.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق اثر القاکنندگی پیش‌ماده‌ها بر رشد سلولی و تولید ترکیبات در غلظتهای پایین مشاهده گردید. هماهنگ با این یافته‌ها *Arnebia*گزارشاتی در این زمینه وجود دارد. به عنوان مثال، افزودن مقادیر کم فنیل الانین (۰/۰۱ یا ۰/۱ میلی‌مولار) به محیط کشت سلولی

، تکثیر سلولی را تحریک کرد، در حالی که در محیط کشت غنی شده با ۱ میلی مولار به طور قابل توجهی سرعت رشد سلول *euchroma*). افزایش ۶/۱ برابری در محتوای آنتوسیانین در حضور ۵ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین، Sykłowska-Baranek et al., 2012 کاهش یافت ( ).Qu et al., 2011 ۵۰ میلی‌گرم در لیتر متیل‌جاسمونات و ۱ میلی‌گرم در لیتر دکستران در کشت سلولی انگور به دست آمد (



شکل ۲. تغییر در میزان تولید ترکیبات فنلی، فلاونوییدها، تاکسول و فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر فنیل آلانین (Phe)، استات سدیم (SA) و اسید بنزوئیک (BA) در کشت سلولی فندق (*Corylus avellana* L.). مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و SE ± میباشد.

افزایش پیش‌ماده لوگانین به محیط کشت ریشه‌های مویی پروانش باعث افزایش تولید کاتارانتین، آجمالیسین، لوچنریسین و تابرسونین گردید (Peebles et al., 2006). همچنین نشان داده شد که فنیل آلانین، به عنوان پیش‌ماده زنجیره جانبی تاکسول، تأثیر قابل توجهی بر افزایش سنتز تاکسول در کشت سوسپانسیون سلولی دارد (Zhang et al., 2002). فیتوسولفوکین (اولیگوپپتید ۵ اسید آمینه ای) باعث افزایش تولید تاکسول در کشت سلولی *T. canadensis* و *T. cuspidata* گردید (Kim et al., 2006). همچنین کمپلکس اسیدهای آمینه باعث افزایش تولید تاکسول در کشت سلولی سرخدار گردید (Amirkavei Najafabadi et al., 2020). در این تحقیق همچنین مشاهده گردید که فعالیت انزیم PAL تحت تاثیر پیش ماده‌ها القا گردید. همانند این، افزایش فعالیت PAL، در کشت‌های سلولی *Arnebia euchroma* تیمار شده با ۱ میلی مولار Phe مشاهده شد (Sykłowska-Baranek et al., 2012). در کشت‌های سلولی مریم گلی (*Salvia miltiorrhiza*)، فعالیت PAL نیز تحت تأثیر غلظت السیتور قرار گرفت و با دو پیک مشخص شد که همزمان با دو پیک تجمع ترکیبات فنلی بود (Dong et al., 2010). در این تحقیق نیز افزایش فعالیت آنزیم PAL نسبت به کشت‌های شاهد، در سلول‌های تیمار شده مشاهده گردید که همراه با افزایش محتوای ترکیبات فنلی بود. در بالاترین سطوح تیمارها تولید مواد موثره مورد نظر کاهش نشان داد که با توجه به این‌که در این سطوح تیماری تولید ذیتوده سلولی نیز کاهش یافت بنظر می‌رسد که افت تولید اساساً به علت کاهش رشد سلول‌ها میباشد. بنظر می‌رسد افزایش تولید مواد موثره از جمله تاکسول توسط تیمارها احتمالاً در اثر القای مسیرهای بیوسنتزی و پاسخ‌های دفاعی سلول‌ها می باشد.

منابع

Amirkavei Najafabadi, B., Qavami, N., Ebrahimi, M.A., Ebrahimi, P., Zarinpanjeh, N. 2020. Enhancement of taxol production by applying amino acid complex along with chitosan in suspension culture of *Taxus baccata* L.. Journal of Medicinal Plants. 19(76): 99–109.

Bestoso, F., Ottaggio, L., Armirott, A., Balbi, A., Damonte, G., Degan, P., Mazzei, M., Cavalli, F., Ledda, B., Miele, M. 2006. *In vitro* cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce taxol and taxanes. BMC Biotechnology. doi:10.1186/1472-6750-6-45.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248–254.

Christen, A.A., Gibson, D.M., Bland, J. 1991 Production of taxol or taxol-like compounds in cell culture, US Patent 5019504.

Cusido, R.M., Palazon, J., Navia-Osorio, A., Mallol, A., Bonfill, M., Morales, C. 1999. Production of taxol and baccatin III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture. Plant Science. 146: 101–107.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry. 97: 654–660.

Dong, J., Wan, G., Liang, Z. 2010. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. Journal of Biotechnology. 148: 99–104.

Dougall, D.K., Baker, D.C., Gakh, E.G., Redus, M.A., Whittemore, N.A. 1998. Anthocyanins from wild carrot suspension cultures acylated with supplied carboxylic acids. Carbohydrates Research. 310(3): 177–189.

Edahiro, J., Nakamura, M., Seki, M., Furusaki, S. 2005. Enhanced accumulation of anthocyanin in cultured strawberry cells by repetitive feeding of L-phenylalanine into the medium. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2005: 99(1): 43–47.

Hoffman, A., Shahidi, F. 2009. Paclitaxel and other taxanes in hazelnut. Journal of Functional Foods. 1: 33–37.

Khosroushahi, A.Y., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Naghdibadi, H., Dadpour, M.R. 2006. Improved taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. Cell Biology International. 30: 262–269.

Kim, B.J., Gibson, D.M. Shuler, M.L. 2006. Effect of the plant peptide regulator, phytosulfokine -a, on the growth and Taxol production from Taxus sp. suspension cultures. Biotechnology and Bioengineering. 95: 8–14.

Ochoa-Alejo, N., Gomez-Peralta, J.E. 1993. Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal of Plant Physiology. 141: 147–152.

Peebles, C.A.M., Hong, S.B., Gibson, S.I., Shanks, J.V. San, K.Y. 2006. Effects of terpenoid precursor feeding on *Catharanthus roseus* hairy roots over-expressing the alpha or the alpha and beta subunits of anthranilate synthase. Biotechnology and Bioengineering. 93: 534–540.

Qu, J., Zhang, W., Yu, X. 2011. A combination of elicitation and precursor feeding leads to increased anthocyanin synthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 107(2): 261–269.

Sykłowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A., Naliwajski, M.R., Kawiak, A., Jeziorek, M., Wyderska, S., Lojkowska, E., Chinou, I. 2012. Effect of l-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 48(5): 555–564.

Whitmer, S., Van der Heijden, R., Verpoorte, R. 2002. Effect of precursor feeding on alkaloid accumulation by a tryptophan decarboxylase over-expressing transgenic cell line T22 of *Catharanthus roseus*. Journal of Biotechnology. 96:193–203.

Yuan, Y.J., Wei, Z.J., Miao, Z.Q., Wu, J.C. 2002. Acting paths of elicitors on taxol biosynthesis pathway and their synergistic effect. Biochemical Engineering Journal. 10: 77–83.

Zhang, C.H., Wu, J.Y. He, G.Y. 2002. Effects of inoculum size and age on biomass growth and paclitaxel production of elicitor-treated *Taxus yunnanensis* cell cultures. Applied Microbiology and Biotechnology. 60: 396–402.

Induction of cell growth and taxol production by precursor in hazelnut (*Corylus avellana*) cell culture

Ayatollah Rezaei[1]

Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran

Abstract

Manipulation of cell cultures by various factors including precursors is one of the important strategies to induce the production of valuable metabolites in plant biotechnology. For this purpose, the effect of phenylalanine, sodium acetate and benzoic acid precursors (0, 2.5, 5 and 10 mM) on growth and some physiological parameters in hazelnut cell culture was investigated. The treatments were applied in 3 replications in the form of completely randomized plots. The studied parameters were cell growth, protein content, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzyme activity, and production of phenolic compounds, flavonoids as well as taxol. The results showed that by increasing the concentration of treatments up to 5 mM, the growth and protein production increased and after that decreased. An increase in the production of phenolics and flavonoids as well as PAL enzyme activity was observed in the treated cultures compared to the control cultures. The maximum production of the compounds and PAL enzyme activity were measured at 5 mM concentration of precursors. The phenylalanine, sodium acetate and benzoic acid at concentration of 5 mM induced the production of taxol with values of 16.23, 13.56 and 15.34 µg/g of dry weight, respectively. It seems that the increase in the production of active substances such as taxol by treatments is probably due to the induction of biosynthetic pathways and defense responses of cells.

Keywords: Hazelnut (*Corylus avellana*), Cell culture, Precursor, Taxol

arezaei@shahed.ac.ir*

اهمیت ترکیبات فنولی در طبیعت و صنعت

زهرا موسوی[۱]، سعید حضرتی[۱] *، فرهاد حبیب‌زاده[۲]

[۱] گروه زراعت و گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز

[۲] گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین

چکیده

ترکیبات فنولی از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه در گیاهان به شمار می‌روند. در اکثر گیاهان دارویی، این گروه مهم از ترکیبات در اندام‌های مختلف آن‌ها اعم از ریشه ، پوست، ساقه، برگ و گل، بذر و میوه تولید و سنتز می‌شوند و به دلیل اهمیت فراوانی که در طبیعت و خواص دارویی و غذایی دارند، بسیار موردتوجه می‌باشند. این ترکیبات به‌عنوان رنگ‌دانه، جاذب موجودات به‌خصوص حشرات، زیبایی طبیعت، آنتی‌اکسیدان، حفاظت از گیاهان در برابر بیماری‌ها و عوامل نامساعد محیطی و به دلیل داشتن خواصی از جمله آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضددیابت، در صنایع مختلفی ازجمله دارویی، بهداشتی-آرایشی، غذایی و رنگ‌سازی کاربرد فراوانی دارند.

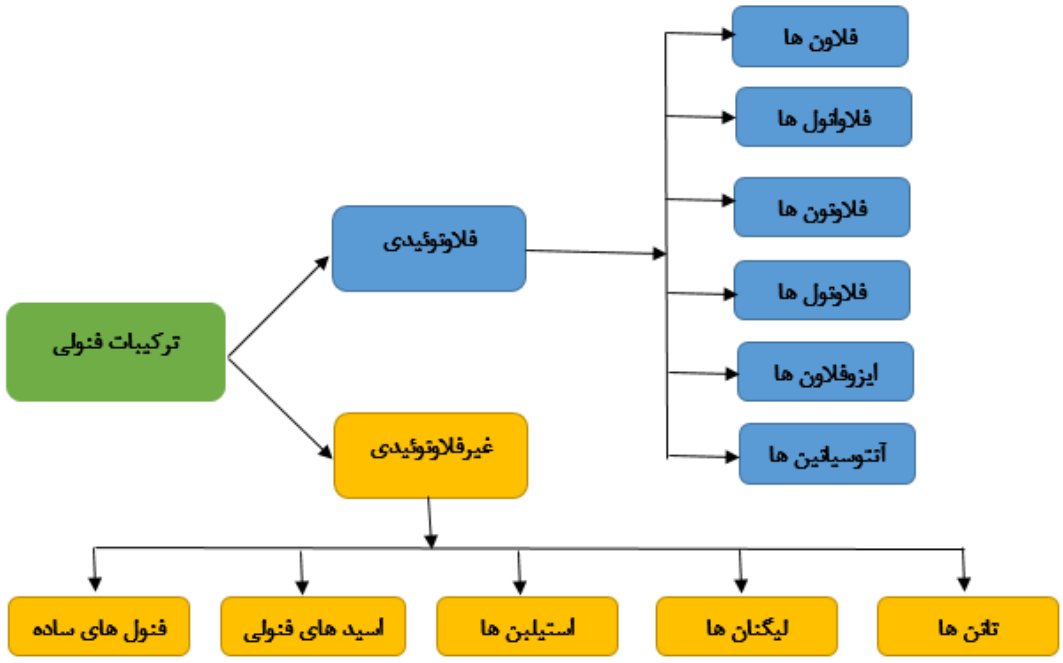
واژگان کلیدی: ترکیبات مؤثره، گیاهان دارویی، صنعت

E-mail: Saeid.hazrati@azaruniv.ac.ir

۱. مقدمه

گیاهان تنوع شگفت‌انگیزی از متابولیت‌های ثانویه را تولید می کنند که مهم‌ترین آن‌ها ترکیبات فنولی هستند. این ترکیبات پایدارترین محصولات طبیعی گیاهان دارویی هستند. در حال حاضر، بیش از ۸۰۰۰ ساختار فنولی شناخته‌شده است که از اسیدهای فنولیک ساده تا مواد پلیمریزه شده به‌عنوان‌مثال تانن را شامل می‌شود. ترکیبات فنولی فراوان‌ترین متابولیت‌های ثانویه با پراکندگی گسترده در قلمرو گیاهی هستند که در انواع گیاهان دارویی و معطر و در اندام‌های مختلف گیاهان وجود دارند (Costa et al., 2015).

سنتز و غلظت فنولیک‌های انباشته‌شده به بسیاری از عوامل داخلی و خارجی مانند فیزیولوژی گیاه، سن، مرحله رشد، اندام دارویی، عوامل محیطی و غیره بستگی دارد. این ترکیبات توسط مسیر شیکیمات بیوسنتز می‌شوند. مسیر شیکیمات در گیاهان در کلروپلاست قرار دارد. این ترکیبات دارویی و معطر، نقش مهمی به‌عنوان رنگ‌دانه‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، عوامل سیگنال دهنده، انتقال الکترون، ارتباط، عنصر ساختاری لیگنان، و به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی دارند. همچنین به دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی در صنایع مختلف نیز مورد استفاده قرارمی‌گیرند (Kumar et al., 2022). ترکیبات فنولی دارای ساختار شیمیایی مشترکی هستند که شامل یک حلقه معطر با یک یا چند جایگزین هیدروکسیل است که می‌توان آن‌ها را به چند دسته تقسیم نمود. گروه‌های اصلی ترکیبات فنولی شامل فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک، تانن‌ها، استیلبن‌ها و لیگنان‌ها هستند (شکل ۱).



شکل ۱: طبقه‌بندی ترکیبات فنولی

این بررسی با هدف ایجاد چشم‌اندازی برای مطالعات و استفاده عملی از این ترکیبات در آینده، شرح کوتاهی در مورد کاربردها و اهمیت ترکیبات فنولی در طبیعت و صنعت را ارائه می‌نماید.

۲. اهمیت ترکیبات فنولی در طبیعت

فلاونوئیدها شامل گروهی از فنیل پروپانوئیدها هستند که به‌عنوان رنگ‌دانه‌های محلول در آب در واکوئل سلول‌های گیاهی ذخیره می‌شوند. برخی از فلاونوئیدها نقش مهمی در رشد و دفاع گیاه دارند. فلاونوئیدها گروهی از رنگ‌دانه‌های اصلی گیاهان مانند آنتوسیانین‌ها (رنگ‌دانه‌های قرمز، نارنجی، آبی و بنفش) چالکون‌ها و آئورون‌ها (رنگ‌دانه‌های زرد) و فلاونول‌ها و فلاون‌ها (رنگ‌دانه‌های سفید و زرد کم‌رنگ)، که طیف گسترده‌ای از رنگ‌ها را به گیاهان می‌دهند را شامل می‌شوند. این رنگیزه‌ها با ایجاد رنگ‌های متنوع در گیاهان، جذابیت بصری زیبایی را به طبیعت می‌بخشند. فلاونوئیدها به‌عنوان فیتوالکسین‌ها یا آنتی‌اکسیدان‌ها، توانایی مهار گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) رادارند و از گیاهان در برابر آسیب‌های ناشی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی، ازجمله تابش اشعه ماوراءبنفش، استرس سرما، عفونت پاتوژن و تغذیه حشرات محافظت می‌کنند. در گیاهان، فلاونوئیدها همچنین می‌توانند به‌عنوان مولکول‌های سیگنالی عمل نموده، حشرات را برای گرده‌افشانی جذب کرده و در متابولیسم اکسین شرکت کنند (Liu et al.,2021).

آنتوسیانین‌ها ترکیبات طبیعی هستند که بیشتر به دلیل رنگ‌های قرمز، آبی و بنفش که در گیاهان ایجاد می‌کنند، از تنوع گسترده رنگ‌ها و نقش‌های گل گرفته تا شادابی شاخ و برگ‌های پاییزی شناخته می‌شوند. پیشنهاد شده است که وجود آنتوسیانین در بافت رویشی از فتوسیستم‌های فتوسنتزی با جذب نور اضافی محافظت می‌کند؛ تحمل به خشکی، سرما، شوری بالا و کمبود مواد مغذی را افزایش می‌دهد و در برابر گیاه‌خواری و عوامل بیماری‌زا دفاع می‌کند. آنتوسیانین‌ها نقش مهمی در گل‌ها و میوه‌ها برای جذب گرده‌افشان‌ها و پخش‌کننده‌های بذر بر عهده دارند. عملکرد گسترده این ترکیبات تا حدی به دلیل تکامل تنظیم پیچیده مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین است، که امکان محلی سازی مناسب، زمان‌بندی و شدت بهینه رسوب رنگ‌دانه در بافت‌های مختلف را فراهم می‌کند (Alappat and Alppat, 2020).

تانن‌ها فراوان‌ترین متابولیت‌های ثانویه هستند که توسط گیاهان ساخته شده و معمولاً بین ۵ تا ۱۰ درصد وزن خشک برگ درختان را شامل می‌شوند. کاربرد بالقوه تانن‌های گیاهی به‌عنوان افزودنی در تولید خوراک دام بسیار زیاد است برخی از نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که تانن‌های گیاهی می‌توانند به‌طور مؤثری کیفیت گوشت و شیر را بهبود بخشند و پایداری اکسیداتیو محصول را افزایش دهند و همچنین می‌توانند با بازدارندگی و/یا ایجاد سمیت، از برگ‌ها در برابر حشرات علف خوار محافظت کنند. کومارین‌ها نیز با ایجاد طعم تلخ ،حیوانات را از خوردن گیاهان حاوی مقادیر زیادی از این ترکیبات منع می‌کنند (Tong et al., 2022).

لیگنین و متابولیسم مربوط به آن نقش مهمی در رشد و نمو گیاهان دارند. لیگنین به‌عنوان یک پلیمر فنولی پیچیده، سفتی دیواره سلولی گیاه و خواص آب‌گریزی را افزایش داده و انتقال مواد معدنی را از طریق بسته‌های آوندی در گیاه بهبود می‌بخشد. علاوه بر این، لیگنین مانع مهمی است که از آسیب آفات و عوامل بیماری‌زا محافظت می‌کند. متابولیسم لیگنین همچنین می‌تواند به‌طور فعال در مقاومت گیاه و در پاسخ به تنش‌های محیطی مختلف نقش داشته باشد؛ لیگنین می‌تواند به‌عنوان یک مانع به‌طور مستقیم یا از طریق مسیر سیگنال هورمونی مرتبط برای افزایش مقاومت گیاهان به حشرات استفاده شود. کومارین‌ها در برابر گیاهخواران سمیت دارند (Liu et al., 2018).

۳. اهمیت و کاربرد ترکیبات فنولی در صنعت

ترکیبات فنولی می‌توانند از بیماری‌هایی مرتبط با گونه‌های فعال اکسیژن محافظت کنند و همچنین به‌عنوان عوامل کاهنده، اهداکننده هیدروژن و خاموش‌کننده‌های اکسیژن منفرد عمل می‌کنند. در سال‌های اخیر توجه بیشتری به منابع طبیعی آنتی‌اکسیدان‌ها شده است؛ بنابراین، این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در تحمل تنش گیاهی و ارتباط بالایی در سلامت انسان دارند که عمدتاً به دلیل خواص ضدالتهابی و ضد میکروبی است. علاوه بر این، ترکیبات فنولی در صنایع غذایی به‌عنوان مواد نگهدارنده، رنگ‌دانه‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها و همچنین در صنایع دیگری مانند آرایشی و بهداشتی و داروسازی کاربردهای متعددی دارند(Albuquerque et al., 2021).

ترکیبات فنولی، متابولیت‌های ثانویه هستند که به مقدار قابل‌توجهی در گیاهان دارویی وجود دارند و به دلیل اثرات مثبتی که روی غذا به‌عنوان ضد باکتری و آنتی‌اکسیدان دارند، اصلی‌ترین مواد تشکیل‌دهنده غذاها هستند. این ترکیبات به‌عنوان نگهدارنده مواد غذایی، مواد بسته‌بندی و تقویت‌کننده مواد غذایی استفاده می‌شوند که به دلیل ماهیت محافظتی آن‌هاست. فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی ترکیبات فنولی که توسط عصاره‌های گیاهی به دست می‌آید، برای استفاده به‌عنوان نگهدارنده بسیار مهم بوده است؛ بنابراین، این ترکیبات ماندگاری چندین ماده غذایی را افزایش می‌دهند. بسته‌بندی با استفاده از منابع طبیعی مانند استفاده از ترکیبات فنولی گزینه بهتری است که از مواد غذایی محافظت می‌کند، به‌طور هم‌زمان به‌عنوان یک افزودنی برای بهبود خواص آنتی‌اکسیدانی غذاها و جذب مواد ناخواسته مانند فلزات سنگین یا روغن‌های تخلیه‌شده و محافظت در برابر اکسیداسیون، اشعه ماوراءبنفش و تخریب مبتنی بر رطوبت عمل می‌کند. میوه‌های پوشش داده‌شده با تانن همچنین پارامترهای بیوشیمیایی مثبت‌تری را نشان دادند که با ماندگاری بهتر میوه، مانند کل مواد جامد محلول، سرعت تنفس و محتوای کلروفیل مرتبط است. ازاین‌رو، بسته‌بندی و مواد پوششی مبتنی بر تانن ممکن است در صنایع غذایی مؤثرتر و دوستدار محیط‌زیست باشد (Caleja et al., 2017; Singh and Kumar, 2020).

در حال حاضر، علاقه زیادی به لوازم آرایشی و بهداشتی تهیه‌شده بر اساس منابع طبیعی وجود دارد و این ممکن است استفاده از مواد مصنوعی را محدود کند. گیاهان نقش مرتبطی را به‌عنوان منبع محصولات طبیعی فعال بیولوژیکی با اهمیت

آرایشی و پوستی ایفا می‌کنند. با توجه به این موضوع، نقش عصاره‌های فنولی برجسته می‌شوند زیرا آن‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدپیری، ضدمیکروبی و حمایت‌کننده در محافظت از نور خورشید هستند. ترکیبات فنولی می‌توانند اشعه ماوراءبنفش را به دلیل وجود کروموفورها در ساختار خود جذب کند و از نفوذ تابش خورشیدی به پوست جلوگیری کند و در صنایع آرایشی با کاربرد این ترکیبات در تولید کرم‌ها می‌توان به کاهش چین‌وچروک و سفیدسازی پوست کمک نمود (Cherubim et al., 2020).

در صنعت نساجی به دلیل آلودگی مقادیر زیادی آب با بار سنگینی از مواد شیمیایی، و از سوی دیگر، ایجاد واکنش‌های آلرژیک بارنگ‌های مصنوعی، علاقه به استفاده از ترکیبات فنولی به‌عنوان رنگ‌های طبیعی باقابلیت تجزیه زیستی بالا افزایش‌یافته است رنگ‌های طبیعی به‌دست‌آمده از پوست درخت بلوط و عصاره‌های چای قرمز، سیاه و سبز ، هنگام استفاده در ابریشم و پنبه توسا، محافظت در برابر اشعه ماوراءبنفش نشان دادند. آنتوسیانین‌ها ترکیبات فنولی هستند که رنگ قرمز-بنفش جذابی را برای بافت‌های گیاهی ایجاد می‌کنند. استفاده از آن‌ها به‌عنوان یک افزودنی رنگ‌آمیزی طبیعی مجاز است. بااین‌حال، محدودیت‌های فن‌آوری، مانند پایداری کم و تخریب نوری، برخی از موانع برای استفاده صنعتی آن‌ها هستند (Albuquerque et al., 2021).

در صنعت چرم و دباغی، معمولاً از تانن برای تبدیل پوست حیوانات به چرم استفاده می‌شود. نقش اصلی تانن‌ها محافظت از چرم در برابر میکروارگانیسم‌ها و تخریب ناشی از گرما است. تانن‌ها با پروتئین‌های پوست پیوند می‌خورند و از آن در برابر سنگ شدگی محافظت می‌کنند که به دلیل خاصیت ضد باکتریایی تانن‌ها است. برای غلبه بر مشکل آلودگی حاصل از کروم در چرم‌سازی و خاصیت سرطان‌زایی آن، تانن‌های گیاهی می‌توانند جایگزین کروم در فرآوری چرم شوند که استفاده از این ترکیبات مزایای زیادی مانند محصولات چرمی باکیفیت بالا و پایداری حرارتی دارند(Singh and Kumar, 2020) .

ترکیبات فنولی دارای خواص دارویی مهمی هستند و فواید زیادی برای سلامتی انسان‌ها دارند و به دلیل داشتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی به کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از بیماری‌های مزمن، سکته مغزی و سرطان کمک می‌کند. این ترکیبات در برابر تکامل چندین بیماری جدی دیگر مانند آلزایمر و دیابت نیز اثر مهارکنندگی نشان داده‌اند. این اثرات مفید عمدتاً به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌ها نسبت داده می‌شوند که می‌توانند اکسیداسیون را به تأخیر بیندازند یا مهار کنند (Dias et al., 2021).

دیابت یک بیماری مزمن است که بخش قابل‌توجهی از جمعیت را تحت تأثیر قرار می‌دهد. تعداد بیماران دیابتی سال‌به‌سال در حال افزایش است. استرس اکسیداتیو به‌عنوان پیش ساز اختلال دیابت نشان داده‌شده است. درواقع، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) که خنثی نمی‌شوند منجر به شرایط التهابی در بدن می‌گردند. بنابراین، عملکرد آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی در درمان دیابت موردمطالعه قرارگرفته است. آنتوسیانین‌ها یک اثر مهاری در برابر آنزیم‌های α-آمیلاز و α-گلوکوزیداز نشان داده‌اند که منجر به کاهش هیدرولیز کربوهیدرات‌ها در منوساکاریدها می‌شود و سطح گلوکز خون در موش‌های دیابتی را کاهش می‌دهد. بیماری‌های قلبی عروقی به‌شدت با عادات غذایی مرتبط هستند. بنابراین، رژیم غذایی مبتنی بر میوه‌ها، غلات و سبزی‌ها برای جلوگیری از این بیماری‌ها توصیه می‌شود. برخی از ترکیبات فنولی به دلیل خواص زیست فعال خود، یعنی گشادکننده عروق، ضد پلاکت و توانایی کاهش فشارخون و کلسترول ، عملکرد محافظتی قلبی از خود نشان داده‌اند. ترکیبات فنولی مختلف به

دلیل فعالیت ضد زخم زایی به‌عنوان ترکیبات مؤثری برای محافظت معده گزارش‌شده‌اند. این ترکیبات فنولی علاوه بر عملکرد محافظتی معده می‌توانند جایگزینی برای درمان زخم معده نیز باشند (Sumbul et al., 2011; Lin et al., 2018; Albuquerque et al., 2021).

٤. نتیجه‌گیری

همان‌طور که گفته شد، ترکیبات فنولی به‌عنوان افزودنی در صنایع غذایی، رنگ‌ساز طبیعی در صنایع نساجی و خاصیت‌های دارویی در صنایع دارویی و بهداشتی اهمیت دارند. در طبیعت نیز به دلیل داشتن رنگیزه‌های متفاوت باعث ایجاد زیبایی و تنوع در گیاهان می‌شوند و از آن‌ها در برابر عوامل نامساعد محیطی و عوامل بیماری‌زا محافظت می‌کنند. با این‌حال، هنوز خلأهایی وجود دارد که نیاز به مطالعه و انجام آزمایش‌ها متعدد دارند تا استفاده از این ترکیبات در صنعت به مقیاس بزرگی برسد و مصرف آن‌ها مؤثر و کارآمد باشد.

منابع

Alappat, B., Alappat, J. 2020. Anthocyanin pigments: Beyond aesthetics. Molecules. 25(23): 5500.
Albuquerque, B.R., Heleno, S.A., Oliveira, M.B.P., Barros, L., Ferreira, I.C. 2021. Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. Food and Function. 12(1):14-29.
Caleja, C., Ribeiro, A., Filomena Barreiro, M., CFR Ferreira, I. 2017. Phenolic compounds as nutraceuticals or functional food ingredients. Current Pharmaceutical Design. 23(19): 2787-2806.
Costa, D.C., Costa, H.S., Albuquerque, T.G., Ramos, F., Castilho, M.C., Sanches-Silva, A. 2015. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. Trends in Food Science and Technology. 45(2):336-354.
De Lima Cherubim, D.J., Buzanello Martins, C.V., Oliveira Fariña, L., da Silva de Lucca, R.A. 2020. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. Journal of Cosmetic Dermatology. 19(1):33-37.
Dias, M.C., Pinto, D.C., Silva, A.M. 2021. Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. Molecules. 26(17):53-77.
Kumar, S., Abedin, M.M., Singh, A.K., Das, S. 2020. Role of phenolic compounds in plant-defensive mechanisms. Plant Phenolics in Sustainable Agriculture. 1:517-532.
Lin, H.Y., Chang, T.C., Chang, S.T. 2018. A review of antioxidant and pharmacological properties of phenolic compounds in *Acacia confusa*. Journal of Traditional and Complementary Medicine. 8(4): 443-450.
Liu, Q., Luo, L., Zheng, L. 2018. Lignins: biosynthesis and biological functions in plants. International Journal of Molecular Sciences. 19(2):335.
Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., Yin, H. 2021. The flavonoid biosynthesis network in plants. International Journal of Molecular Sciences, 22(23): 12824.
Singh, A.P., Kumar, S. 2020. Applications of tannins in industry. Tannins-structural properties. Biological Properties and Current Knowledge. 1-13.
Sumbul, S., Ahmad, M.A., Mohd, A., Mohd, A., 2011. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. 3(3): 361.
Tong, Z., He, W., Fan, X., Guo, A. 2022. Biological function of plant tannin and its application in animal health. Frontiers in Veterinary Science. 8: 1597.

The importance of phenolic compounds in nature and industry

, Farhad Habibzadeh[2] *Zahra Mousavi [1], Saeid Hazrati [1]

[1]Department of Agronomy and Medicinal Plants, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
[2]Departmet of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

Abstract

Phenolic compounds are among the most important secondary metabolites in plants. In most of the medicinal plants, this important group of compounds are produced and synthesized in their various organs, such as roots, bark, stems, leaves and flowers, seeds and fruits, and due to their great importance in nature and their medicinal and food properties. These compounds act as pigments, attract organisms, especially insects, are natural beauty, antioxidants, and protect plants against diseases and adverse environmental factors, and due to having properties such as antioxidant, anti-microbial and anti-diabetic, they are widely used in various industries, including pharmaceutical, cosmeceutical, food and colorants.

Keywords: Active ingredients, Medicinal plants, Industry

* E-mail: saeid.hazrati@azaruniv.ac.ir

اهمیت میکوریزها در بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی

ناهید معرف‌زاده*، هادی خاطری

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

چکیده

امروزه در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته، تقاضا برای گیاهان دارویی روز به روز در حال افزایش است. ارزش دارویی و درمانی این گیاهان در درجه اول به وجود و غنای متابولیت‌های ثانویه موجود در آن‌ها نسبت داده می‌شود. عوامل تنش‌زای زیستی و نازیستی بر ویژگی‌های رویشی، کارکرد اسانس و ترکیب شیمیایی متابولیت‌های ثانویه این گیاهان تأثیر به‌سزایی دارند. قارچ‌های میکوریزی دارسانه‌ای (AMF) گروهی از ریزجانداران سودمند همزیست با ریشه گیاهان هستند که می‌توانند با افزایش تحمل گیاه میزبان خود در برابر تنش‌های گوناگون، افزایش دسترسی آن به آب و عناصر غذایی و نیز افزایش زیست توده و تغییر متابولوم گیاه، نقش مهمی در سلامت، رشد و بهره‌وری و بهبود خواص کمی و کیفی متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی داشته باشند. این حوزه پژوهشی، رویکردی بسیار با اهمیت برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان معطر و دارویی است و بهره‌گیری از این یافته‌ها می‌تواند پتانسیل بالایی در ارتقای کمیت و کیفیت این ترکیبات در صنایع پزشکی و آرایشی داشته باشد. این نوشته مروری، به برخی یافته‌های نوین درباره اثرات AMF بر افزایش تولید یا کیفیت متابولیت‌های ثانویه، عوامل تأثیرگذار بر دگرگونی متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی دارای همزیستی میکوریزی و نیز مکانیسم‌های افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه توسط AMF در گیاهان، پرداخته است.

واژه‌های کلیدی : قارچ‌های میکوریزی دارسانه‌ای ، ترکیبات زیست‌فعال ، همزیستی

* n.moarrefzadeh@razi.ac.ir

۱. مقدمه

امروزه در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته، تقاضا برای گیاهان دارویی به دلیل شناخت روزافزون فرآورده‌های طبیعی و مقادیر بالای ترکیبات دارویی، تأثیر درمانی منحصر به فرد، غیرسمی و بی‌خطر بودن برای انسان و محیط زیست، فاقد یا دارای کمترین عوارض جانبی بودن و قیمت شایسته آن‌ها، روز به روز در حال افزایش است (Chen *et al.*, 2014; Raghuwanshi and Sinha, 2014; Zhan *et al.*, 2020). از سوی دیگر افزایش جمعیت بشر، عرضه ناکافی داروها، عوارض جانبی برخی داروها و ایجاد مقاومت در برابر داروهایی که در حال حاضر برای بیماری‌های عفونی به کار می‌روند، توجه به سمت کاربرد گیاهان دارویی را جهت طیف گسترده‌ای از بیماری‌های انسانی، بیشتر معطوف کرده است (Chen *et al.*, 2014). این در حالی است که استخراج بیش از حد این گیاهان، به تخریب و زوال زیستگاه‌های طبیعی آن‌ها منجر شده و چنین منابعی را تهدید و در آستانه انقراض قرار داده یا رشد موفق آن‌ها را به‌خطر انداخته است (Ullah *et al.*, 2020).

ارزش و پتانسیل بالای دارویی و درمانی گیاهان دارویی در درجه اول به به وجود و غنای (مقدار) متابولیت‌های ثانویه موجود در آن‌ها نسبت داده می‌شود (Pandey *et al.*, 2018; Hussein and A. El-Anssary, 2019; Singh *et al.*, 2022). متابولیت‌های ثانویه به روش‌های خاصی با برخی آنزیم‌های بیوسنتزی در بافت‌ها، اندام‌ها و قسمت‌های رشدی گیاه سنتز شده و اساساً با مسیرهای ژنتیکی تولید می‌شوند. درعین‌حال، فاکتورهای محیطی و عوامل تنش‌زای زیستی و نازیستی بر پارامترهای رشدی، کارکرد اسانس و ترکیب شیمیایی آن‌ها تأثیر به‌سزایی دارند (Aziz *et al.*, 2008; Zehtab-Salmasi *et al.*, 2008; Şirin *et al.*, 2022). عوامل تنش‌زای زیستی شامل آلودگی‌های قارچی، باکتریایی، ویروسی و دیگر ریزجانداران و تهاجم آفات و جانوران مضر بوده و خشکی، شوری، کمبود مواد غذایی، دماهای مفرط، فلزات سنگین و غیره جزو عوامل غیر زیستی محسوب می‌شوند (Lichtenthaler, 1996). در سامانه‌های کشاورزی فشرده، به دلیل تأثیر مستقیم آفات و بیماری‌ها بر کارکرد و کیفیت گیاهان دارویی و نیز جهت افزایش بهره‌وری گیاه، به‌طور گسترده از نهاده‌های شیمیایی مانند کودها، آفت‌کش‌ها و علف‌کش‌های شیمیایی به‌کار می‌رود (Ostadi *et al.*, 2020). این موضوع، افزون بر مخاطرات بسیار برای سلامت انسان، اثرات منفی بر اکوسیستم‌های طبیعی داشته و سبب آلودگی آب و هوا، اسیدی شدن و تخلیه مواد معدنی خاک و فرسایش آن و غیره می‌شود (Amani Machiani *et al.*, 2019). افزون بر این، بهره‌گیری بیش از حد از کودهای شیمیایی (به ویژه دوزهای بالاتر کودهای ازته) و آفت‌کش‌ها، کارکرد ترکیبات زیست‌فعال را در گیاهان دارویی و معطر کاهش داده و بر کیفیت فرآورده‌های دارویی آن‌ها تأثیر سوء می‌گذارد (Chen *et al.*, 2014; Strzemski *et al.*, 2021; Javanmard *et al.*, 2022).

بسیاری از گیاهان دارویی در دسترس هستند که به دلیل کاربردهای دارویی، فراورده‌های متابولیت ثانویه آن‌ها به‌خوبی شناخته شده‌اند اما مواد خام کافی برای تولید تجاری تولید نمی‌کنند (Chaudhury and Pal, 2010). ناکافی بودن تولید این متابولیت‌ها برای مقاصد تجاری و محدودیت تحمیل شده با دوره رشد کوتاه این گیاهان از یک‌سو (Kumar *et al.*, 2021)، و تأثیر منفی بهره‌گیری از نهاده‌های شیمیایی گوناگون بر کمیت و کیفیت مواد مؤثره این گیاهان و دیگر موارد گفته شده در بالا از سوی دیگر سبب شده توسعه فن‌آوری‌ها و روش‌های سازگار با محیط زیست برای کشت گیاهان دارویی ضروری باشد.

راهکارهای نوآورانه‌ای که بتوانند ضمن افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه و امکان بهره‌گیری مؤثر از این مخازن زیستی، تأثیر منفی بهره‌گیری از نهاده‌های شیمیایی گوناگون بر کمیت و کیفیت مواد مؤثره این گیاهان را کاهش دهند (Chen *et al.*, 2014; Johny *et al.*, 2021; Amani Machiani *et al.*, 2022).

در طبیعت، گیاهان با تعداد زیادی از ریزجانداران سودمند (مانند باکتری‌ها و قارچ‌های اندوفیت یا همزیست) در پیوند هستند و این موجودات نقش مهمی در سلامت، رشد و بهره‌وری گیاه و تعدیل سنتز متابولیت‌ها دارند (de Vries *et al.*, 2020; Compant *et al.*, 2021; Moarrefzadeh *et al.*, 2021b). قارچ‌های میکوریزی دارسانه‌ای[1] ازجمله میکروارگانیسم‌های فعال موجود در ریزوسفر گیاه هستند که می‌توانند با بیش از ۸۰ درصد گونه‌های گیاهی، پیوندهای همزیستی متقابل ایجاد کنند (Amani Machiani *et al.*, 2022). آن‌ها بافت کورتکس ریشه‌ها را در مرحله رشد فعال گیاه کلنیزه نموده (Şirin *et al.*, 2022) و در ازای دریافت کربوهیدرات‌های گیاهی که برای انجام چرخه زندگی آن‌ها ضروری است (Raei and Weisany, 2013)، می‌توانند تحمل گیاه را در همسنجی با تنش‌های گوناگون نازیستی (Begum *et al.*, 2019) و زیستی بهبود بخشند (Song *et al.*, 2015; Moarrefzadeh *et al.*, 2021a; Rivero *et al.*, 2021). از این روی، AMF جهت مهار زیستی آفات و بیماری‌های گیاهی و کاهش بهره‌گیری از سموم شیمیایی، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Mustafa *et al.*, 2017). افزون بر این، گسترش ریسه‌های این قارچ‌ها به شکل رشته‌های منشعب، سبب افزایش ظرفیت جذب ریشه‌ها به ویژه در شرایط کمبود مواد غذایی شده و دسترسی گیاه به آب و عناصر غذایی اصلی مانند نیتروژن، فسفر، پتاسیم، گوگرد و یا عناصر کم تحرک مانند آهن، مس و روی را افزایش می‌دهند (Emmanuel and Babalola, 2020; Krzyzaniak *et al.*, 2021). یکی دیگر از مزایای همزیستی AMF و گیاهان میزبان، افزایش زیست توده گیاه است (Bowles *et al.*, 2016; Moarrefzadeh *et al.*, 2021b). افزون بر این، AMF می‌توانند متابولوم گیاه میزبان خود را به طور قابل‌توجهی دگرگون ساخته (Kilam *et al.*, 2017; Kaur and Suseela, 2020) و از دیدگاه کمی و کیفی بر تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه تأثیر بگذارند (Salam *et al.*, 2017; Kaur and Suseela, 2020).

مانند بسیاری از گیاهان خشکی‌زی دیگر، اکثر گیاهان دارویی در ریشه‌های خود قادر به تشکیل همزیستی‌های میکوریزی با AMF بوده و از اثرات مثبت این همزیستی بهره می‌برند (Pandey *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2021)؛ همزیستی AMF–گیاه نه تنها در سازگاری زیستگاهی گیاهان دارویی بسیار مهم است (Sun *et al.*, 2021)، بلکه اثرات مثبتی بر جذب مواد غذایی و آب، افزایش رشد و زیست توده، بهره‌وری و کیفیت فرآورده‌های، بهبود ساختار وحاصلخیزی خاک و افزایش تحمل گیاه به شرایط تنش و بهبود خواص کمی و کیفی متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی و معطر دارد (Chen *et al.*, 2014; Amani Machiani *et al.*, 2022; Iakab *et al.*, 2022). در دهه اخیر، پژوهش‌ها بسیاری اثرات مثبت AMF را بر افزایش تولید و تجمع ترکیبات زیست‌فعال و متابولیت‌های ثانویه مهم در گیاهان دارویی گزارش کرده‌اند (Kumar *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022). در حال حاضر، این حوزه پژوهشی بسیار مهم بوده و رویکردی قوی برای افزایش ترکیبات زیست‌فعال در گیاهان معطر و دارویی است

[1] Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF

و بهره‌گیری از دانش انتشار یافته آن می‌تواند در صنایع پزشکی و آرایشی، پتانسیل بالایی در ارتقای کمیت و کیفیت مواد دارویی داشته باشد. از این روی، در این مقاله مروری تلاش شده ضمن اشاره به اهمیت متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی، به برخی

یافته‌های معاصر در زمینه اثرات AMF بر کارکرد و تولید یا تجمع متابولیت‌های ثانویه اصلی و عوامل تأثیرگذار بر دگرگونی متابولیت‌های ثانویه در این گیاهان بپردازد. همچنین به مکانیسم‌هایی که به‌واسطه آن‌ها AMF تولید متابولیت‌های ثانویه را در گیاهان تغییر (افزایش) می‌دهند، اشاره شده است.

۲. نتایج :

۱. متابولیت‌های ثانویه گیاهی

گیاهان مانند یک کارخانه شیمیایی هستند که مجموعه عظیمی از متابولیت‌های ثانویه یا ترکیبات زیست‌فعال را بیوسنتز می‌کنند (Toussaint *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2014; Raghuwanshi and Sinha, 2014). متابولیت‌های ثانویه، مولکول‌های کوچکی از طبیعت آلی هستند که برخلاف متابولیت‌های اولیه منفرد که در سراسر قلمرو گیاهی در دسترس هستند، توزیع محدودتر و کارکرد تخصصی‌تری داشته و محدود به برخی گروه‌های تاکسونومیکی هستند (Pedone-Bonfim *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2021). این ترکیبات، اگرچه به‌طور مستقیم در رشد گیاه دخالت ندارند، اما گیاهان آن‌ها را برای چیرگی بر تنش تولید می‌کنند (Scagel and Lee, 2012) و نقش مهمی در سازگاری آن‌ها با محیط خود دارند (Raghuwanshi and Sinha, 2014). همچنین، بسیاری از عملکردهای مهم دیگر مانند کنشگری کاتالیزوری، دفاعی، سیگنال‌دهی، گرده‌افشانی و پراکندگی دانه، عوامل آللوپاتیک و غیره را در گیاه انجام می‌دهند (Pandey *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2021; Amani Machiani *et al.*, 2022). از این روی، درحالی‌که شاید برای زندگی گیاه ضروری نباشند، می‌توانند برای بقای گیاه و موفقیت آن در باروری، حائز اهمیت باشند (Pedone-Bonfim *et al.*, 2015). افزون بر این، متابولیت‌های ثانویه به‌دست‌آمده از گیاهان، منابع مهم و تا حدودی منحصربه فرد از داروها، رایحه‌ها، رنگ‌ها، افزودنی‌های مواد غذایی و عوامل طعم‌دهنده و آفت‌کش هستند (Raghuwanshi and Sinha, 2014; Kumar *et al.*, 2021). از این روی، برای بشر سودمند بوده و از اهمیت تجاری بالایی برخوردارند (Kumar *et al.*, 2021). ازاین‌رو، افزایش تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی از اهمیت بالایی در صنعت کشت این گیاهان برخوردار است (Raei and Weisany, 2013).

مجموعه متابولیت‌های ثانویه در یک گونه گیاهی عمدتاً به طبیعت خاک، شرایط آب و هوایی و ارتفاع منطقه بستگی دارد. (Pandey *et al.*, 2018). همچنین، تولید متابولیت‌های ثانویه و در نتیجه کنشگری گیاهان دارای پتانسیل دارویی می‌تواند تحت تأثیر عوامل مختلفی ازجمله فصل، چرخه روز و شب، سن گیاه، در دسترس بودن عناصر غذایی، دما، اشعه فرابنفش، غلظت

دی‌اکسید کربن، محرک‌های مکانیکی و حمله بیمارگرها نیز قرار گیرد (Gobbo-Neto and Lopes, 2007; Ghasemzadeh *et al.*, 2010).

میکروب‌ها نقش بنیادینی در انباشت متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارند و برخی از آن‌ها مانند ریزوباکتری‌های پیش‌برنده رشد گیاه (PGPR) و میکوریزها بر تجمع مواد شیمیایی گیاهی زیست‌فعال در گیاهان دارویی تأثیر می‌گذارند (Pandey *et al.*, 2018). به دنبال اثبات حضور AMF در گیاهان دارویی (Taber and Trappe, 1982)، توانایی بسیاری از گیاهان دارویی در ایجاد ارتباط با قارچ‌های میکوریزی روشن شد (Zhao *et al.*, 2022) و پژوهشگران در سراسر جهان تأثیر میکوریزها بر تولید متابولیت‌های ثانویه را بررسی کردند.

۱.۱ .تأثیر هم افزایی AMF بر تولید یا تجمع متابولیت‌های ثانویه اصلی موجود در گیاهان دارویی

در طول دوره رشد و نمو گیاهان، متابولیت‌های ثانویه گوناگون با عملکردهای متفاوت تولید می‌شوند (Raei and Weisany, 2013). در ادامه به گروه‌های مهم متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی همراه با مثال‌هایی که در آن‌ها مایه‌زنی AMF سبب افزایش تولید این ترکیبات شده، اشاره گردیده است.

۱.۱.۱ .ترپنوئیدها

ترپنوئیدها ترکیبات زیست‌فعال اصلی اسانس‌ها هستند (Amani Machiani *et al.*, 2022). اسانس‌ها نیز مخلوط‌های چربی‌دوست غلیظ و فرّار متابولیت‌های ثانویه هستند که بیشتر از مونوترپن‌ها، سسکویی‌ترپن‌ها و فنیل پروپانوئیدها تشکیل شده‌اند و به دلیل خواص طعم و عطر مشخص، در صنایع غذایی و دارویی به‌عنوان طعم‌دهنده و معطر به کار می‌روند (Amani Machiani *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2022).

اثرات AMF بر غلظت ترپنوئیدها یا اسانس‌ها در گیاهان دارویی در سال‌های اخیر مورد توجه بسیار قرار گرفته است (Chen *et al.*, 2014). طبق چند پژوهش گزارش شده مایه‌زنی AMF کمیت و کیفیت این گروه از متابولیت‌های ثانویه را بهبود می‌بخشد. مثلاً، مایه‌زنی میکوریز *Gigaspora albida* به گیاه دارویی *Andrographis paniculata* سبب افزایش غلظت بالای آندروگرافولید (جزء اصلی دارویی آن) در این گیاه گردیده است (Radhika and Rodrigues, 2011). مایه‌زنی میکوریز *Funneliformis mosseae* به گیاهچه‌های آویشن در شرایط تنش خشکی، کمیت و کیفیت اسانس را از طریق افزایش ترکیبات اصلی اسانس مانند تیمول، p-cymene و g-terpinene بهبود بخشیده است (Amani Machiani *et al.*, 2021). همچنین گزارش شده میکوریزهای *Glomus macrocarpum* و *G. fasciculatum* در برگ‌های درمنه (*Artemisia annua* L.)، به‌طور قابل‌توجهی غلظت ترپنوئید آرتمیزینین، که یک لاکتون سسکوئی‌ترپن مهم موجود در این گیاه بوده و بر مالاریا و سرطان مؤثر است را افزایش داده‌اند (Kapoor *et al.*, 2007; Krishna *et al.*, 2008). فورسکولین، دی‌ترپنی است که به‌طور گسترده برای تیمار بیماری‌های قلبی، آسم و انواع خاصی از سرطان‌ها به‌کار می‌رود (Kavitha *et al.*, 2010). مایه‌زنی گیاه *Coleus forskohlii* با میکوریز *Glomus bagyarajii* سبب شده میزان فورسکولین در ریشه‌های این گیاه به طور قابل توجه افزایش یابد (Sailo and Bagyaraj, 2005).

۲.۱.۱. آلکالوئیدها

آلکالوئیدها ترکیبات آلی دارای نیتروژن هستند که به‌طور معمول با گیاهان یا به‌عنوان ترکیبات دفاعی (Pedone-Bonfim *et al.*, 2015; Yeshi *et al.*, 2022) در پاسخ به آفات، بیماری‌ها، شکارچیان یا دیگر محرک‌های بیرونی، تولید شده (Jan *et al.*, 2021) و در اندام‌های گوناگون گیاهان دارویی یافت می‌شوند (Zhao *et al.*, 2022). همچنین، این ترکیبات دارای خواص دارویی بوده و به‌عنوان محرک و آرام‌بخش به کار می‌روند (Pedone-Bonfim *et al.*, 2015). نقش مثبت AMF در بیوسنتز یا افزایش مقدار و تجمع آلکالوئیدها در چندین پژوهش گزارش شده است (Pandey *et al.*, 2018)؛ نخستین بار در ۱۹۸۹ مشاهده شد همزیستی AMF مقدار کلی هیوسیامین و اسکوپولامین را در *Datura stramonium* افزایش می‌دهد (Zhao *et al.*, 2022)). کلشی‌سین نیز که آلکالوئید اصلی گیاه *Gloriosa superba* L. است، پس از مایه‌زنی با گونه‌های گوناگون AMF، به طور معنی‌دار در قسمت‌های گوناگون گیاه (غده، اندام هوایی و دانه‌ها) افزایش یافت (Pandey *et al.*, 2014). مایه‌زنی AMF به گیاه دارویی وینکا (*Catharanthus roseus*) به طور معنی‌دار رشد این گیاه و مقدار کل آلکالوئید وین‌بلاستین را در برگ‌های آن، افزایش داد (De la Rosa-Mera *et al.*, 2011). در ریشه‌های *Senecio jacobaea* همزیست با *R. irregularis* افزایش بیان معنی‌دار متابولیت‌های ثانویه که عمدتاً به مشتقات بلومنول و آلکالوئیدهای پیرولیزیدین تعلق دارند، مشاهده شده است (Hill *et al.*, 2018).

۳.۱.۱. ترکیبات فنلی

ترکیبات فنلی گروهی از متابولیت‌های ثانویه‌اند که در بافت‌های گیاهی شاید به‌عنوان ترکیبات دفاعی برای پاسداری در برابر گیاهخواران و بیمارگرها، جذب کننده گرده‌افشان‌ها یا انتشاردهنده دانه، محافظت‌کننده در برابر اشعه ماوراء بنفش و سیگنال‌دهی در برهمکنش‌های گوناگون از گیاهان و ریزجانداران کار کنند (Taiz *et al.*, 2002; Steinkellner *et al.*, 2007) همچنین برخی از ترکیبات فنلی، به دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد باکتریایی و ضد ویروسی برای سلامت انسان حائز اهمیت هستند (Martens and Mithofer, 2005; Pedone-Bonfim *et al.*, 2015). از ترکیبات فنلی جدا شده از منابع گیاهی می‌توان به فلاونوئیدها، اسیدهای فنولی، تانن‌ها، کومارین‌ها، کورکومینوئیدها، لیگنین‌ها، لیگنان‌ها، استیلبن‌ها و کینون‌ها اشاره نمود (Cosme *et al.*, 2020).

مشخص شده همبستگی همزیستی AMF با گیاهان میزبان‌شان، باعث افزایش مقدار ترکیبات فنلی در آن‌ها می‌شود (Amani Machiani *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2022)؛ در یک پژوهش، میکوریز *Rhizophagus intradices* سبب افزایش رشد گیاه دارویی *Solanum* procumbens Lour و نیز غلظت و مقدار پلی‌فنل در سراسر بخش‌های گیاه، به ویژه در ریشه آن شد (Bui *et al.*, 2022). در ریحان کلونیزه شده با AMF نیز افزایش مقدار رزمارینیک اسید، که از ترکیبات فنولی آنتی‌اکسیدان است، مشاهده شد (Toussaint *et al.*, 2008). مقدار ترکیبات فنلی در گل‌های *Ipomoea purpurea* L پس از کلنیزاسیون با *Funneliformis mosseae*، *Rhizoglomus intraradices* و *Rhizoglomus fasciculatum* دست‌کم ۵۰ درصد افزایش یافت و دو میکوریز اول، مقدار فلاونوئیدها را نیز در ریشه *Solanum nigrum* L. در همسنجی با گیاهان غیرمیکوریزی افزایش دادند

(Rashidi *et al.*, 2022). همچنین، مقدار تانن میوه‌های *Libidibia ferrea* (که برای تیمار لوزه، فارنژیت، هموروئید و جوش‌های پوستی بکار می‌رود (Zhao *et al.*, 2022)) پس از مایه‌زنی با *Acaulospora longula* ۴۰ درصد افزایش یافت (dos Santos *et al.*, 2020).

۴.۱.۱. ساپونین‌ها

ساپونین‌ها، گروه متنوع و مهم دیگری از متابولیت‌های ثانویه هستند که به‌عنوان بخشی از سامانه دفاعی گیاه در نظر گرفته می‌شوند (Agrelli *et al.*, 2003; Raghuwanshi and Sinha, 2014). افزون بر این، فعالیت‌های بیولوژیکی متنوعی نشان داده و مورد توجه بخش‌های دارویی، آرایشی و غذایی هستند (Isah, 2019).

گزارش شده AMF باعث افزایش تولید ساپونین در گیاهان دارویی می‌شوند (Amani Machiani *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2022). مثلاً، مقدار ساپونین در *Passiflora alata* پس از کلنیزاسیون با *Acaulospora longula* به شدت افزایش یافت (Muniz *et al.*, 2021). در پژوهش دیگری در *Glycyrrhiza glabra* (شیرین‌بیان) کلنیزه شده با قارچ‌های میکوریزی *F. mosseae* و *Diversispora epigaea* (به تنهایی یا در ترکیب با هم)، افزایش مقدار ساپونین اسید گلیسیریزیک مشاهده شد (Liu *et al.*, 2007). در *G. glabra* مایه‌زنی شده با *Claroideoglomus etunicatum*، نیز افزایش غلظت اسید گلیسیریزیک گزارش شده است (Johny *et al.*, 2021).

البته مایه‌زنی AMF به یک گیاه لزوماً منجر به افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در آن نمی‌شود (Raghuwanshi and Sinha, 2014; Tsiokanos *et al.*, 2022) و در برخی موارد اثر خنثی یا کاهشی AMF بر تولید برخی متابولیت‌های ثانویه گزارش شده است؛ مثلاً، کلنیزاسیون AMF بر ترکیبات فنلی در برگ‌ها و ساقه‌های ریحان اثری نداشته (Lee and Scagel, 2009) و مایه‌زنی *F. mosseae* به مریم گلی نیز سبب دگرگونی غلظت فنل کل و رزمارینیک اسید در ریشه‌ها نگردیده است (Nell *et al.*, 2009). در پژوهش دیگری، *R. intraradices* سبب کاهش مقدار فنل و فلاونوئید کل در برگ‌های مریم گلی شده است (Geneva *et al.*, 2010). همچنین تفاوت‌های معنی‌داری در اثربخشی گونه‌های گوناگون AMF آزمایش شده در گیاه *Inula ensifolia* مشاهده شده است. به گونه‌ای که افزایش تولید مشتقات تیمول در ریشه‌های مایه‌زنی شده با *Rhizophagus clarus* و کاهش تولید این متابولیت‌ها در ریشه‌های مایه‌زنی شده با *R. intraradices* گزارش گردیده است (Zubek *et al.*, 2010). این یافته‌ها نشان می‌دهد برای افزایش تولید و تجمع ترکیبات فعال در گیاهان دارویی، انتخاب مؤثرترین و مناسب‌ترین سویه‌های AMF باید مورد توجه قرار گیرد (Zhao *et al.*, 2022).

۲.۱. اثر AMF بر ترکیب و کیفیت متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی

امروزه مشخص شده که AMF احتمالاً تولید ترکیبات زیست‌فعال را نه تنها از دیدگاه کمّی (Ceccarelli *et al.*, 2010) بلکه از دیدگاه کیفی نیز (Ponce *et al.*, 2009) تحت تأثیر قرار می‌دهند و دگرگونی‌هایی در ترکیب متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی پدید می‌آورند (Zhao *et al.*, 2022). مثلاً، کلونیزاسیون ریشه گشنیز (*Coriandrum sativum* L.)، شوید (*Anethum graveolens* L.) و رازیانه (*Foeniculum vulgare*) با AMF با تغییر اجزای اسانس، سبب بهبود کیفیت اسانس در این گیاهان

شد (Kapoor *et al.*, 2002b, a; Kapoor *et al.*, 2004). همچنین کلونیزاسیون ریشه ریحان (*Ocimum basilicum*) با AMF افزون بر افزایش مقادیر اسانس، سبب ایجاد دگرگونی‌هایی در ترکیب اسانس شد (Copetta *et al.*, 2006). در مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) کلنیزه شده با *R. intraradices* نیز بهبود کمیت و کیفیت اسانس مشاهده شده است (Geneva *et al.*, 2010).

۳.۱. برخی عوامل تأثیر گذار بر دگرگونی متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی دارای همزیستی میکوریزی

تأثیر AMF بر دگرگونی متابولیت‌های ثانویه در گیاه، به عوامل متعددی نظیر گونه‌های گیاهی، سن و مرحله رشد و نمو گیاه، گونه‌های AMF، شرایط محیطی و برهمکنش عوامل گفته شده بستگی دارد (Maffei *et al.*, 1989; Amani Machiani *et al.*, 2022)) (Raghuwanshi and Sinha, 2014). به‌خصوص، تولید ترکیبات ثانویه شاید با توجه به همبستگی میان گیاه میزبان و AMF متفاوت باشد (Pedone-Bonfim *et al.*, 2015). از این روی، میزان تأثیر گونه‌های AMF گوناگون روی یک گیاه دارویی یا همان AMF روی گیاهان دارویی گوناگون می‌تواند ناهمگونی داشته باشد (Raei and Weisany, 2013). مثلاً، بررسی اثر چهار گونه AMF متعلق به جنس *Rhizophagus* روی گیاه *Anchusa officinalis* L نشان داد *R. irregularis* و *R. intraradices* در همسنجی با *R. clarus* و *R. aggregatus* اثر قوی‌تری بر متابولوم *A. officinalis* دارند و تجمع بیشتری از ترکیبات فنلی و ساپونین‌ها در ریشه و شاخساره گیاهان *A. officinalis* در پیوند با این دو گونه AMF مشاهده شد (Tsiokanos *et al.*, 2022). در پژوهش دیگری اثر ترکیب‌های گوناگون گیاه میزبان- AMF (شامل سه گونه گیاهی آشواگاندا (*Withania somnifera* (L.)، شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) و همیشه بهار (*Tagetes erecta* L) و پنج گونه AMF گوناگون شامل *Glomus hoi*، *Claroideoglomus etunicatum*، *Claroideoglomus claroideum*، *Rhizophagus irregularis* و *Acaulospora delicata*) بر افزایش متابولیت‌های ثانویه مشتق شده از ریشه‌های گیاهان بررسی شده و یافته‌ها حاصل نشان داد در میان تلقیح گونه‌های گوناگون AMF، بالاترین مقادیر متابولیت ثانویه در آشواگاندا و گل همیشه بهار پس از مایه‌زنی با *R. irregularis* و در شیرین‌بیان پس از مایه‌زنی با *C. etunicatum* یافت شد که نشان‌دهنده تأثیر متفاوت گونه‌های AMF بر گونه‌های گوناگون گیاهی بود (Johny *et al.*, 2021).

۴.۱ .مکانیسم‌های اثر AMF در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی

همچنان‌که پیش‌تر گفته شد، در بسیاری از پژوهش‌ها،AMF نقش تحریک‌کننده را در تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی داشته‌اند (Kumar *et al.*, 2021). دلایل این موضوع هنوز دقیقاً مشخص نیست، اما برخی از پژوهش‌گران بر طبق بررسی‌های جامع خود به این نتیجه رسیده‌اند که اثر AMF در افزایش تولید ترکیبات شیمیایی و متابولیت‌های ثانویه گیاهان میزبان، احتمالاً از دو طریق صورت می‌گیرد: ۱) به‌طور مستقیم با افزایش جذب آب و مواد غذایی نظیر فسفر، نیتروژن و عناصر ریز مغذی (منگنز، منیزیم، آهن، مس، روی)، بهبود ظرفیت فتوسنتز و افزایش زیست توده در اندام‌های گوناگون گیاه و بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق افزایش ترکیبات واسط و پیش‌ماده (Amani Machiani *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2022) و ۲) به‌طور غیرمستقیم با دگرگون ساختن بیان ژن‌ها و برانگیختن و فعال نمودن مسیرهای گوناگون بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه از طریق دگرگونی سنتز

هورمون‌های گیاهی (فیتوهورمون‌ها) و تولید مولکول‌های سیگنال و افزایش تعداد موهای غده‌ای[1] (Kapoor *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2021; Amani Machiani *et al.*, 2022; Iakab *et al.*, 2022).

۳. بحث و نتیجه‌گیری

امروزه تقاضای برای گیاهان دارویی و متابولیت‌های ثانویه آن‌ها در سطح جهانی رو به افزایش است و با گسترش بهره‌برداری از این گیاهان، نگرانی‌های فزاینده‌ای در مورد کاهش جمعیت، از دست رفتن تنوع ژنتیکی، انقراض محلی و تخریب زیستگاه آن‌ها وجود دارد. از سوی دیگر تنش‌های زیستی و نازیستی نیز بر رشد، کارکرد و ترکیب شیمیایی این گیاهان تأثیر به‌سزایی دارند. گر چه کاربرد سموم و کودهای شیمیایی شاید بتواند کارکرد گیاهان دارویی را افزایش دهد، ولی برای پاسخ‌گویی به نیازهای درمانی و حفظ و پرورش گیاهان دارویی سالم و دستیابی به عملکردهای بالا و پایدار در زمینه متابولیت‌های ثانویه این گیاهان، ضرورت وجود راهکارهای جایگزین پایدار و ایمن، احساس می‌شود.

بر طبق مطالب ارائه شده در این مقاله، گونه‌های گوناگون AMF می‌توانند با گیاهان دارویی میزبان خود برهمکنش‌های سازگار و دوستانه‌ای داشته و برای اهداف چندگانه‌ای نظیر افزایش رشد و کارکرد این گیاهان و بهبود تحمل آن‌ها در برابر تنش‌های گوناگون زیستی و نازیستی و نیز افزایش کمیت و کیفیت ترکیبات زیست‌فعال‌شان مورد بهره‌گیری قرار گیرند. از این روی بهره‌گیری کاربردی از این عوامل می‌تواند جایگزینی بالقوه برای روش‌های موجود و راهبردی پایدار و سازگار با محیط‌زیست جهت افزایش کمیت و کیفیت متابولیت‌ها و ترکیبات زیست‌فعال مهم گیاهان دارویی در نظر گرفته شده و سبب شود صنعت داروسازی، بهره‌برداری دارویی بیشتری از این گیاهان داشته باشد. از سوی دیگر این راهبرد، کاربرد نهاده‌های شیمیایی (کود و سم) را نیز به شدت کاهش داده و به سمت گیاهان دارویی سالم و عاری از مواد شیمیایی و کاهش آلودگی‌های زیست محیطی پیش می‌رود.

بسیاری از پژوهش‌های مرتبط با گیاهان دارویی یا در محیط‌های سترون و شرایط آزمایشگاهی و یا در شرایط گلخانه انجام شده و اطلاعات مربوط به اثربخشی گونه‌های گوناگون AMF روی گیاهان و متابولیت‌های ثانویه آن‌ها در شرایط گوناگون محیطی، اندک است. از آنجا که اثر AMF به تنوع شرایط محیطی مزرعه بستگی دارد، لازم است در آینده پژوهش‌های بیشتری در مورد کاربرد آن‌ها روی گیاهان دارویی متنوع کشت شده در مزرعه انجام شود. همچنین با توجه به ترجیحی بودن AMF برای یک میزبان خاص (Chen *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2021) و نیز لزوم انتخاب و بهره‌گیری از قارچ‌های AM کارآمد برای کسب نتایج کمی و کیفی بهتر در تولید متابولیت‌های ثانویه در یک گیاه دارویی خاص، بایسته است پژوهش‌های بیشتری در این موارد صورت گیرد. به نظر می‌رسد در این زمینه، انجام پژوهش‌های ترانسکریپتومی و متابولومیکی و انجام پژوهش‌های بیشتر برای

[1] Glandular trichomes

روشن شدن مکانیسم‌های احتمالی که در آن AMF ترکیبات زیست‌فعال گیاهان مهم دارویی را در سطح بافت، یاخته یا مولکول افزایش می‌دهند، بتواند سودمند باشد (Iakab *et al.*, 2022).

منابع

Agrelli J, Oleszek W, Stochmal A, Olsen M, Anderson P. 2003. Herbivore-induced responses in *alfalfa* (Medicago *sativa*). J Chem Ecol 29(2): 303-320 (eng).

Amani Machiani M, Javanmard A, Habibi Machiani R, Sadeghpour A. 2022. Arbuscular mycorrhizal Fungi and Changes in Primary and Secondary Metabolites. Plants (Basel) 11(17).

Amani Machiani M, Javanmard A, Morshedloo MR, Aghaee A, Maggi F. 2021. *Funneliformis mosseae* inoculation under water deficit stress improves the yield and phytochemical characteristics of thyme in intercropping with soybean. Sci Rep 11(1): 15279 (eng).

Amani Machiani M, Rezaei-Chiyaneh E, Javanmard A, Maggi F, Morshedloo MR. 2019. Evaluation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed yield and quali-quantitative production of the essential oils from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and dragonhead (Dracocephalum moldavica L.) in intercropping system under humic acid application. Journal of Cleaner Production 235: 112-122.

Aziz E, Hendawy S, Azza E, Omer E. 2008. Effect of soil type and irrigation intervals on plant growth, essential oil yield and constituents of *Thymus vulgaris* plant. Am. Eruas. J. Agric & Environ. Sci. 4: 443-450.

Begum N, Qin C, Ahanger MA, Raza S, Khan MI, *et al.* 2019. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: Implications in abiotic stress tolerance. Frontiers in Plant Science 10: 1068.

Bowles TM, Barrios-Masias FH, Carlisle EA, Cavagnaro TR, Jackson LE. 2016. Effects of arbuscular mycorrhizae on tomato yield, nutrient uptake, water relations, and soil carbon dynamics under deficit irrigation in field conditions. Sci Total Environ 566-567: 1223-1234.

Bui CV, Le QD, Vo ATK, Tran LD. 2022. Effect of arbuscular mycorrhizal fungus on the growth and polyphenol production of medicinal plants: Ehretia asperula and *Solanum* procumben. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 50(1).

Ceccarelli N, Curadi M, Martelloni L, Sbrana C, Picciarelli P, *et al.* 2010. Mycorrhizal colonization impacts on phenolic content and antioxidant properties of artichoke leaves and flower heads two years after field transplant. Plant and Soil 335(1-2): 311-323.

Chaudhury A, Pal M. 2010. Induction of shikonin production in hairy root cultures of Arnebia hispidissima via *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation. Journal of Crop Science and Biotechnology 13(2): 99-106.

Chen YL, Li JX, Guo LP, He XH, Huang LQ. 2014. Application of AM fungi to improve the value of medicinal plants. Mycorrhizal Fungi: Use in Sustainable Agriculture and Land Restoration, 171-187.

Compant S, Cambon MC, Vacher C, Mitter B, Samad A, *et al.* 2021. The plant endosphere world - bacterial life within plants. Environ Microbiol 23(4): 1812-1829.

Copetta A, Lingua G, Berta G. 2006. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. Genovese. Mycorrhiza 16(7): 485-494.

Cosme P, Rodriguez AB, Espino J, Garrido M. 2020. Plant Phenolics: Bioavailability as a Key Determinant of Their Potential Health-Promoting Applications. Antioxidants (Basel) 9(12): 1263 (eng).

De la Rosa-Mera CJ, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, de Jesús Sánchez-Colín M, Muñoz-Muñiz OD. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi and potassium bicarbonate enhance the foliar content of the vinblastine alkaloid in *Catharanthus roseus*. Plant and Soil 349(1-2): 367-376.

de Vries FT, Griffiths RI, Knight CG, Nicolitch O, Williams A. 2020. Harnessing rhizosphere microbiomes for drought-resilient crop production. Science 368(6488): 270-274.

dos Santos EL, V. da Silva WA, Ferreira MRA, Soares LA, Sampaio EVdSB, *et al.* 2020. *Acaulospora longula* increases the content of phenolic compounds and antioxidant activity in fruits of *Libidibia ferrea*. The Open Microbiology Journal 14(1): 132-139.

Emmanuel OC, Babalola OO. 2020. Productivity and quality of horticultural crops through co-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting bacteria. Microbiological Research 239: 126-569.

Geneva MP, Stancheva IV, Boychinova MM, Mincheva NH, Yonova PA. 2010. Effects of foliar fertilization and arbuscular mycorrhizal colonization on *Salvia officinalis* L. growth, antioxidant capacity, and essential oil composition. J Sci Food Agric 90(4): 696-702.

Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Rahmat A. 2010. Elevated carbon dioxide increases contents of flavonoids and phenolic compounds, and antioxidant activities in malaysian young ginger (Zingiber officinale roscoe.) varieties. Molecules 15(11): 7907-7922.

Gobbo-Neto L, Lopes NP. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova 30(2): 374-381.

Hill EM, Robinson LA, Abdul-Sada A, Vanbergen AJ, Hodge A, *et al.* 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi and plant chemical defence: Effects of colonisation on aboveground and belowground metabolomes. Journal of Chemical Ecology 44(2): 198-208.

Hussein RA, A. El-Anssary A. 2019. Plants secondary metabolites: The key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. Herbal Medicine. IntechOpen, 11-30.

Iakab M, Domokos E, Benedek K, Molnár K, Kentelky E, *et al.* 2022. The importance of mycorrhizal fungi in the development and secondary metabolite production of Echinacea *purpurea* and relatives (Asteraceae): Current research status and perspectives. Horticulturae 8(12).

Isah T. 2019. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. Biological Research 52(1).

Jan R, Asaf S, Numan M, Lubna, Kim K-M. 2021. Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. Agronomy 11(5): 968.

Javanmard A, Ashrafi M, Morshedloo MR, Machiani MA, Rasouli F, *et al.* 2022. Optimizing phytochemical and physiological characteristics of balangu (Lallemantia iberica) by foliar application of chitosan nanoparticles and myco-root inoculation under water supply restrictions. Horticulturae 8(8): 695.

Johny L, Cahill DM, Adholeya A. 2021. AMF enhance secondary metabolite production in ashwagandha, licorice, and marigold in a fungi-host specific manner. Rhizosphere 17: 100314.

Kapoor R, Anand G, Gupta P, Mandal S. 2017. Insight into the mechanisms of enhanced production of valuable terpenoids by arbuscular mycorrhiza. Phytochemistry Reviews 16(4): 677-692.

Kapoor R, Chaudhary V, Bhatnagar AK. 2007. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. Mycorrhiza 17(7): 581-587.

Kapoor R, Giri B, Mukerji KG. 2002a. *Glomus macrocarpum*: a potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in Dill (*Anethum graveolens* L.) and Carum (Trachyspermum ammi (Linn.) Sprague). World Journal of Microbiology and Biotechnology 18(5): 459-463.

Kapoor R, Giri B, Mukerji KG. 2002b. Mycorrhization of coriander (*Coriandrum sativum* L) to enhance the concentration and quality of essential oil. Journal of the Science of Food and Agriculture 82(4): 339-342.

Kapoor R, Giri B, Mukerji KG. 2004. Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. Bioresour Technol 93(3): 307-311.

Kaur S, Suseela V. 2020. Unraveling arbuscular mycorrhiza-induced changes in plant primary and secondary metabolome. Metabolites 10(8): 335 (eng).

Kavitha C, Vadivel E, Rajamani K. 2010. Evaluation of *Coleus forskohlii* genotypes for bio chemical characters. Research Journal of Medicinal Plant 3(2): 75-79.

Kilam D, Sharma P, Agnihotri A, Kharkwal A, Varma A. 2017. Microbial symbiosis and bioactive ingredients of medicinal plants. In: Varma A, Prasad R and Tuteja N (Eds.) Mycorrhiza - Eco-Physiology, Secondary Metabolites, Nanomaterials, 4th edn. Springer International Publishing, Cham, Switzerland, 283-302.

Krishna S, Bustamante L, Haynes RK, Staines HM. 2008. Artemisinins: their growing importance in medicine. Trends Pharmacol Sci 29(10): 520-527 (eng).

Krzyzaniak Y, Magnin-Robert M, Randoux B, Fontaine J, Lounès-Hadj Sahraoui A. 2021. Combined use of beneficial bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi for the biocontrol of plant cryptogamic diseases: Evidence, methodology, and limits. In: Shrivastava N, Mahajan S and Varma A (Eds.) Symbiotic Soil Microorganisms: Biology and Applications. Springer International Publishing, Cham, 429-468.

Kumar S, Arora N, Upadhyay H. 2021. Arbuscular mycorrhizal fungi: Source of secondary metabolite production in medicinal plants. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, 155-164.

Lee J, Scagel CF. 2009. Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. Food Chemistry 115(2): 650-656.

Lichtenthaler HK. 1996. Vegetation stress : an introduction to the stress concept in plants. Journal of Plant Physiology 148: 4-14.

Liu J, Wu L, Wei S, Xiao X, Su C, *et al.* 2007. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth, nutrient uptake and glycyrrhizin production of licorice (Glycyrrhiza uralensis Fisch). Plant Growth Regulation 52(1): 29-39.

Maffei M, Chialva F, Sacco T. 1989. Glandular trichomes and essential oils in developing peppermint leaves. New Phytologist 111(4): 707-716.

Martens S, Mithofer A. 2005. Flavones and flavone synthases. Phytochemistry 66(20): 2399-2407.

Moarrefzadeh N, Sharifi R, Khateri H, Abbasi S. 2021a. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, the causal agent of the fusarial yellowing and wilting of chickpea by mixtures of some microbial agents. Biological Control of Pests and Plant Diseases 9(1): 61-73 (In Farsi with English abstract).

Moarrefzadeh N, Sharifi R, Khateri H, Abbasi S. 2021b. Effect of some probiotics consortia on inhibition of *Fusarium* yellowing and wilting disease (*Fusarium redolens* Wollenweber) and growth promoting in chickpeas. Journal of Agricultural Science and Sustainable Production 31(4): 255-270 (Persian with English abstract).

Muniz BC, Falcão EL, Monteiro RdP, Santos ELd, Bastos Filho CJA, *et al.* 2021. *Acaulospora longula* Spain & N.C. Schenck: A low-cost bioinsumption to optimize phenolics and saponins production in *Passiflora alata* Curtis. Industrial Crops and Products 167: 113498.

Mustafa G, Khong NG, Tisserant B, Randoux B, Fontaine J, *et al.* 2017. Defence mechanisms associated with mycorrhiza-induced resistance in wheat against powdery mildew. Functional Plant Biology 44(4): 443-454.

Nell M, Vötsch M, Vierheilig H, Steinkellner S, Zitterl-Eglseer K, *et al.* 2009. Effect of phosphorus uptake on growth and secondary metabolites of garden sage (*Salvia officinalis*

L.). Journal of the Science of Food and Agriculture 89(6): 1090-1096.

Ostadi A, Javanmard A, Amani Machiani M, Morshedloo MR, Nouraein M, *et al.* 2020. Effect of different fertilizer sources and harvesting time on the growth characteristics, nutrient uptakes, essential oil productivity and composition of *Mentha* x *piperita* L. Industrial Crops and Products 148: 112290.

Pandey DK, Kaur P, Dey A. 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi: Effects on secondary metabolite production in medicinal plants. Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspectives, 507-538.

Pandey DK, Malik T, Dey A, Singh J, Banik RM. 2014. Improved growth and colchicine concentration in *Gloriosa superba* on mycorrhizal inoculation supplemented with phosphorus-fertilizer. Afr J Tradit Complement Altern Med 11(2): 439-446 (eng).

Pedone-Bonfim MVL, da Silva FSB, Maia LC. 2015. Production of secondary metabolites by mycorrhizal plants with medicinal or nutritional potential. Acta Physiologiae Plantarum 37(2).

Ponce MA, Bompadre MJ, Scervino JM, Ocampo JA, Chaneton EJ, *et al.* 2009. Flavonoids, benzoic acids and cinnamic acids isolated from shoots and roots of Italian rye grass (*Lolium* multiflorum Lam.) with and without endophyte association and arbuscular mycorrhizal fungus. Biochemical Systematics and Ecology 37(4): 245-253.

Radhika KP, Rodrigues BF. 2011. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on andrographolide concentration in *Andrographis paniculata*. Australian Journal of Medical Herbalism 23(1): 34-36 (English).

Raei Y, Weisany W. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with some aromatic and medicinal plants. Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences 2(11): 129-138.

Raghuwanshi R, Sinha S. 2014. Linking mycorrhizal technology with medicinal plant secondary metabolites. In: Kharwar RN, Upadhyay RS, Dubey NK and Raghuwanshi R (Eds.) Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security. Springer India, New Delhi, 121-132.

Rashidi S, Yousefi AR, Pouryousef M, Goicoechea N. 2022. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the accumulation of secondary metabolites in roots and reproductive organs of *Solanum nigrum*, Digitaria sanguinalis and *Ipomoea purpurea*. Chemical and Biological Technologies in Agriculture 9(1).

Rivero J, Lidoy J, Llopis-Giménez Á, Herrero S, Flors V, *et al.* 2021. Mycorrhizal symbiosis primes the accumulation of antiherbivore compounds and enhances herbivore mortality in tomato. Journal of Experimental Botany 72(13): 5038-5050.

Sailo GL, Bagyaraj DJ. 2005. Influence of different AM-fungi on the growth, nutrition and forskolin content of *Coleus forskohlii*. Mycol Res 109(Pt 7): 795-798.

Salam EA, Alatar A, El-Sheikh MA. 2017. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi alleviates harmful effects of drought stress on damask rose. Saudi J Biol Sci 25(8): 1772-1780 (eng).

Scagel CF, Lee JM. 2012. Phenolic composition of basil plants is differentially altered by plant nutrient status and inoculation with mycorrhizal fungi. HortScience 47(5): 660-671 (English).

Singh D, Thapa S, Mahawar H, Kumar D, Geat N, *et al.* 2022. Prospecting potential of endophytes for modulation of biosynthesis of therapeutic bioactive secondary metabolites and plant growth promotion of medicinal and aromatic plants. Antonie Van Leeuwenhoek 115(6): 699-730.

Şirin E, Ertürk Y, Kazankaya A. 2022. Effects of PGPR, AMF and *Trichoderma* Applications on Adaptation Abilities to Different Biotic and Abiotic Conditions in Medicinal and Aromatic Plants. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology 10(2): 166-173 (en).

Song Y, Chen D, Lu K, Sun Z, Zeng R. 2015. Enhanced tomato disease resistance primed by arbuscular mycorrhizal fungus. Frontiers in Plant Science 6: 786.

Steinkellner S, Lendzemo V, Langer I, Schweiger P, Khaosaad T, *et al.* 2007. Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. Molecules 12(7): 1290-1306 (eng).

Strzemski M, Dzida K, Dresler S, Sowa I, Kurzepa J, *et al.* 2021. Nitrogen fertilisation decreases the yield of bioactive compounds in Carlina acaulis L. grown in the field. Industrial Crops and Products 170: 113698.

Sun R-T, Zhang Z-Z, Zhou N, Srivastava AK, KuČA K, *et al.* 2021. A review of the interaction of medicinal plants and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 49(3).

Taber RA, Trappe JM. 1982. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in rhizomes, scale-like leaves, roots, and xylem of ginger. Mycologia 74(1): 156-161.

Taiz L, Zeiger E, Zeiger L. 2002. Plant Physiology. Sinauer Associates.

Toussaint J, Smith FA, Smith SE. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition. Mycorrhiza 17(4): 291-297.

Toussaint JP, Kraml M, Nell M, Smith SE, Smith FA, *et al.* 2008. Effect of *Glomus mosseae* on concentrations of rosmarinic and caffeic acids and essential oil compounds in basil inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici*. Plant Pathology 57(6): 1109-1116.

Tsiokanos E, Cartabia A, Tsafantakis N, Lalaymia I, Termentzi A, *et al.* 2022. The metabolic profile of *Anchusa* officinalisL. differs according to its associated arbuscular mycorrhizal fungi. Metabolites 12(7).

Ullah R, Alqahtani AS, Noman OMA, Alqahtani AM, Ibenmoussa S, *et al.* 2020. A review on ethno-medicinal plants used in traditional medicine in the Kingdom of Saudi Arabia. Saudi J Biol Sci 27(10): 2706-2718 (eng).

Yeshi K, Crayn D, Ritmejeryte E, Wangchuk P. 2022. Plant secondary metabolites produced in response to abiotic stresses has potential application in pharmaceutical product development. Molecules 27(1): 313 (eng).

Zehtab-Salmasi S, Heidari F, Alyari H. 2008. Effects of Microelements and Plant Density on Biomass and Essential Oil Production of Peppermint (*Mentha piperita* L.). Plant Sciences Research 1(1): 24-26 (English).

Zhan H, Du C, Liu R, Shang C, Zhang Y, *et al.* 2020. Research progress of quality characters in medicinal plants. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Materia-World Science and Technology 22: 2893-2898.

Zhao Y, Cartabia A, Lalaymia I, Declerck S. 2022. Arbuscular mycorrhizal fungi and production of secondary metabolites in medicinal plants. Mycorrhiza 32(3-4): 221-256.

Zubek S, Stojakowska A, Anielska T, Turnau K. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi alter thymol derivative contents of *Inula ensifolia* L. Mycorrhiza 20(7): 497-504.

The importance of mycorrhizae in improving the production of secondary metabolites of medicinal plants

Nahid Moarrefzadeh1*, Hadi Khateri2

1,2 Department of Plant Protection, Razi University, Kermanshah, Iran

Abstract

Nowadays the demand for medicinal plants in developing and developed countries is increasing. The medicinal and therapeutic value of these plants is primarily attributed to the presence and abundance of secondary metabolites in them. Biotic and abiotic stresses have a significant effect on the vegetative characteristics, the function of the essential oil and the chemical composition of the secondary metabolites of these plants. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are a group of beneficial microorganisms symbiotic with the roots of plants that can increase the tolerance of their host plants against various stresses, increase their access to water and nutrients. They also increase the biomass and change the plant's metabolome, and play an important role in health, growth and productivity and improve the quantitative and qualitative properties of secondary metabolites in medicinal plants. This research area is a very important approach to increase the production of secondary metabolites in aromatic and medicinal plants, and the use of these findings can have a high potential in improving the quantity and quality of these compounds in the medical and cosmetic industries. This review article deals with some new findings on the effects of AMF on increasing the production or quality of secondary metabolites, the factors affecting the changes of secondary metabolites in medicinal plants with mycorrhizal symbiosis, as well as the mechanisms of increasing the production of secondary metabolites by AMF in plants.

Keywords: Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Bioactive Compounds, Symbiosis

بررسی اثر نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز با عصاره گیاه تاج خروس وحشی ضد باکتریایی، بیان ژن های VEGF و میزان رگ زایی در جنین جوجه

محسن باغانی* ، علی اسحاقی

۱ : گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه، دانشگاه ازاد اسلامی مشهد

۲ : [۱]گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه، دانشگاه ازاد اسلامی مشهد

چکیده

. سرطان شایع ترین نوع بیماری است می باشد. عوامل مختلفی ممکن است که در ایجاد سرطان نقش داشته باشد ولی شاید بتوان یکی از عامل های بزرگ شدن تومور ها و یا غذا رسانی به تومور ها را در عامل های رگ ها دانست . رگ زایی یکی از فرایند غذا رسانی به تومور ها می باشد و اگر بتوانیم ساختار های رگ را مهار کنیم شاید بتوانیم در فرایند کاهش حجم و یا درمان تومور ها نقش مهمی ایفا کنیم از این جهت بررسی خاصیت ضد رگ زایی نانو ذره نقره سنتز شده، تست CAM بر روی جنین جوجه با غلظت های ۰، ۱۰۰۰،۵۰۰،۲۵۰،۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر انجام شد. مشخص شد نانو ذره مورد نظر می تواند با افزایش غلظت، میزان رگ زایی را کاهش دهد. برای تایید خاصیت ضد رگ زایی بیان ژن VEGF توسط Real Time PCR انجام شد که اثرات کاهشی در بیان این ژن در برخورد با نانو ذره مورد نظر از خود نشان داد. به منظور فعالیت ضد میکروبی نانوذره نقره، اثر آن برعلیه باکتری های اشرشیا کلی ، استافیلو کوکوس اورئوس ، استافیلو کوکوس اپیدرمیس مورد سنجش قرار گرفت. قطر هاله عدم رشد ایجاد شده برای این باکتری ها به ترتیب ۹ ، ۹ ، ۱۲ میلی مترگزارش شد که نتایج نشان می دهد نانو ذره مورد نظر در این مقاله اثر مهاری بهتری بر باکتری های گرم مثبت دارد.

واژگان کلیدی:روش سبز ،ضد رگ زایی ، ژن

[۱] E-mail: ashaghi@gmail.com

۱. مقدمه

محققی به نام فلکمن برای نخستین بار فرضیه وابسته بودن رشد تومور ها به رگ زایی را مطرح و مطالعات نشان داد که رشد و متاستاز تومورها به تشکیل عروق جدید و رفع نیازهای تغذیه ای تومور بستگی دارد. تا پیش از دهه ۱۹۶۰ میلادی پژوهشگران تصور می کردند که سلول های توموری موادی را ترشح می کنند که باعث گشاد شدن رگ های خونی شده و به این ترتیب مواد غذایی برای رشد تومور فراهم می شود. اما امروزه فرضبر این است که سلولهای توموری موادی ترشح میکنند که سبب جوانه زدن عروق قبلی و رگ زایی می شود[۱]. بنابراین، ادامه رشد نئوپلاسم اولیه به خونرسانی کافی به آن ناحیه بستگی دارد[۲].به استثنای تومورهای خوش خیم که رگ زایی کمی دارند و سرع[1]ت رشد آنها کند است، تومورهای بدخیم دارای رگ های زیاد بوده و رشدشان سریع است. تحقیقات گزارش داده اند که تشکیل سیستم عروقی در سرطان بدخیم با قدرت متاستاز تومور رابطه مستقیم دارد[۳]. فاکتورهای رگ زایی توسط سلول های توموری در محیط رها می گردند و انواع مختلف سلول های طبیعی را تحریک می کنند. این تحریک ویژه شامل سلولهای اندوتلیال مجاور تومور نیز می گردد. این سلول ها غشاء پایه خود را تجزیه کرده و با جدا شدن از سلولهای مجاور و وارد شدن به ماتریکس خارج سلولی به سمت توده تومورها مهاجرت می کنند. اما تقسیم سلولی نیز در جوانه اتفاق افتاده و با افزایش مهاجرت سلولهای اندوتلیال رشته ای از این سلول ها ایجاد شده و غشاء پایه بین و داخل سلولی را تکامل می بخشد و ساختمان لوله ای تشکیل می دهند. پس ازآن این لوله ها به هم ارتباط پیدا کرده و ساختمان رگ های جدید را ایجاد می کنند که در آخر به سیستم گردش خون متصل می شود. بدین ترتیب شبکه مویرگی در توده توموری ایجاد و می تواند به گسترش خود ادامه دهد[۴].

۱-۱. القاء رگ زایی در تومورها

یکی از عواملی که موجب القاء رگ زایی می شود هیپوکسیاست. چندین ترکیب آنژیوژنیک مانند bFGF، Interleukin، VEGF، TNF توسط هیپوکسی القاء می شوند. بعنوان مثال درسرطان سرویکس انسانی که این عوامل باعث ایجاد بیماری می شود. جهش در ژن های انکوژنیک K-ras،H-ras، V-raf و V-src باعث القاء بیان VEGF می شود.همچنین جهش در ژن سرکوبگر TP53 به کاهش تولید تروسپوندین [2] و افزایش بیان VEGF می انجامد و به دنبال آن آنژیوژنز فعال می گردد. دیگر فاکتورهای رشد رگ زایی مانندαوTGF-β به وسیله موتانتrasافزایش یافته و این مسئله به فعال شدن نواحی پروموتورژن های فاکتور رشد آنژیوژنیک می انجامد[۵].

۱-۲. مکانیسم رگ زایی تومور

تومورها قادرند منبع خونی مورد نیازشان را از راه های گوناگونی تأمین نمایند. طی فرآیندی مشابه آنژیوژنزطبیعی، تومور ممکن است سبب تغییر شکل عروق خون از حالت طبیعی گردد. علاوه بر این سلولهای توموری قادرند در پیرامون عروق موجود

1

2Terospondin

رشد کرده و در ابتدا نیازی به آنژیوژنز جدید نداشته باشند .دیواره های عروق توموری ممکن است از هر دو نوع سلول های توموری و اندوتلیال ایجاد شده باشد. این ساختارهای غیر طبیعی بیانگر ماهیت پاتولوژیکی تحریک توموری می باشد، علی رغم این مسئله توانایی آن ها جهت حمایت از رشد سلول وابسته به مکانسیم های فیزیولوژیک آنژیوژنزی است که مورد استفاده قرار می دهند.

۲. مواد و روش‌ها

۱،۲. .روش تحقیق

تکنیک Real-time PCR

Real-time PCR یک واکنش زنجیره ای پلیمرازی حرکتی و یک روش آزمایشگاهی بر اساس PCR است که برای رشد و تکثیر و تعیین کمی مولکول mRNA یا DNA در یک زمان کاربرد دارد. این روش مشابه PCR است با این تفاوت که میتواند یک توالی هدف را در زمان انجام واکنش و در مراحل اولیه انجام واکنش با استفاده از تکنولوژی فلورسانت اندازه گیری کند. یعنی در زمان انجام PCR تعداد کپی ها از ژن هدف افزایش پیدا میکند مطالعه حاضر تکنیک Real-time PCR به منظور بررسی تغییرات بیان ژن های آپوپتوزی مورد استفاده قرار گرفت. ژن خانه دار Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH)به عنوان ژن کنترل در نظر گرفته شد زیرا دارای بیان ثابت در غلظت های مختلف نانوذرات است. پس از ساختCDNA با استفاده از پرایمر هایی که در جدول ذکر شده اند،Real-time PCR. از روش Δct جهت بررسی تغییرات نسبی میزان بیان ژن ها ی VEGF استفاده گردید.

Gene	Forward	Reverse
VEGF	CTGCTGTCTTGGGTGCATTG	TTCACATTTGTTGTGCTGTAG
GAPDH	TGCTGGTGCTGAGTATGTCG	GCATGTCAGATCCACAACGG

جدول ۱. **توالی آغازگرهای ژن های مرتبط با رگ زایی و آپوپتوز**

۲.۲.تست آنتی باکتریال

۲.۲.۱ دیسک دیفیوژن[1]

به منظورسنجش میزان حساسیت باکتری نسبت به نانو ذره و آنتی بیوتیک های مورد نظر ازتست دیسک دیفیوژن استفاده شد. در این روش پس از ایزوله کردن باکتری، مقداری از کلونی باکتری را به کمک آنس برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل گردید.غلظت سوسپانسیون باکتری نباید بیشتر یا کمتر از نیم مک فارلند باشد. زمانی که کدورت از نیم مک فارلندکمتربود، بایستی پس از تهیه محلول هموژن، با سواب استریل محلول را هم زده و بعد از آبکشی کردن سواب، باکتری را به محیط کشت مولر هینتون انتقال دهیم. پس از کشت، دیسک های آنتی بیوگرام که از نیم ساعت قبل از تست، بیرون یخچال قرار داده شده

[1]Disk diffusion

بودند را برداشته و بر روی محیط کشت انتقال دادیم. نحوه قرار دادن دیسک ها در محیط کشت مولر هینتون، به صورت دایره ای بوده و فاصله این دیسک ها از یکدیگر حدود ۱۲ میلیمتر است و بایستی از دیواره هم فاصله داشته باشند.دیسک های مورد استفاده هم بایستی با نوع باکتری ایزوله شده تناسب داشته باشد. بعد از قرار دادن دیسک ها، در پلیت را بسته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، انکوبه گردید و نهایتا مورد بررسی قرار گرفت و هاله ی عدم رشد باکتری اندازه گیری شد.

۲.۲.۲ تهیه سوسپانسیون باکتری

یک الی دو کلنی تک باکتری به کمک لوپ استریل برداشته، داخل لوله حاوی نوترینت براث استریل حل شد. کدورت محلول با کدورت سوسپانسیون نیم مک فارلند یکسان گردید تا تعداد یکسانی از باکتری ها (باکتری در هر میلی‌لیتر) برای آزمایش سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی به سطح محیط تلقیح شود.

۲.۳. تست پرده کوریوآلانتوییک

تست پرده کوریوآلانتوییک جوجه روشی ساده برای مطالعه رگ زایی به صورت *invivo* می باشد. در این روش پرده کوریوآلانتوییک جوجه که حاوی میزان بالای رگ می باشد، مورد استفاده قرار می گیرد. در تست CAM با ایجاد پنجره ای در پوسته تخم تیمار های مختلف بر روی پرده اعمال می گردد و پس از طی مدت زمان تعیین شده ای میزان رگ زایی و تغییرات آن نسبت به نمونه کنترل سنجش می گردد.

در مطالعه حاضر از این تست به منظور بررسی اثر ضد رگ زایی نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحشی *Amaranthus Cruentus*در غلظت های مختلف استفاده گردید. تعداد ۴۰ عدد تخم مرغ نژاد ROSS تهیه شد. پس از استریل کردن پوسته به وسیله الکل ۷۰٪ در دستگاه جوجه کشی با دمای ۳۸ درجه سیلسیوس و رطوبت ۵۵ الی ۶۰ درصد انتقال داده شدند، به نحوی که سر پهن به سمت بالا باشد. سپس دستگاه در وضعیت روشن قرار گرفت.در روز دوم انکوباسیون به وسیله یک پنس استریل در زیر هود لامینار و در شرایط استریل در سمت پهن تخم مرغ سوراخ کوچکی ایجاد کرده و پس از آن در سمت پهلویی پنجره نیز این عمل انجام شد. محل سوراخ ها به وسیله پارافین استریل و لامل پوشانده شد. تخم مرغ ها به دستگاه جوجه کشی عودت داده شدند، سپس چرخش اتوماتیک دستگاه قطع و از این پس تخم مرغها برای تکوین طبیعی تحت چرخش دستی قرارگرفتند.در ادامه نمونه ها در ۴ گروه به صورت تصادفی و به شرح زیر قرار داده شدند:

گروه اول: گروه کنترل: نمونه های مربوط به این گروه در روز نخست در دستگاه جوجه کشی قرار داده شده و پس از۴۸ ساعت از انکوباسیون برای ایجاد پنجره اقدام گردید و تا روز دوازدهم درهمین وضعیت و بدون تیمار انکوبه شدند.

گروه دوم: تیمار با ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحشی *Amaranthus Cruentus*

گروه سوم: تیمار با ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحشی *Amaranthus Cruentus*

گروه چهارم: تیمار با ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحشی *Amaranthus Cruentus*.

گروه چهارم: تیمار با ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحشی *Amaranthus Cruentus*.

۳. نتایج

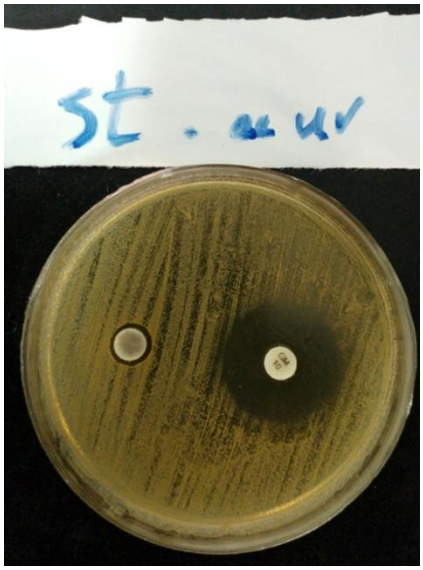
۳.۱ بررسی فعالیت آنتی باکتریال نانو ذره نقره با استفاده از تکنیک دیسک گذاری و آنتی بیوگرام

در مطالعه حاضر نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحشی *Amaranthus Cruentus* خاصیت آنتی باکتریال چشم گیری در خصوص باکتری های اشرشیاکولی (باکتری گرم منفی) و استافیلوکوکوس اورئوس[1] (باکتری گرم مثبت) و استافیلوکوکوس اپیدرمیس نشان داد و قطر هاله عدم رشد ایجاد شده برای این باکتری ها به ترتیب ۹ ، ۹ ، ۱۲ میلی متر در جدول گزارش شد. همچنین هم زمان با کشت باکتری های مورد نظر از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نیز به عنوان شاهد استفاده شد.



شکل ۱ اثر مهار کنندگی نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحشی *Amaranthus Cruentus* بر رشد باکتری اشرشیا کلی

[1] *staphylococcus aureus*



شکل ۲ اثر مهار کنندگی نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحشی *Amaranthus Cruentus* بر رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس



شکل ٤-١٧ اثر مهار کنندگی نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحشی *Amaranthus Cruentus* بر رشد باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیس

	باکتری	قطر هاله عدم رشد (میلی-متر)	شاهد	قطر هاله عدم رشد (میلی-متر)
نمونه ۱	اشریشیاکلی	۹ میلی متر	جنتامایسین	۲۵ میلی متر
نمونه ۲	استافیلوکوکوس اورئوس	۹ میلی متر	جنتامایسین	۲۱ میلی متر
نمونه ۳	استافیلوکوکوس اپیدرمیس	۱۲ میلی متر	جنتامایسین	۳۹ میلی متر

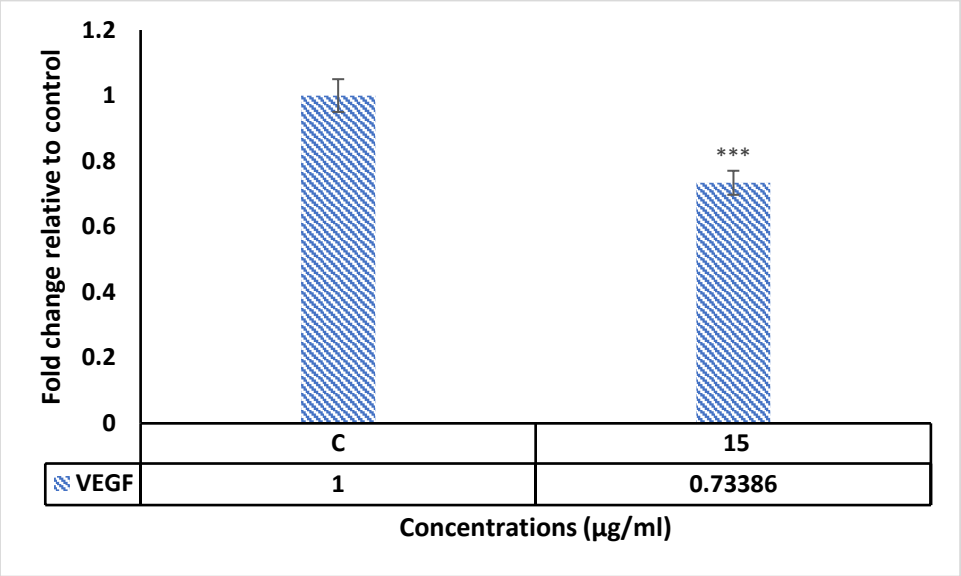
جدول ۱ میانگین قطر هاله ی عدم رشد باکتری های مورد نظر در برابر جنتامایسین و نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحشی *Amaranthus Cruentu* بر حسب میلی متر

	باکتری	درصد کدورت در میکروپلیت	شاهد
نمونه ۱	اشریشیاکلی	۲ میلی گرم بر میکرولیتر	جنتامایسین
نمونه ۲	استافیلوکوکوس اورئوس	۲ میلی گرم بر میکرولیتر	جنتامایسین
نمونه ۳	استافیلوکوکوس اپیدرمیس	۰/۵ میلی گرم بر میکرولیتر	جنتامایسین

جدول ۲ تعیین میزان حساسیت باکتری اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیس بر اساس تست میکروپلیت

۳.۲. یافته های حاصل از مطالعه فعالیت ضد آنژیوژنز نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحشی *Amaranthus Cruentus*

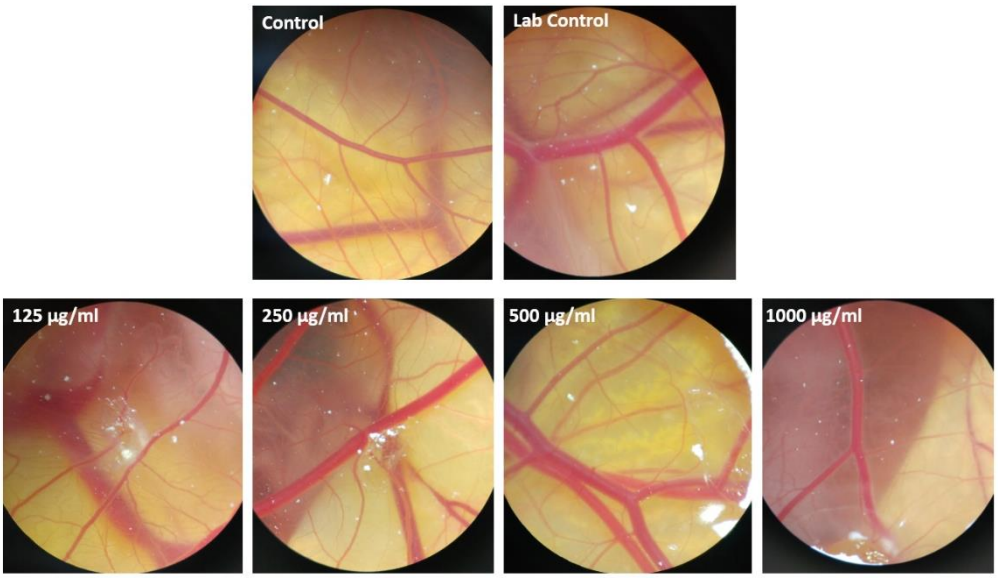
مطالعه تغییرات بیان ژن VEGF که یک ژن مهم مرتبط با فرایند ضد رگ زایی می باشد، در سلول های MCF -7 تیمار شده با غلظت نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحشی *Amaranthus Cruentus* نشان داد که این نانوذره قادر به مهار این ژن می باشد. بیشترین کاهش بیان ژن در غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر حدود ۳۷٪ کاهش مشاهده گردید. با افزایش غلظت تغییرات قابل توجهی در بیان این ژن مشاهده نشد.



نمودار۱ تغییرات بیان ژن VEGF در سلول های MCF -7 تحت تیمار با غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر ازنانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحشی *Amaranthus Cruentu*.داده ها در سطح P<۰/۰۰۱*** معنی دار است.

یافته های حاصل از تست CAM

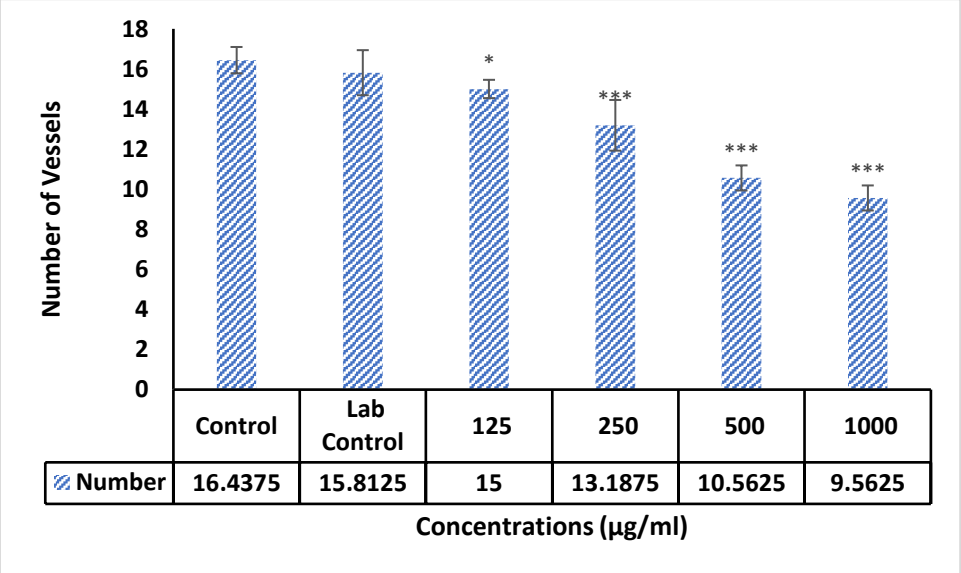
بررسی تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحش *Amaranthus Cruentus* یافته های تصویری به دست آمده از تست CAM نشان داد نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحش *Amaranthus Cruentus* قادر به کاهش تعداد و طول رگ ها می باشد. در غلظت های بالاتر این نانوذره شاهد تعداد عروق کمتری هستیم.



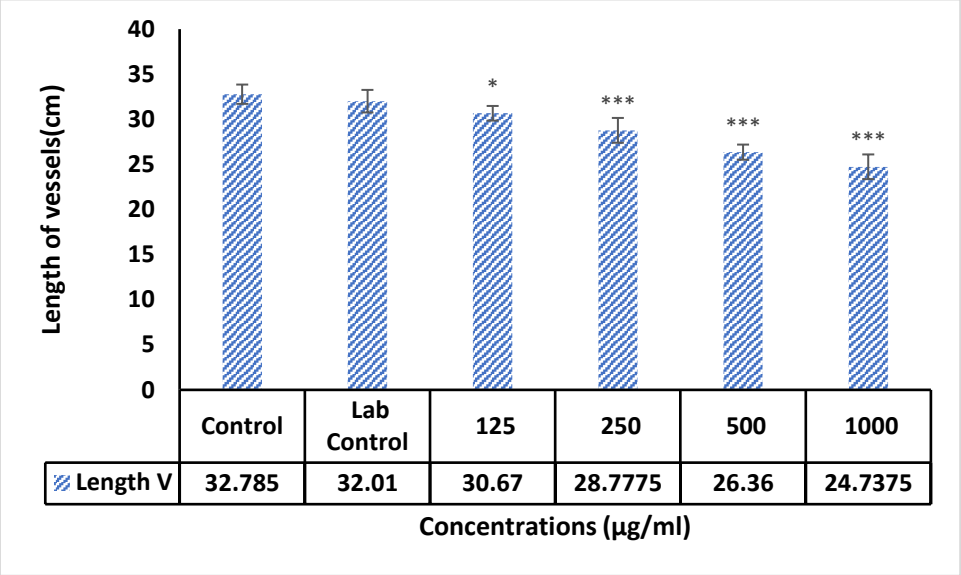
شکل ۴ بررسی های ریخت شناسی از میزان رگ زایی پرده کوریوالانتوئیک جوجه تحت تیمار با غلظت های مختلف نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحش*Amaranthus Cruentus*. (درشتمایی ×۲۰)

تصاویر بیانگر آن است که با افزایش غلظت نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحش*Amaranthus Cruentus* میزان رگ زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه کاهش پیدا می کند.

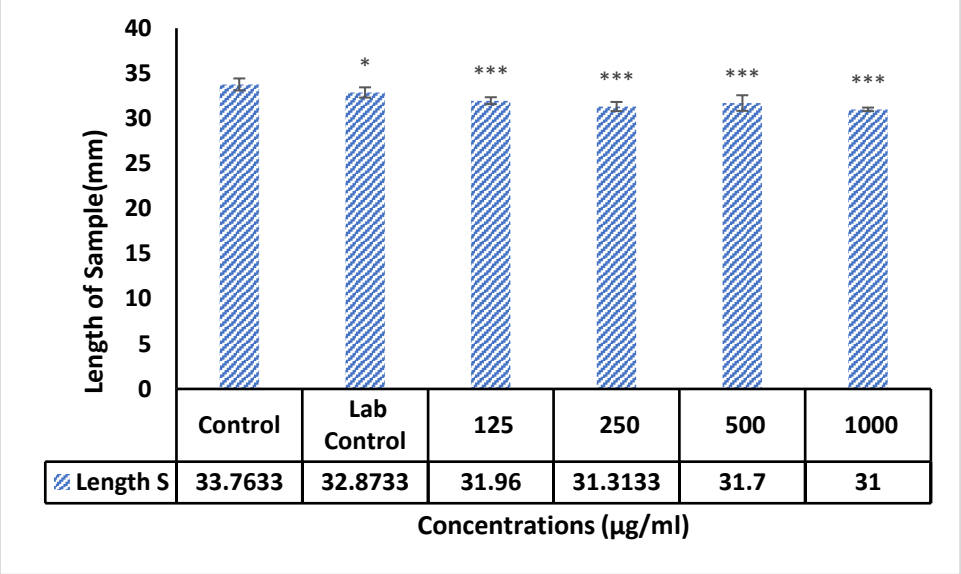
یافته های حاصل از این بررسی نشان داد غلظت نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحش*Amaranthus Cruentus*در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری سبب کاهش در تعداد و طول رگ های خونی می گردد. همچنین کاهش در تعداد و طول رگ ها با افزایش غلظت نانوذره بیشتر می شود که این نیز می تواند بیانگر اثر ضد رگ زایی وابسته به غلظت نانوذره مذکور باشد.



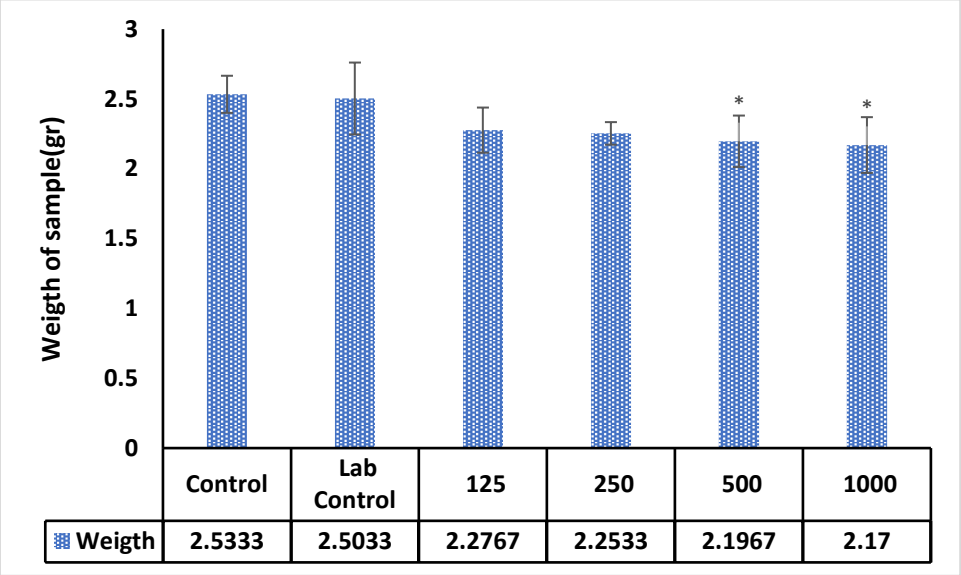
نمودار۳میانگین تعداد عروق خونی پرده کوریوآلانتوییک جوجه تیمار شده با غلظت های مختلف غلظت نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحش*Amaranthus Cruentus*در مقایسه با گروه کنترل داده ها در سطح ۰/۰۰۱>P***معنی دار است.



نمودار ۴- میانگین طول عروق خونی پرده کوریوآلانتوییک جوجه تیمار شده با غلظت های مختلف غلظت نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحش*Amaranthus Cruentus*در مقایسه با گروه کنترل داده ها در سطح ۰/۰۰۱>P*** معنی دار است.



نمودار ۶میانگین قد نمونه جنین جوجه تیمار شده با غلظت های مختلف غلظت نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحش*Amaranthus Cruentus*در مقایسه با گروه کنترل داده ها در سطح ۰/۰۰۱>P***معنی دار است.



نمودار ۷ میانگین وزن جنین جوجه تیمار شده با غلظت های مختلف غلظت نانو ذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحشی *Amaranthus Cruentus* در مقایسه با گروه کنترل داده ها در سطح P<۰/۰۰۵* معنی دار است.

٤. بحث و نتیجه گیری

یافته های حاصل از تست پرده جوجه کوریو آلانتوئیک نشان می دهد نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحشی دارای خاصیت ضد رگ زایی می باشد.

یافته های حاصل از تست آنتی باکتریال نشان داد که نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز از دانه گیاه تاج خروس وحشی قادر به مهار باکتری های اشرشیا کلی، استافیلو کوکوس اپیدرمیس، استافیلو کوکوس اورئوس می باشد.

منبع:

Efferth, T., *Mechanistic perspectives for 1, 2, 4-trioxanes in anti-cancer therapy.* Drug Resistance Updates, 2005. **8**(1-2): p. 85-97.

Emmenegger, U., et al., *Metronomic chemotherapy: principles and lessons learned from applications in the treatment of metastatic prostate cancer*, in *Angiogenesis Inhibition*. 2010, Springer. p. 165-183.

Cines, D.B., et al., *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.* Blood, 1998. **91**(10): p. 3527-3561.

Papetti, M. and I.M. Herman, *Mechanisms of normal andtumor-derived angiogenesis.* American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2002. **282**(5): p. C947-C970.

Carlos, T.M. and J.M. Harlan, *Leukocyte-endothelial adhesion molecules.* Blood, 1994. **84**(7): p. 2068-2101.

Investigating the effect of green synthesized silver nanoparticles with plant embryos*Amaranthus criuntus* plant extract Antibacterial, expression of VEGF genes and the rate of angiogenesis in chicken embryos

Mohsen Baghani[1-] Ali Es-haghi*[2]

[1]Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

[21]Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Abstract: Cancer is the most common type of disease. There are various factors that may play a role in causing cancer, but one of the factors of the growth of tumors or the feeding of tumors can be considered as the factors of the vessels. Angiogenesis is one of the processes of feeding tumors, and if we can control the vessel structures, we may be able to play an important role in the process of reducing the volume or treating tumors, for this reason, investigating the anti-angiogenic properties of synthesized silver nanoparticles. CAM test was performed on chicken embryos with concentrations of 0, 125, 250, 500, 1000 µg/ml. It was found that the desired nanoparticle can reduce angiogenesis by increasing its concentration. To confirm the anti-angiogenic property, VEGF gene expression was performed by Real Time PCR, which showed a reduction in the expression of this gene when confronted with the target nanoparticle. In order to measure the antimicrobial activity of silver nanoparticle, its effect against Escherichia coli, Staphylococcus aureus, and Staphylococcus epidermis bacteria was measured. The diameter of the non-growth halo created for these bacteria was reported to be 9, 9, and 12 mm, respectively, and the results show that the nanoparticle in question in this article has a better inhibitory effect on Gram-positive bacteria.

Keywords: Green method, anti-angiogenesis, gene

E-mail: ashaghi@gmail.com [1 1]

بررسی اثر آلفا آمیلازها و مهارکننده های آن ها بر درمان دیابت

زهرا رضائی انزها[1]*، محمد رضاواعظی کاخکی[1]، محسن داوری[2]

[1] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار
[2] گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی ،دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس

چکیده

دیابت ملیتوس (DM) احتمالاً یکی از قدیمی ترین بیماری های شناخته شده برای بشر است. دیابت نوع ۲ (که قبلاً به عنوان دیابت غیر وابسته به انسولین شناخته می شد) شایع ترین شکل دیابت است که با هیپرگلیسمی، مقاومت به انسولین و کمبود نسبی انسولین مشخص می‌شود. از گذشته بشر به دنبال راهی در طبیعت برای درمان بیماری بوده است. شروع استفاده از گیاهان دارویی با توجه به اینکه اطلاعات کافی در این زمینه وجود نداشت، بر اساس تجربه بوده است. آلفا آمیلاز (D-glucansluconohydrolase 1, 2) متعلق به خانواده گلیکوزیل هیدرولازهای شماره ۱۳ است که با شکستن پیوند گلیکوزیدی نشاسته و پلیمرهای مشابه را هیدرولیز کرده و نشاسته را به الیگوساکارید و در نهایت به مالتوز تبدیل کرده و تجزیه می کند. گلوکز در همه انواع موجودات مهارکننده های آنزیم های گوارشی، ترکیبات پروتئینی و غیر پروتئینی هستند که به محل فعال یا زیرلایه آنزیم متصل شده و فعالیت آن را مهار می کنند. مهار کننده این آنزیم ها هضم کربوهیدرات های پیچیده مانند نشاسته و گلیکوژن را به تاخیر می اندازد و زمان تجزیه کربوهیدرات ساده به طور کلی طولانی می کند.

کلید واژه ها: دیابت ، آلفا آمیلاز ، گیاهان دارویی

* e-mail: zahrarezaeeanzoha@gmail.com

۱. مقدمه

دیابت قندی (DM)احتمالاً یکی از قدیمی ترین بیماری های شناخته شده برای انسان است. این بیماری نخستین بار در نسخه خطی مصر حدود ۳۰۰۰ سال پیش گزارش شده است. در سال ۱۹۳۶، تمایز بین DM نوع ۱ و نوع ۲ مشخص شد. DM نوع ۲ برای اولین بار به عنوان یکی از مؤلفه های سندرم متابولیک در سال ۱۹۸۸ توصیف شد. DM نوع ۲ (که قبلاً به عنوان DM وابسته به انسولین شناخته نشده بود) رایج ترین شکل DM است که با قند خون، مقاومت به انسولین و کمبود نسبی انسولین مشخص می‌شود. DM نوع ۲ از تعامل بین عوامل خطر ژنتیکی، محیطی و رفتاری ناشی می‌شود. افرادی که مبتلا به DM نوع ۲ هستند در برابر اشکال مختلف عوارض کوتاه مدت و طولانی مدت آسیب پذیرتر هستند، که اغلب منجر به مرگ زودرس آنها می‌شود.(Burcelin, R et al.,1999)

۲. مواد و روش‌ها

۲. ۱. اهمیت گیاهان دارویی

از زمان های گذشته انسان برای درمان بیماری به دنبال راهی در طبیعت بود. آغاز استفاده از گیاهان دارویی با توجه به این که اطلاعات کافی در این زمینه وجود نداشت، بر اساس تجربه بود. به تدریج استفاده از گیاهان دارویی خاص برای برخی بیماری ها کشف شد. (Petrovska, B.B, 2012)

گرایش عمومی جوامع به طب سنتی و استفاده از داروهای گیاهی در طی سال های اخیر به علت بروز اثرات زیانبار داروهای شیمیایی بر سلامتی انسان و نارسایی های متعدد طب نوین در درمان برخی بیماری ها، روبه افزایش بوده است. O'Malley, P) (et al., 2005 حدود ۸۵ از درمان های سنتی وابسته به گیاهان هستند و حدود ۲۵٪ از تمام داروهای تجویز شده در جهان پیشرفته شامل اجزای مشتق شده از گیاهان دارویی بوده و ریشه بسیاری از داروهای سنتزی در ترکیبات موجود در گیاهان دارویی است.) Qureshi, R et al., 2009)-Kunwar, R.M. and Bussmann, R.W., 2008) گیاهان دارای ترکیبات بی شمار حیائی هستند که بخشی از رژیم غذایی سالم را تشکیل می دهند. به طور سنتی بخش های مختلف گیاهان به طور مستقیم به عنوان دارو مورد استفاده قرار می گیرند (Chin, Y.W et al., 2006)

در سال های اخیر تمایل زیادی به بررسی اثرات فیزیولوژی و فارماکولوژی عصاره های گیاهی و استفاده از داروهای گیاهی در جهان و به خصوص در ایران ایجاد شده است . یکی از مشکلات بزرگی که طب جدید با وجود امتیازهای ظاهری نسبت به طب سنتی با خود به ارمغان آورده، مصرف روز افزون داروهای شیمیایی است. این مسئله با گذشت زمان، شکل حادتری به خود می گیرد. گیاهان دارویی به این دلیل که دسترسی آسان هزینه عوارض جانبی کمتری دارند، یک جایگاه خاص برای درمان انواع بیماری ها دارند.(Marles, R.J., 1994)-(O’Keefe et al., 2008)

۲. ۲. متابولیک های گیاهی

بشر در طول قرن ها به گیاهان به عنوان منبع کربوهیدرات، پروتئین و چربی وابستگی کامل داشته است. علاوه بر این گیاهان منبع طیف وسیعی از متابولیت های ثانویه می باشند. مهم ترین متابولیت های ثانویه آلکالوئیدها، فنولیک ها، روغن های ضروری، استروئیدها، لیگنین ها، تانن ها و فلاونوئیدها می باشند. تولید متابولیت های ثانویه بخشی از سیستم دفاعی گیاه را تشکیل می دهد. متابولیت های ثانویه جنبه های مهمی از کیفیت غذای انسان (رنگ، بو، طعم) را تعیین می کنند. برخی از آنها نظیر رنگدانه های

گیاهی برای تولید داروها، حشره کش ها، چاشنی های غذایی، رنگ ها و خوشبو کننده ها مورد استفاده قرار می گیرند. (Rao, S.R. and Ravishankar, G.A., 2002)

استخراج مواد گیاهان دارویی به شرایط محیطی که گیاه در آن می روید، نوع حلال و روش عصاره گیری بستگی دارد. ویژگی حلال بسته به غلظت حلال و قطبیت آن، کمیت ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره های گیاهی را تحت تأثیر قرار خواهد داد. انتخاب ماده گیاهی برای عصاره گیری و بررسی عملکرد آن معمولا بر اساس استفاده های سنتی گیاه است و به سادگی می توان بخش های مختلف گیاه را بررسی کرد. تعیین ترکیبات فعال زیستی در ماده مورد استفاده به نوع حلال استفاده شده در عصاره گیری بستگی دارد.(Geethalakshmi, R et al., 2010)

۲. ۳. آلفا آمیلاز

آلفا آمیلاز (1,2-D - glucansluconohydrolase) متعلق به خانواده گلیکوزیل هیدرولازهای شماره ۱۳ می باشد، که نشاسته و پلیمر های مشابه آن را با شکستن اتصال گلیکوزیدی (۱, ۴) هیدرولیز می کند و نشاسته را به الگوساکاریدها و نهایتا به مالتوز و گلوکز تجزیه می کنند در تمام انواع موجودات وجود دارد.(Gottschalk, T.E et al., 1998) آلفا آمیلاز انسانی متشکل از ۱۵۲ اسید آمینه در یک زنجیره الیگوساکاریدی با وزن مولکولی ۵۷KD , ۶ است. PH مطلوب برای این آنزیم حدود ۷ می باشد. یون های کلر، برم، نیترات آن را فعال وسیترات و اگزالات آن را مهار می کنند. این آنزیم در بزاق و پانکراس انسان وجود دارد (Hagenbüchle, O et al., 1980) در انسان پنج ژن آلفا آمیلاز در کروموزوم ۱ در جایگاه ۲۱و۱ وجود دارد، که سه ژن آن آلفا آمیلاز بزاقی و دو ژن آمیلاز پانکراسی را که می کند. (Groot, P.C et al., 1988)-(Gumucio, D.L et al., 1988). آنزیم آمیلاز بزاقی در بزاق انسان چندین عملکرد بیولوژیکی در حفره دهان ایفا می کند. فعالیت هیدرولیتیکی آن که مسئول شکسته شدن نشاسته به الیگوساکاریدها می باشند. آمیلاز بزاقی با اتصال به مینای دندان و با هیدروکسی آپاتیت" نقش در تشکیل پلاک دندان دارد.(Ramasubbu, N et al., 1996)-(Scannapieco, F.A et al., 1993)

بطور کلی آمیلازها به سه گروه آلفا آمیلاز (ylase-)، بتا آمیلاز (Armylase-) و گاما آمیلاز (Amylase۲) تقسیم بندی می شوند. آلفا آمیلاز که عمل هیدولیز آن مرتب نبوده و در قسمت های مختلف زنجیره اثر می کند. آلفا آمیلاز موجود در بزاق کمی از نشاسته را تبدیل می کنند چون مدت توقف غذا در دهان ناچیز است ولی قسمت عمده فعالیت این آنزیم مربوط به آمیلاز پانکراس است . (Hagenbüchle, O et al., 1980)

۲. ٤. مهارکننده های آلفا آمیلاز

مهارکننده‌های آنزیم های گوارشی ترکیباتی پروتئینی با غیر پروتئینی هستند که با متصل شدن به جایگاه فعال و یا به سوبسترای آنزیم، فعالیت آن را مهار می کنند. مهار کننده این آنزیم ها هضم کربوهیدرات های پیچیده مانند نشاسته و گلیکوژن را به کربوهیدرات های ساده به تاخیر انداخته و زمان تجزیه آنها را به طور کلی، طولانی تر می کند. مهارکننده‌های آلفا آمیلازها از نظر کلی به دو گروه مهارکننده‌های غیر پروتئینی و مهارکننده‌های پروتئینی تقسیم می شوند. گروه مهارکننده‌های غیر پروتئینی یک خانواده از داروهای آنتی دیابتیک هستند شامل انواع مختلفی از ترکیبات آلی مانند آکاربوز، ایزوآکار پور، آکار و بوزین، گلوکز، هیسگوس اسید و سایکودکسترین ها می باشد (Cabral, K.M et al., 2003) این داروها خیلی قوی و مناسب برای درمان دیابت نوع ۲(غیر وابسته به انسولین) هستند اما عوارض جانبی بر روی دستگاه گوارش دارند و همین امر استفاده از آنها را محدود می نماید (Sales, P.M et al., 2012) مهارکننده‌های پروتئینی در میکروارگانیسم ها، جانوران و گیاهان بافت می‌شود.

مهارکننده‌های الیگوساکاریدی از خانواده ترستاتین ها که شامل آکار ویوزین ها مثل آکاربوز آکار و پوتین تراساکارید کاذبی است که به وسیله فرمائتیون تولید می‌شود. و نتیجه پلی هیدروکسیله شدن مشتقات آمینو سیکلو هگزان (والین آمین) است که از طریق پیوند N گلیکوزیدی به داکی گلوکز و از طریق اتصالات به مالتوز متصل می گردد.

اکاربوز مهار کننده رقابتی آلفا آمیلاز است که مکانیسم مهارش به وسیله ایجاد حلقه گلیکوزیدی غیر اشباع واتصالات N گلیکوزیدی می باشد و حالت انتقال برای شکست آنزیمی را مهار می کند (Funke, I. and Melzig, M.F., 2006) در مطالعه ساختمانی کمپلکس أکاربوز - ألفا آمیلاز مشخص شده است که آگاروز از طریق زیر واحد ۲+ به ۳متصل می‌شود و باعث تشدید اتصال به زنجیره جانبی ۱۹۷Asp, ۲۳۳Glu و ۳۰۰Asp می‌شود. مطالعات سینتیکی اهمیت گروه های هیدرو گسیل موجود در لیگاند با اسید آمینه های ۱۹۷Asp, ۲۳۳Glu و ۳۰۰Asp موجود در مکان اتصال را مشخص کرده است. در این اتصال پیوندهای الکتروستاتیکی، هیدروژنی و arene H شرکت دارند. میل ترکیبی این میان کنش mol/Kcal گزارش شده است نیمه عمر این دارو حدود دو ساعت است.(Brayer, G.D et al., 2000) اثرات جانبی مصرف آکاربوز شامل مشکلات گوارشی، درد و نفخ شکم و اسهال است که می تواند به علت افزایش محصولات تخریبی در روده در نتیجه تخمیر باکتری های طبیعی روده بر روی کربوهیدرات های هضم نشده باشد. این اثرات جانبی در ۲۰٪ بیماران مشاهده می‌شود. (Kwon, Y.I et al., 2008)-(Gyémánt, G et al., 2003)

۲. ۵. مهارکننده‌های گیاهی آلفا آمیلاز

از گیاهان دارویی مختلفی به عنوان مهارکننده های آلفا آمیلاز بررسی شده است که می تواند برای درمان دیابت نوع دو توصیه شوند. تعدادی از این گیاهان مهار کننده شامل: لوبیا(Phaseolus vulgaris L) . ریحان Ocimum tenuiflorum L)، رزماری (Rosmarianus scinalis L)، نوروژک(Salvia ocetabulosa L) انار (Punica granatum L) و ... که توسط محققین بررسی شده است. تقریبا ۸۰۰ گونه گیاهی گزارش شده که دارای خواص آنتی دیانتیک هستند. رنج وسیعی از ترکیبات مشتق شده از گیاهان به طور عمده آلکالوئیدها، گلیکوزید ها، گالاکتوماتان" گوم پلی ساکارید ها، هیپو گلایکانها، پپتیدوگلیکان ها گوانیدها، استروئیدها، گلایکو پپتیدها و ترپنوئیدها فعالیت زیستی در برابر هایپرگلایسمی از خود نشان می دهند. (Funke, I. and Melzig, M.F., 2006)

۲. ٦. آمیلاز سرم پایین، چاقی، دیابت و سندرم متابولیک

به طور سنتی، سطح آمیلاز سرم معمولاً برای تعیین وجود پانکراتیت حاد و بیماری مجاری صفراوی در تنظیمات بالینی اولیه اندازه گیری می‌شود. در مقابل، اکثر پزشکان به ندرت آن را تعیین می کنند تا میزان پانکراتیت مزمن پیشرفته را مشخص کنند، که درنهایت منجر به دیابت ثانویه همراه با کاهش وزن، اسهال چربی و سوء تغذیه می‌شود. در حالی که بعضی از سرطان ها مانند سرطان ریه، تخمدان و روده بزرگ و میلوما اغلب آمیلاز تولید می کنند و آمیلاز سرمی را افزایش می دهند، چنین افزایش آمیلاز سرم ممکن است در یک جمعیت عمومی استثنایی باشد. در مقابل، آمیلاز سرم کم به طور تجربی در بیماران دیابتی به ویژه دیابت وابسته به انسولین (در درجه اول دیابت نوع ۱) شناخته شده است، اگرچه ارتباط بالینی و مکانیسم زمینه ای دقیق کاملاً درک نشده است.(Fauci, A.S et al., 2008)

۲. ۷. ارتباط شرایط کاردیومتابولیک چاقی و بیماری های مرتبط با چاقی

یک مطالعه اولیه بالینی در مورد مردان جوان ۱۹ تا ۲۲ ساله توسط Kondo و همکاران نشان داد که آمیلاز و تریپسین پانکراس سرم در افراد چاق (۸۵ نفر) در مقایسه با افراد لاغر کاهش یافته است. چنین روندی در تریپسین لوزالمعده مشاهده نشده است. در مطالعات مقطعی قبلی ما طی یک دهه گذشته، آمیلاز سرم کم به طور قابل توجهی با MetS، دیابت (عمدتا دیابت نوع ۲) همراه بود، و حتی پس از تنظیم عوامل مخدوش مربوطه از جمله سن، جنس، سیگار کشیدن همچنان معنی دار باقی ماند. در این مطالعه، شاخص توده بدنی (BMI) عامل اصلی ارتباط با آمیلاز سرم است. علاوه بر این، آمیلاز سرم کم همراه با بیماری کبد چرب غیر الکلی (NAFLD)، تظاهرات کبدی MetS و مقاومت به انسولین، در بزرگسالان بدون علامت مستقل از عوامل مخدوش مربوط است. نتایج این مطالعات اپیدمیولوژیک متعاقباً در دیگر جمعیت های بزرگ آسیا تأیید شدند. این نتایج نشان می دهد که آمیلاز سرم پایین نه تنها در شرایط نادر از کاهش انسولین (سهم جزئی) بلکه در شرایط مشترک قلب و عروق مانند MetS، دیابت نوع ۲ یا NAFLD (سهم عمده) مشاهده می‌شود. چاقی، به عنوان یک بیماری مرتبط با بیماریهای مختلف قلبی متابولیک همزمان با مقاومت به انسولین، ممکن است یک عامل اصلی تعیین کننده آمیلاز سرم کم در جمعیت عمومی باشد (یک تعبیر جدید). یک مطالعه بالینی در بیماران بستری توسط Curd و همکارانش نشان داد که hypoamylasemia علاوه بر دیابت، همراه با فیبروز کیستیک، hypertriglyceridemia و استفاده از آنتی بیوتیک جنتامایسین است. اگرچه ممکن است فیبروز کیستیک و استفاده از جنتامایسین نادر باشد، اما hypertriglyceridemia شایع است. با این حال، مکمل انسولین اگزوژن می تواند آمیلاز سرمی کم در دیابت نوع ۱ را بهبود بخشد. مطالعات کلینیکی اولیه نشان داده اند که آمیلاز پانکراس سرم ارتباط نزدیکی با غلظت پپتید C و عملکرد سلولهای بتا لوزالمعده دارد. با توجه به ارتباط بین دیابت و آمیلاز سرم، قابل توجه است که سطح آمیلاز سرم با مقادیر HbA1c در جامعه عمومی از جمله افراد سالم و بیماران دیابتی به طور خطی ارتباطی ندارد، اگرچه گلوکز ناشتا با آمیلاز سرم همبستگی منفی و خطی داشت. در این مطالعه، آمیلاز سرم رابطه معکوس U شکل با گروه HbA1c نشان داد. به طور غیر منتظره، سطح آمیلاز سرم در افراد دارای HbA1c که مقدار آن بین ۵.۶ – ۶.۵ درصد است بالاتر بود. علاوه بر این، hyperinsulinemia ناشی از مقاومت به انسولین برای حفظ euglycemia، یک یافته مشترک در ابتلا به دیابت نوع ۲، ممکن است تولید آمیلاز پانکراس را افزایش دهد. پس از پیشرفت به دیابت آشکار با HbA1c بیش از ۶.۵ مقاومت به انسولین توسط hyperinsulinemia کنترل نمی‌شود و ترشح انسولین شروع به کاهش می کند، در نتیجه کاهش قابل توجهی در آمیلاز بزاق لوزالمعده ایجاد می‌شود. این نتایج نشان می دهد که رابطه بین آمیلاز سرم و دیابت و چاقی یک ارتباط متقابل اگزوکرین و غدد درون ریز است، که به نوبه خود ممکن است به سیستم بازخورد در هموستاز انرژی کمک کند. (Fauci, A.S et al., 2008)

۲. ۸. گیاهان دارای مهارکننده آمیلاز که می توانند قند خون را کاهش دهند

کرم غوزه پنبه، Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)، یکی از آفات همه چیز خوار مهم است که در سراسر دنیا شیوع دارد. امروزه به دلیل اثرات نامطلوب سموم شیمیایی، مطالعه مهارکننده های آنزیم آلفا-آمیلاز (E.C. 3.2.1.1) در حشرات، به عنوان روش جایگزین برای برنامه های مدیریت آفات مورد توجه قرار گرفته است. بذر نخود و کهورک میتوانند به عنوان منابع مؤثر و مهمی از مهار کننده آنزیم آلفا-آمیلاز معرفی شوند و به عنوان جایگزین برای سموم شیمیایی در آینده مورد توجه قرار گیرند.(Hanefeld, M. and Temelkova-Kurktschiev, T., 2002)

سن معمولی گندم، Eurygaster integriceps Puton (Hemiptera: Scutelleridae) یکی از آفات مهم گندم و جو است که از دانه های آن ها تغذیه می کند، بنابراین این آفت در محیطی غنی از کربوهیدرات زندگی می کند و برای بقای خود، وابستگی بسیار زیادی به آنزیم های کربوهیدراز دارد. آنزیم آلفا-آمیلاز نقش مهمی در گوارش سن گندم بر عهده دارد. (Ali, H et al., 2006)

میله های چوبی جویدنی از گونه های مختلف گیاهی تهیه می‌شود و به طور معمول برای تمیز کردن دندان ها در آسیا، آفریقا، آمریکای جنوبی و خاورمیانه مورد استفاده قرار می گیرد. Salvadora persica یا آراک (miswak) (نام خانوادگی: Salvadoraceae) منبع اصلی مواد برای چوب های جویدنی در عربستان سعودی و بسیاری از خاورمیانه است. نشان داده شده است که عصاره miswak دارای خواص بیولوژیکی متنوعی از جمله اثرات ضد باکتری و ضد قارچ قابل توجه است. تجزیه و تحلیل شیمیایی miswak وجود گلیکوزیدها، مانند salvadoside و salvadoraside و فلاونوئیدها را نشان داده است. اجزای آنیونی ضد میکروبی موجود در miswak شامل سولفات (-SO42) و تیوسیانات (-SCN) است. تیوسیانات به عنوان سوبسترای لاکتوپراکسیداز بزاقی عمل می کند تا در صورت وجود پراکسید هیدروژن باعث ایجاد هیپوتیوسیانیت شود. آمیلازها (EC 3.2.1.1) نوعی هیدرولاز هستند که به طور گسترده در میکروب ها، گیاهان و حیوانات توزیع می شوند. آنها به طور خاص می توانند پیوندهای O-glycosidic را در نشاسته، گلیکوژن و چندین الیگوساکارید را از هم جدا کنند. α- آمیلازها و آنزیمهای آمیلولیتیک مرتبط از مهمترین آنزیمها هستند و دارای اهمیت زیادی در بیوتکنولوژی امروزی هستند. (Kunwar, R.M. and Bussmann, R.W., 2008)

مطالعات زیادی در مورد حیوانات و مطالعات بسیار کمی در مورد انسان وجود دارد که سعی در بررسی ویژگیهای بیوشیمیایی و مکانیسمهای اساسی برای پیوند سلولهای جزایر غدد درون ریز و سلولهای آسینی اگزوکرین دارد. سطح آمیلاز و لیپاز در گروه DM نوع ۱ و سطح آمیلاز به طور معنی داری پایین تر در گروه دیابتی نوع ۲ نسبت به گروه کنترل سالم مشاهده شده است.

۳. نتیجه گیری

در این بررسی ، ما توسعه مفهوم پاتوفیزیولوژی دیابت همراه با گزینه های درمانی نجات بخش فراتر از انسولین را که به طور چشمگیری کیفیت زندگی و امید به زندگی افراد مبتلا را افزایش داده اند، توصیف کردیم. در این مطالعه می توان دریافت که عوامل موثر بر قند خون باعث کنترل قند خون بهتر شده و تمرکز روی آنها راهبردهای پیشگیری از عوارض دیابتی را افزایش داده است. برای درمان DM نوع ۲ شامل رویکرد همزمان کنترل قند به همراه لیپیدها، فشار خون و چاقی است. از آنجا که چاقی بیش از ۸۰٪ از جمعیت DM نوع ۲ را درگیر می کند و در بهبود سایر فاکتورهای هدفمند نقش دارد، استراتژی درمانی آن باید در ارزیابی جامع مراقبت از دیابت اولویت باشد. اما با وجود دانش وهمه داروهای موجود، همواره نیاز به گزینه های درمانی مؤثرتر وجود دارد تا در آینده ای نزدیک بتوان بیماری را در مسیری پاتوفیزیولوژیکی حتی دقیق تر تحت تأثیر قرار داد. سطح آمیلاز سرمی و لیپاز در گروه دیابت نوع ۱ و سطح آمیلاز در گروه دیابت نوع ۲ کمتر از افراد سالم است وهمچنین سطح آمیلاز بزاقی در بیماران دیابتی بیشتر از افراد سالم است.در نتیجه مصرف گیاهان مهارکننده ی آلفا آمیلاز باعث کاهش قند خون و بهبود شرایط دیابت می‌شود.

منابع

Burcelin, R., Rolland, E., Dolci, W., Germain, S., Carrel, V. and Thorens, B., 1999. Encapsulated, Genetically Engineered Cells, Secreting Glucagon-like Peptide-1 for the Treatment of Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *875*(1), pp.277-285.

Petrovska, B.B., 2012. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*, *6*(11), p.1.

O'Malley, P., Trimble, N. and Browning, M., 2005. Are herbal therapies worth the risks?. Holistic Nursing Practice, 19(1), pp.44-47.

Kunwar, R.M. and Bussmann, R.W., 2008. Ethnobotany in the nepal himalaya. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, *4*, pp.1-8.

Qureshi, R., Waheed, A., Arshad, M. and Umbreen, T., 2009. Medico-ethnobotanical inventory of tehsil Chakwal, Pakistan. *Pak J Bot*, *41*(2), pp.529-38.

Chin, Y.W., Balunas, M.J., Chai, H.B. and Kinghorn, A.D., 2006. Drug discovery from natural sources. *The AAPS journal*, *8*, pp.E239-E253.

Marles, R.J., 1994. Plants as sources of antidiabetic agents. *Econ Med Plant Res*, *6*, pp.149-187.

O'Keefe, J.H., Gheewala, N.M. and O'Keefe, J.O., 2008. Dietary strategies for improving post-prandial glucose, lipids, inflammation, and cardiovascular health. *Journal of the American College of Cardiology*, *51*(3), pp.249-255.

Rao, S.R. and Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, *20*(2), pp.101-153.

Geethalakshmi, R., Sarada, D.V.L., Marimuthu, P. and Ramasamy, K., 2010. α-Amylase inhibitory activity of Trianthema decandra L. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, *6*(3), pp.369-376.

Gottschalk, T.E., Fierobe, H.P., Mirgorodskaya, E., Clarke, A.J., Tull, D., Sigurskjold, B.W., Christensen, T., Payre, N., Frandsen, T.P., Juge, N. and McGuire, K.A., 1998. Structure, function and protein engineering of starch-degrading enzymes. *Biochemical Society Transactions*, *26*(2), pp.198-204.

Hagenbüchle, O., Bovey, R. and Young, R.A., 1980. Tissue-specific expression of mouse α-amylase genes: nucleotide sequence of isoenzyme mRNAs from pancreas and salivary gland. *Cell*, *21*(1), pp.179-187.

Groot, P.C., Bleeker, M.J., Pronk, J.C., Arwert, F., Mager, W.H., Planta, R.J., Eriksson, A.W. and Frants, R.R., 1988. Human pancreatic amylase is encoded by two different genes. *Nucleic acids research*, *16*(10), p.4724.

Gumucio, D.L., Wiebauer, K., Caldwell, R.M., Samuelson, L.C. and Meisler, M.H., 1988. Concerted evolution of human amylase genes. *Molecular and Cellular Biology*, *8*(3), pp.1197-1205.

Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y., Brayer, G.D. and Levine, M.J., 1996. Structure of human salivary α-amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *52*(3), pp.435-446.

Scannapieco, F.A., Torres, G. and Levine, M.J., 1993. Salivary α-amylase: role in dental plaque and caries formation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, *4*(3), pp.301-307.

Cabral, K.M., Almeida, M.S., Valente, A.P., Almeida, F.C. and Kurtenbach, E., 2003. Production of the active antifungal Pisum sativum defensin 1 (Psd1) in Pichia pastoris: overcoming the inefficiency of the STE13 protease. *Protein Expression and Purification*, *31*(1), pp.115-122.

Sales, P.M., Souza, P.M., Simeoni, L.A., Magalhães, P.O. and Silveira, D., 2012. α-Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, *15*(1), pp.141-183.

Funke, I. and Melzig, M.F., 2006. Traditionally used plants in diabetes therapy: phytotherapeutics as inhibitors of alpha-amylase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *16*, pp.1-5.

Brayer, G.D., Sidhu, G., Maurus, R., Rydberg, E.H., Braun, C., Wang, Y., Nguyen, N.T., Overall, C.M. and Withers, S.G., 2000. Subsite mapping of the human pancreatic α-amylase active site through structural, kinetic, and mutagenesis techniques. *Biochemistry*, *39*(16), pp.4778-4791.

Gyémánt, G., Kandra, L., Nagy, V. and Somsák, L., 2003. Inhibition of human salivary α-amylase by glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin. *Biochemical and biophysical research communications*, *312*(2), pp.334-339.

Kwon, Y.I., Apostolidis, E. and Shetty, K.J.B.T., 2008. In vitro studies of eggplant (Solanum melongena) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Bioresource Technology*, *99*(8), pp.2981-2988.

Fauci, A.S., Wald, E.B., Isselbacher, K.J., Wilson, J.D., Martin, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L. and Longo, D.L., 2008. Harrisons Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill.

Hanefeld, M. and Temelkova-Kurktschiev, T., 2002. Control of post-prandial hyperglycemia--an essential part of good diabetes treatment and prevention of cardiovascular complications. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD*, *12*(2), pp.98-107.

Ali, H., Houghton, P.J. and Soumyanath, A., 2006. α-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to Phyllanthus amarus. Journal of ethnopharmacology, 107(3), pp.449-455.

Investigating the effect of alpha amylases and their inhibitors on the treatment of diabetes

Zahra Rezaee Anzoha[1] ,Mohammad Reza Vaezi Kakhki[1], Mohsen Davari[2]

[1] Biology, Basic Sciences, Hakim Sabzevari, Sabzevar
[2] Biochemistry, Medicine, Medical Sciences Hormozgan, Bandar Abbas

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is probably one of the oldest diseases known to man. Type 2 DM (formerly known as non-insulin-dependent DM) is the most common form of DM, characterized by hyperglycemia, insulin resistance, and relative insulin deficiency. Since ancient times, man has been looking for a way in nature to cure disease. The beginning of the use of medicinal plants was based on experience, considering that there was not enough information in this field. Alpha-amylase (- D-glucansluconohydrolase 1, 2) belongs to the family of glycosyl hydrolases number 13, which hydrolyzes starch and similar polymers by breaking the glycosidic bond (1, 4) and converts starch to algosaccharides and finally to maltose. and break down glucose in all types of organisms. Inhibitors of digestive enzymes are protein and non-protein compounds that bind to the active site or to the substrate of the enzyme and inhibit its activity. The inhibitor of these enzymes delays the digestion of complex carbohydrates such as starch and glycogen into simple carbohydrates and prolongs their breakdown time in general.

Key words: Diabetes, alpha amylase, medicinal plants

Email: zahrarezaeeanzoha@gmail.com

بررسی اثر بسترهای مختلف کشت و کودهای زیستی و غیرزیستی بر عملکرد و مواد مؤثره گیاه دارویی زنجبیل (*Zingiber officinale* Rosc)

سیده اکرم میری*، غلامعلی اکبری

گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده فناوری کشاورزی (ابوریحان)، دانشگاه تهران، ایران

چکیده

برای بررسی اثر بسترهای مختلف کشت و کودهای زیستی و غیرزیستی بر عملکرد و مواد مؤثره گیاه دارویی زنجبیل آزمایشی طی سال زراعی ۱۴۰۰ در گلخانه، دانشکده فناوری کشاورزی (ابوریحان) دانشگاه تهران اجرا شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار بود. تیمارهای موردبررسی شامل بستر کاشت در چهار سطح (۷۰ درصد ورمی‌کمپوست +۳۰ درصد خاک، ۷۰ درصد ورمی‌کمپوست +۳۰ درصد پرلیت، ۷۰ درصد کود دامی +۳۰ درصد خاک و ۷۰ درصد کود دامی+۳۰ درصد پرلیت) و مصرف کود در سه سطح (بدون مصرف کود، مصرف NPK و مصرف کود زیستی) بودند. نتایج نشان داد بیشترین میزان عملکرد بیولوژیکی و عملکرد در هکتار در اثر متقابل بستر کاشت ورمی‌کمپوست ۷۰٪+پرلیت ۳۰٪ و عدم مصرف کود مشاهده شد. بستر کاشت کود دامی ۷۰٪+پرلیت ۳۰٪ توأم با مصرف کود شیمیایی NPK بیشترین میزان اسانس را تولیدکرد. بیشترین میزان ماده مؤثره Geranial در اثر متقابل بستر کاشت ورمی‌کمپوست ۷۰٪+پرلیت ۳۰٪ توأم با مصرف کود زیستی مشاهده‌گردید. بیشترین میزان ماده مؤثره α-Zingiberene در اثر متقابل بستر کاشت ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت+ مصرف کودهای شیمیایی NPK مشاهده شد. بیشترین میزان ماده مؤثره Neral در تیمارهای اصلی کود دامی ۷۰٪+خاک ۳۰٪ و تیمار اصلی کود زیستی حاصل شد. به نظر می‌رسد که با وجود واکنش بسیار خوب گیاه زنجبیل به کاربرد مقادیر کافی کودهای موجود در بسترکاشت نیاز غذایی این گیاه را برای بهترین کارایی و عکس‌العمل در صفات مذکور فراهم نموده است. بنابراین مدیریت صحیح در تهیه بسترکشت ارگانیک و استفاده معقول از مقادیر مناسب کود می‌تواند مناسب و ضروری باشد.

واژگان کلیدی: اسانس، زنجبیل، عملکرد، Geranial، α-Zingiberene، Neral

* e-mail: akram.miri@ut.ac.ir

۱. مقدمه

گیاهان دارویی علاوه بر جنبه‌های اکولوژیکی، اقتصادی و فرهنگی برای مصارف دارویی بسیار حیاتی هستند که به‌عنوان ابزار اصلی در جهان برای درمان بیماری‌ها و مبارزه با عفونت‌های بدن مورداستفاده قرار می‌گیرند و از دوران باستان، این گیاهان منبعی غنی از داروهای مؤثر و بی‌خطر بوده‌اند. علاوه بر این، در جهان ۶۴ درصد از جمعیت برای درمان مشکلات سلامتی به گیاهان دارویی متکی هستند (Haile et al., 2022).

زنجبیل متعلق به جنس Zingiberaceae که برای اهداف دارویی (تسکین حالت تهوع، درمان معده درد، ضدزخم و ضدکولینرژیک، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و روماتولوژیک، ضدمیکروبی و به‌عنوان یک داروی غرایز جنسی)، آشپزی و هم‌چنین برای دفع پشه‌ها نیز استفاده می‌شود (Daharia et al., 2022). ترکیبات فعال اصلی زنجبیل عبارت‌اند از جینجرول (۲۵–۲۳ درصد)، شوگائول (۱۹–۱۸ درصد)، جینجرون و زینجیبرن است (Supriya et al., 2020).

مدیریت عناصر غذایی به معنای استفاده از مواد مغذی متعادل بر اساس نیاز خاک و محصول است، حفظ افزایش عملکرد خاک و محصول نیاز به مدیریت کود کافی دارد که مدیریت یکپارچه مواد مغذی می‌تواند گزینه خوبی برای مدیریت سلامت خاک و بهره‌وری محصول باشد که در آن کودهای شیمیایی با منابع آلی مواد مغذی ادغام می‌شود (Kumar et al., 2022). عملکرد بالای زنجبیل تابعی از تأمین کافی و به‌موقع مواد مغذی گیاه است که در این راستا، فناوری‌های مختلف زراعی که بر تولید زنجبیل تأثیر می‌گذارند، تأمین ماده مغذی تأثیر زیادی بر رشد و عملکرد زنجبیل دارد که عدم تعادل و مصرف کم یا عدم مصرف کود یکی از مهم‌ترین عوامل در دست‌یابی به عملکرد ضعیف است (Supriya et al., 2020).

استفاده از کودهای آلی نه تنها می‌تواند باعث بهبود حاصل‌خیزی خاک گشته، بلکه خواص فیزیکی و شیمیایی خاک را نیز بهبود می‌بخشد و ظرفیت ذخیره آب خاک را افزایش می‌دهد، هم‌چنین به‌طور مؤثر رشد رویشی و رشد تولیدمثلی گیاهان را افزایش داده که در نهایت سبب بهبود کیفیت گیاهان می‌گردد (Ye et al., 2022). استفاده از کودهای آلی اثربخشی استفاده از کود را افزایش می‌دهد و سلامت سیستم خاک را برای پایداری طولانی مدت حفظ می‌نماید در این راستا کاربرد منابع ارگانیک مانند کود دامی، ورمی‌کمپوست و کودهای زیستی را می‌توان برای ادغام با کودهای شیمیایی استفاده کرد (Kumar et al., 2022).

پرلیت ویژگی‌های فیزیکی بسیار خوبی دارد. خواص فیزیکی بسترهای کشت، به‌ویژه فضای هوا، ظرفیت ظرف و چگالی ظاهری تأثیر قابل‌توجهی بر رشد گیاه دارد، به‌علاوه پرلیت به دلیل ظرفیت جذب بسیار بالا که به کانی غالب بستگی دارد، می‌تواند در زمینه‌های مختلف از جمله کشاورزی استفاده شود. پرلیت در کشاورزی به‌عنوان قارچ‌کش، علف‌کش یا حامل مواد مغذی گیاهی استفاده می‌شود، این امر صرفاً به دلیل ظرفیت جذب بالای این سنگ امکان‌پذیر است. هنگامی‌که مواد مغذی به این روش وارد خاک می‌شوند، میزان مصرف آن‌ها کاهش می‌یابد، بنابراین دیگر نیازی به اضافه‌کردن آن‌ها نیست و در نتیجه مواد غذایی کمتری (عمدتاً نیتروژن که باعث اتروفیکاسیون منابع آب می‌شود) به زمین و سطح شسته وارد می‌شود (Markoska and Spalevic, 2020).

عملکرد ریزوم زنجبیل تحت بسترکاشت ورمی‌کمپوست (منابع یکپارچه تأمین مواد مغذی) با میانگین (۱۰/۲۱ Mg ha−1) نسبت به ورمی‌کمپوست (۱۱/۸۲ Mg ha−1) به‌طور قابل‌توجهی بالاتر بود (Das et al., 2020). در طی بررسی اثر کودهای آلی و محرک‌های زیستی درگیاه دارویی زنجبیل بیان شد که کاربرد ۵۰ درصد نیتروژن (کود دامی)+ ۲۵ درصد نیتروژن (کیک چریش) + ۲۵ درصد نیتروژن (ورمی‌کمپوست) + آزوسپیریلوم (۵ کیلوگرم در هکتار) + پانچاکاویا (۳ درصد) بیشترین میزان

اسانس با میانگین ۲/۲۵ درصد را سبب شد (Chitra and Vinothini, 2021). کاربرد کودهای زیستی توأم با سلنیوم باعث تولید بیشترین عملکرد (وزن‌تر و خشک گل) گیاه زعفران شد، هم‌چنین بیان شد که کودهای زیستی در غلظت‌های کم‌تر فسفر باعث افزایش ماده مؤثره کروسین گردید (Nasrin et al., 2022).

۱.۱. اهداف پژوهش

۱- نقش عناصر غذایی (مصرف انواع کودهای آلی، شیمیایی و زیستی بر پایه جلبکی) بر صفات کمی و کیفی زنجبیل. ۲- انتخاب بهترین نوع بستر کشت که بر روی میزان مواد مؤثره زنجبیل بهترین تأثیر را دارد. ۳- تولید در داخل کشور با هدف جلوگیری از خروج ارز و کمک به اقتصاد کشور

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. منطقه مورد مطالعه

این آزمایش در سال ۱۴۰۰ هجری شمسی، به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در شرایط گلدانی و در داخل گلخانه، در محل دانشکدگان ابوریحان دانشگاه تهران، اجرا شد. دانشکدگان ابوریحان دانشگاه تهران با موقعیت جغرافیایی ۳۵ درجه و ۲۸ دقیقه و ۵۳ ثانیه عرض شمالی و ۵۱ درجه و ۴۱ دقیقه و ۹ ثانیه طول شرقی در شهر پاکدشت و در جنوب‌شرقی استان تهران واقع شده است.

۲.۲. روش تحقیق

تیمارهای آزمایش شامل بسترکاشت در چهار سطح (۷۰ درصد ورمی‌کمپوست +۳۰ درصد خاک، ۷۰ درصد ورمی-کمپوست +۳۰ درصد پرلیت، ۷۰ درصد کود دامی +۳۰ درصد خاک، ۷۰ درصد کود دامی+۳۰ درصد پرلیت) و مصرف کودها در سه سطح (بدون مصرف کود، مصرف NPK به مقدار ۱۰۰- ۱۰۰- ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار و مصرف کود زیستی بر پایه جلبکی (بر اساس ترکیبات ذکر شده در جدول ۱) به مقدار دو در هزار به همراه ۵۰۰ گرم در مترمربع هیومیک‌اسید به‌صورت گرانوله و هیومیک‌اسید پودری ۵ گرم در مترمربع) بودند.

برای انجام این آزمایش گلدان‌هایی با ابعاد ۳۵ سانتی‌متر و با قطر دهانه ۲۵ سانتی‌متر آماده شد سپس ریزوم‌های زنجبیل جوانه‌دار تایلندی به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده شده و به قطعات حداکثر ۶۵ گرمی تقسیم شدند که هر قطعه حداقل دو جوانه داشت و به مدت ۲۴ ساعت نیز در هوای معمولی و به دور از نور قرارگرفتند. سپس ریزوم‌ها جهت حفاظت در برابر انواع بیماری‌های قارچی و آماده‌سازی جهت کشت، در محلول حاوی قارچ‌کش کاربندازیم به مدت یک ساعت (محلولی به میزان ۱۰ گرم قارچ‌کش در ۵ لیتر آب) قرارگرفته و نهایتاً به مدت ۲۴ ساعت در هوای آزاد گذاشته شدند.

ترکیبات بسترکشت موردنظر برای دوازده گلدان به همراه هیومیک‌اسید گرانوله برای هر گلدان جهت افزایش ریشه‌زایی، کاهش اسیدیته خاک، اصلاح خاک و مقاوم‌کردن گیاه در برابر تنش‌هایی از قبیل شوری، سرمازدگی و آفات مخلوط شده و در داخل گلدان‌ها قرار گرفت، مابقی گلدان‌ها نیز با ترکیبات مورد نظر و سطوح کودی ذکر شده آماده شدند سپس ریزوم‌ها در عمق حدود ۵ سانتی‌متر در گلدان‌ها کاشته شده و بلافاصله پس از کشت آبیاری به‌صورت دستی و به طور مساوی برای تمامی گلدان‌ها انجام شد. کشت ریزوم‌ها در تاریخ ۲۷ اردیبهشت ماه صورت‌گرفت. قابل ذکر است که کودهای شیمیایی NPK مورد استفاده (۱۰۰-۱۰۰-۱۵۰) در طرح شامل کود سولفات آمونیوم ۲۰ درصد به میزان ۸/۳ گرم برای هر گلدان، سوپر فسفات تریپل ۴۶ درصد به میزان ۲/۵ گرم برای هر گلدان و کود سولفات پتاسیم ۴۲ درصد به میزان ۲/۶ گرم برای هر گلدان

استفاده شد. کل مقادیر توصیه‌شده کودهای فسفاته و پتاسه به همراه یک سوم کود ازته و تمام هیومیک‌اسید گرانوله در هنگام کاشت با خاک گلدان مخلوط شد. مـابقی کود ازت به‌صورت سرک در طی دو مرحله پنج تا هفت برگه شدن گیاه به گلدان‌ها اضافه شد.

کود زیستی بر پایه جلبکی به مقدار ۳-۵ سی سی در یک لیتر آب، به همراه ۰/۵ گرم هیومیک‌اسید پودری طی دو مرحله، در مرحله پنج‌برگی و سپس به فاصله ۱۵ روز بعد از مرحله اول به‌صورت محلول‌پاشی مصرف‌گردید. پس از استقرار کامل بوته‌ها و ورود به مرحله پنج و سپس هفت برگه شدن بوته‌ها اقدام به تخصیص کود شیمیایی ازته به‌صورت سرک طی این دو مرحله همراه با آب آبیاری در اختیار گلدان‌ها قرار گرفت. آبیاری هر پنج تا هفت روز یک‌بار به‌صورت دستی و به‌صورت مساوی انجام‌شد. گلدان‌ها در گلخانه با نور کنترل‌شده و دمای حدود ۲۲- ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند. رطوبت نسبی فضای گلخانه توسط کولر تنظیم شد. خاک‌دهی در سه بازه زمانی در تاریخ ۱۴۰۰/۰۴/۱۴، تاریخ ۰۵/۲۶/ ۱۴۰۰ و در تاریخ ۱۴۰۰/۰۷/۱۲ انجام‌شد.

جدول ۱. تجزیه عناصر موجود در کود زیستی بر پایه جلبکی

نام عنصر	درصد وزنی	درصد حجمی
نیتروژن کل (Total nitrogen)	٪ ۱۳.۲	٪ ۲۰
نیتروژن نیتراتی (Nitrate nitrogen)	٪ ۷.۵۰	٪ ۱۱.۴۰
نیتروژن آمونیاکی (Ammonia nitrogen)	٪ ۵.۷۰	٪ ۸.۶
فسفر قابل استفاده (P_2o_5)	٪ ۱۳.۲۰	٪ ۲۰
پتاسیم محلول در آب (K_2o)	٪ ۱۳.۲۰	٪ ۲۰
منیزیم محلول (Mgo)	٪ ۱	٪ ۱.۵
آهن کلات با EDTA (Fe)	٪ ۰.۱	٪ ۰.۱۴۶
روی کلات با EDTA (Zn)	٪ ۰.۰۵	٪ ۰.۰۷۳
مس کلات با EDTA (Cu)	٪ ۰.۰۵	٪ ۰.۰۷۳
منگنز کلات با EDTA (Mn)	٪ ۰.۰۵	٪ ۰.۰۷۳
بور محلول (B)	٪ ۰.۰۱۹	٪ ۰.۰۲۹
مولیبدن محلول (Mo)	٪ ۰.۰۰۰۸	٪ ۰.۰۰۱۲
جلبک دریایی (کلپک) (Seaweed)	٪ ۱۸.۴۰	٪ ۲۸

شیوه‌ی ارزیابی صفات عملکرد در بوته

پس از برداشت ریزوم‌ها، میزان ریزوم تولید شده توسط هر بوته با کمک ترازوی دیجیتال و با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد.

شاخص برداشت

شاخص برداشت از طریق تقسیم میزان عملکرد اقتصادی بر میزان عملکرد بیولوژیک بر حسب درصد محاسبه شد.

عملکرد بیولوژیک

برای محاسبه میزان عملکرد بیولوژیک زنجبیل، بوته‌های کامل برداشت‌شده و سپس وزن‌تر ریشه، ساقه، برگ و ریزوم‌ها و در نهایت وزن‌تر کل در هر بوته با ترازوی دیجیتال، با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شدند.

استخراج اسانس و شناسایی ترکیبات موجود در اسانس

برای استخراج اسانس در این تحقیق، از روش تقطیر با آب و دستگاه Clevenger استفاده شد. برای این منظور مقدار ۳۰ گرم از ریزوم خشک‌شده از هر تیمار که به‌صورت پودر درآمده بود وزن و داخل بالن‌های ۱۰۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد. در مرحله بعد به میزان ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به محتویات بالن‌ها اضافه شد. پس از به جوش آمدن آب داخل بالن‌ها، عمل اسانس‌گیری به مدت ۳ ساعت انجام‌شد. مایع روغنی به دست آمده از جوشاندن محلول توسط مواد جاذب رطوبت (سولفات سدیم) خشک شد و از دستگاه کروماتوگرافی گازی GC برای جداسازی و تعیین درصد هر یک از اجزای اسانس استفاده شد. اسانس‌ها توسط دستگاه کوپل شده کروماتوگرافی گازی با طیف‌سنج جرمی (GC-MS) مورد شناسایی کیفی قرارگرفتند. شناسایی ترکیبات با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان و شاخص بازداری، مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه این طیف‌ها با ترکیب‌های استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه رایانه دستگاه GC-MS انجام (Shibamoto, 1987) و درصد نسبی هرکدام از ترکیبات تشکیل دهندهٔ اسانس با توجه به سطح زیر منحنی آن در کروماتوگرام GC به دست آمد.

آنالیز کیفی اسانس

برای آنالیز کیفی اسانس، از دستگاه Agilent Technologies مدل 5975C مجهز به ستون DB-5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. دمای آون از ۶۰ درجه سانتی‌گراد تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت و به مدت ۱۰ دقیقه در این دما نگه‌داشته شد. از گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و از انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد.

بررسی میزان ترکیبات موجود در اسانس

آنالیز کمی اسانس به‌کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی Agilent Technologies مدل 7890A مجهز به ستون DB-5به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۳۲ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرومتر انجام‌شد. دمای محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و آشکارساز ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز ازت با سرعت ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به‌عنوان گاز حامل استفاده شد. برنامه‌ریزی حرارتی آون به‌طور صعودی از ۶۰ درجه سانتی‌گراد تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت پنج درجه سانتی‌گراد بر دقیقه صورت‌گرفت و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد (امیری و همکاران، ۱۳۹۵).

تجزیه آماری

پس از جمع‌آوری و یادداشت‌برداری داده‌ها، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS Ver. 9.0 و رسم شکل‌ها توسط نرم افزار Excel 2016 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد صورت پذیرفت.

۳. نتایج

۱.۳. عملکرد بیولوژیکی

نتایج تجزیه واریانس هفت صفت عملکرد بیولوژیکی، عملکرد در هکتار، شاخص برداشت و مواد مؤثره در (جدول ۲) نشان داد که اثرات اصلی بسترکاشت و مصرف کود و اثر متقابل بستر کشت×مصرف کود در سطح احتمال آماری یک و پنج درصد معنی‌دار بودند.

جدول ۲. تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات عملکرد بیولوژیکی، عملکرد در هکتار، شاخص برداشت و برخی مواد مؤثره تحت تأثیر کودهای زیستی و غیرزیستی در بسترهای مختلف کشت

منبع تغییرات	درجه آزادی	عملکرد بیولوژیکی (g/m^{-2})	عملکرد در هکتار (ton/ha^{-1})	شاخص برداشت	میزان اسانس (درصد)	Geranial (%)	α-Zingiberene (%)	(%) Neral
بلوک	۲	^{ns}۷۳.۴۵	^{ns}۰.۵۸	^{ns}۰.۰۰۱۱	^{ns}۰.۰۰۰۰۳	^{ns}۱.۴۰	^{ns}۰.۵۲	^{ns}۰.۲۷
بستر کاشت	۳	**۴۷۰۲۰.۶۶	**۱۲۱.۹۹	**۰.۰۷۱	**۰.۰۰۰۴	*۲۱.۰۸	**۳۷.۸۵	**۲۱.۴۶
کود	۲	**۱۶۳۲۰.۵۸	**۱۸.۱۵	**۰.۱۵۸	**۰.۰۰۲۰	^{ns}۵.۷۱	**۳۲.۴۷	*۱۶.۶۴
کود×بسترکاشت	۶	**۱۲۸۲۴.۱۳	**۳۲.۷۹	**۰.۰۳۶	**۰.۰۰۷۷	**۳۶.۱۰	**۱۳.۳۰	^{ns}۲.۴۹
خطا	۲۲	۲۰۷.۶۷	۱.۳۷	۰.۰۰۱۷	۰.۰۰۰۰۷	۴.۵۹	۰.۷۰	۳.۶۴
CV (%)	–	۱۱.۵۰	۱۴.۸۹	۵.۵۶	۵.۴۰	۱۱.۱۷	۶.۵۳	۲۰.۹۴

ns، *و ** به ترتیب بیان‌گر غیر معنی‌داری و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

مقایسه میانگین اثر متقابل بسترکاشت×مصرف کود نشان داد که بیشترین و کم‌ترین عملکرد بیولوژیکی به ترتیب با میانگین‌های ۳۷۵/۰۷ و ۴۲ گرم در مترمربع در اثرات متقابل بسترکاشت ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت+عدم مصرف کود و بسترکاشت کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد خاک+مصرف کودهای شیمیایی NPK مشاهده گردید. علاوه بر این، تنها استثنا در بسترکاشت کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت است که با مصرف کودهای شیمیایی NPK و زیستی نسبت به عدم مصرف کود باعث افزایش عملکرد بیولوژیکی شد (جدول ۳).

جدول ۳. مقایسه میانگین صفات عملکرد بیولوژیکی، عملکرد در هکتار، شاخص برداشت و برخی مواد مؤثره تحت تأثیر کودهای زیستی و غیرزیستی در بسترهای مختلف کشت

تیمار	عملکرد بیولوژیک (g/m^{-2})	عملکرد در هکتار (ton/ha^{-1})	شاخص برداشت	میزان اسانس (درصد)	Geranial (%)	α-Zingiberene (%)
C1f1	cd۱۱۸.۵۳	ef۵.۷۶	c۰.۵۳	ef۰.۱۵	e۱۶.۸۶	bc۱۴.۲۱
C1f2	cde۱۱۰.۶۷	cd۸.۱۶	b۰.۸	cd۰.۱۷	de۱۸.۰۸	a۱۶.۰۳
C1f3	ef۸۷.۵۳	e۶.۱	b۰.۸	de۰.۱۶	abcd۲۰.۶	cd۱۲.۹۱
C2f1	a۳۷۵.۰۷	a۱۹.۶۶	c۰.۶	b۰.۲۲	ef۱۶.۰۴	bc۱۴.۰۲
C2f2	b۱۹۴.۰۷	b۱۰.۳۶	c۰.۵۶	cd۰.۱۷	bcde۱۹.۱۷	a۱۶.۶۷

C2f3	c۱۲۵.۶۷	bc۱۰	a۰.۹	g۰.۱۲	a۲۲.۸۹	de۱۱.۷۹
C3f1	def۹۴.۵	dev۷.۶	a۰.۹	de۰.۱۶	abc۲۱.۷۳	de۱۲.۲۶
C3f2	g۴۲	g۳.۲	ab۰.۸۳	g۰.۱۲	bcde۱۹.۱۵	ef۱۱.۰۹
C3f3	fv۷۷.۶۳	de۶.۴	a۰.۹	c۰.۱۸	ab۲۲.۷۵	g۶.۴۳
C4f1	fv۳.۸۳	fg۴.۱	c۰.۶	g۰.۱۱	cde۱۹.۰۱	f۹.۹
C4f2	c۱۲۲.۲۷	de۶.۷۳	c۰.۶	a۰.۲۴	abcd۲۱.۱۵	bc۱۴.۴
C4f3	f۸۱.۳۳	de۶.۲۶	a۰.۹	f۰.۱۴	f۱۲.۷۳	bc۱۳.۹۸

بستر کاشت (C_1، C_2، C_3 و C_4 به ترتیب ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد خاک، ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت، کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد خاک و کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت) و مصرف کود (F_1، F_2 و F_3 به ترتیب (عدم مصرف کود، کودهای شیمیایی NPK با مقدار ۱۰۰-۱۰۰-۱۵۰ و کود زیستی بر پایه جلبکی به مقدار دو در هزار به همراه ۵۰۰ گرم در مترمربع هیومیک اسیدگرانوله و ۵ گرم در مترمربع هیومیک اسید پودری)
حروف غیرمشترک در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

۲.۳. عملکرد در هکتار

مقایسه میانگین صفت عملکرد نشان داد که اثر متقابل بسترکاشت ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت+عدم مصرف کود با میانگین ۱۹/۶۶ تن در هکتار بیشترین میزان عملکرد در هکتار را داشت. این در حالی بود که اثر متقابل بسترکاشت کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد خاک+مصرف کودهای شیمیایی NPK با میانگین ۳/۲ تن در هکتار کم‌ترین عملکرد در هکتار را دارا بود. به علاوه، بسترهای کاشت ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد خاک و کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت با مصرف کودهای شیمیایی و زیستی نسبت به عدم مصرف کود باعث افزایش عملکرد در هکتار گردیدند (جدول ۳).

۳.۳. شاخص برداشت

بررسی نتایج اثر متقابل بسترکاشت و مصرف کود نشان داد که بیشترین شاخص برداشت با میانگین ۰/۹ در اثرات متقابل بسترهای کاشت کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد خاک +کود زیستی، ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت+کود زیستی و کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت+کود زیستی بود. در مقابل کم‌ترین شاخص برداشت با میانگین ۰/۵۳ در اثر متقابل بسترکاشت ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت+مصرف کودهای شیمیایی NPK مشاهده شد. این ترکیب تیماری با بسیاری دیگر از ترکیبات تیماری اختلاف آماری معنی‌داری نداشت. همان‌طور که در صفت عملکرد اقتصادی و بیولوژیکی ملاحظه گردید که کدام اثرات متقابل بیشترین و کم‌ترین میزان را دارا بودند که در نهایت با نتایج صفت شاخص برداشت روال منطقی و درستی دارا می‌باشد (جدول ۳).

۴.۳. میزان اسانس

نتایج بررسی مقایسه میانگین اثر متقابل بسترکاشت و مصرف کود در صفت میزان اسانس نشان داد که اثر متقابل بسترکاشت کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت+مصرف کودهای شیمیایی NPK با میانگین ۰/۲۴ درصد بیشترین میزان اسانس را دارا بود، این در حالی بود که اثر متقابل کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت+عدم مصرف کود با میانگین ۰/۱۱ درصد کم‌ترین میزان اسانس را سبب شدند (جدول ۳).

۵.۳. میزان ماده مؤثره Geranial

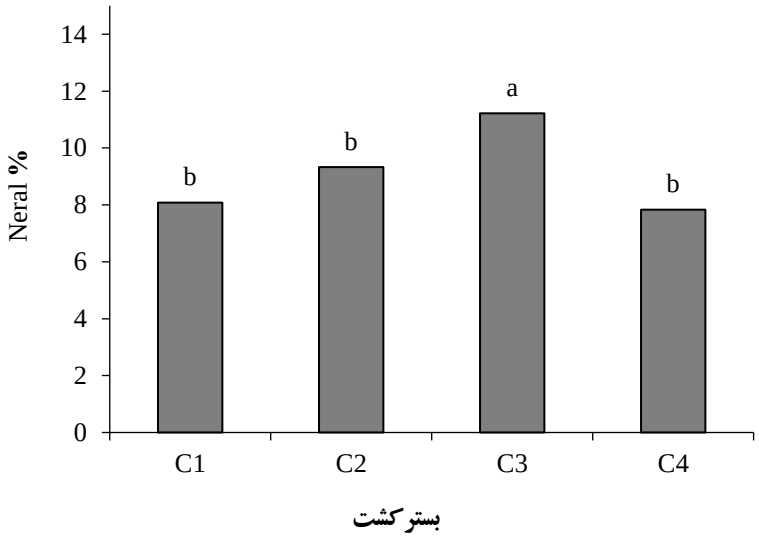
بررسی نتایج اثر متقابل بسترکاشت و مصرف کود در صفت میزان ماده مؤثره Geranial نشان داد که اثر متقابل بسترکاشت ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت+کود زیستی با میانگین ۲۲/۸۹ درصد بیشترین میزان ماده مؤثره Geranial را دارا بود، درحالی که اثر متقابل بسترکاشت کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت+کود زیستی با میانگین ۱۲/۷۳ درصد کم‌ترین میزان ماده مؤثره Geranial را داشت (جدول ۳).

۶.۳. میزان ماده مؤثره α-Zingiberene

مقایسه میانگین صفت میزان ماده مؤثره α-Zingiberene نشان داد که بیشترین میزان ماده مؤثره α-Zingiberene در اثر متقابل بسترکاشت ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت+ مصرف کودهای شیمیایی NPK با میانگین ۱۶/۶۷ درصد مشاهده شد، این در حالی بود که این اثر متقابل با اثر متقابل بستر کاشت ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد خاک+ مصرف کودهای شیمیایی NPK با میانگین ۱۶/۰۳ درصد اختلاف آماری معنی‌داری نداشت. در مقابل اثر متقابل بستر کاشت کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد خاک+کود زیستی با میانگین ۶/۴۳ درصد کم‌ترین درصد ماده مؤثره α-Zingiberene را دارا بود (جدول ۳).

۷.۳. میزان ماده مؤثره Neral

بررسی صفت میزان ماده مؤثره Neral نشان داد که بین بسترهای مختلف کاشت (به‌استثنای کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد خاک) اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. بیشترین و کم‌ترین میزان ماده مؤثره Neral به ترتیب با میانگین‌های ۱۱/۲۱ و ۷/۸۳ درصد در اثرات اصلی بستر کاشت کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد خاک و بستر کاشت کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت مشاهده شد.

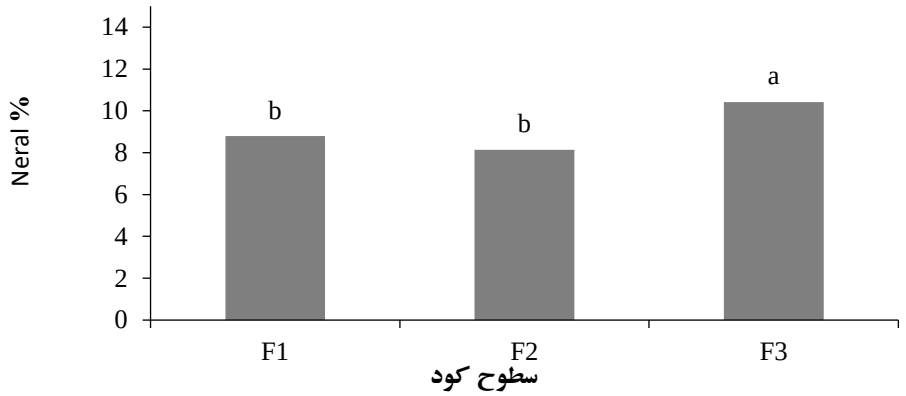


شکل ۱. مقایسه میانگین میزان ماده مؤثره Neral تحت تأثیر اثر اصلی بستر کاشت

بستر کاشت (c1، c2، c3 و c4 به ترتیب ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد خاک، ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت، کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد خاک و کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت)

حروف غیرمشابه بیان‌گر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال LSDα=5% می‌باشد.

نتایج مقایسه میانگین اثر اصلی مصرف کود در صفت ماده مؤثره Neral نشان داد که مصرف کود زیستی با میانگین ۱۰/۴۲ درصد بیشترین میزان این ماده مؤثره را به خود اختصاص داد، در حالی‌که مصرف کود شیمیایی NPK و عدم مصرف کود باعث کاهش میزان ماده مؤثره Neral شد. کم‌ترین ماده مؤثره Neral با میانگین ۸/۱۳ درصد در اثر اصلی مصرف کود شیمیایی NPK حاصل شد (شکل ۲).



شکل ۲. مقایسه میانگین میزان ماده مؤثره Neral تحت تأثیر اثر اصلی مصرف کود

(F_1، F_2 و F_3 به ترتیب (عدم مصرف کود، کودهای شیمیایی NPK با مقدار ۱۰۰-۱۰۰-۱۵۰ و کود زیستی بر پایه جلبکی به مقدار دو در هزار به همراه ۵۰۰ گرم در مترمربع هیومیک اسید به‌صورت گرانوله و هیومیک اسید پودری ۵ گرم در مترمربع).

حروف غیرمشابه بیان‌گر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال $LSD\alpha=5\%$ می‌باشد.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

٤.١. بحث

بستر کاشت ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت باعث بهبود شرایط فیزیکی خاک گشته که باعث فراهمی شرایط رشد و نموی برای گیاه زنجبیل شده است که در نهایت باعث افزایش عملکرد بیولوژیکی و عملکرد در هکتار زنجبیل شده است (جدول ۳). ورمی‌کمپوست غنی از مواد آلی هستند که وقتی به خاک اضافه می‌شوند، تخلخل، هوادهی و ظرفیت نگه‌داری آب را افزایش داده و سبب کاهش چگالی ذرات خاک و بهبود کلی در خواص فیزیکی خاک‌گشته که در نهایت به‌طور قابل‌توجهی به رشد و عملکرد بهتر گیاه منجر می‌شود. هم‌چنین ورمی‌کمپوست‌ها حاوی جمعیت میکروبی بزرگ و متنوعی هستند که تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه، آنزیم‌ها و هورمون‌های مفید (سیتوکینین‌ها و اکسین‌ها) برای رشد گیاه را تولید می‌کنند (Hussain and Abbasi, 2018).

بهبود وضعیت کلی در ویژگی‌های خاک از طریق دسترسی به مواد مغذی و آب باعث افزایش رشد و عملکرد ریزوم در گیاه زنجبیل شده است که احتمالاً عملکرد ریزوم زنجبیل به دلیل افزایش سنتز کربوهیدرات‌ها و انتقال فتوسنتات‌ها به مخزن‌ها به دلیل بهبود خواص خاک و در دسترس بودن مواد مغذی بوده است (Singh, 2015). کاربرد ورمی‌کمپوست در گیاه رازیانه باعث افزایش عملکرد بیولوژیکی (۴۹۹۹ تن در هکتار) نسبت به عدم مصرف ورمی‌کمپوست (۱۹۸۰ تن در هکتار) شد که علت آن را چنین بیان کردند که کاربرد ورمی‌کمپوست باعث افزایش سرعت رشد گیاه به علت افزایش جذب آب و مواد مغذی مانند نیتروژن و فسفر می‌شود (Valiki et al., 2015).

زنجبیل برای حفظ رشد و حداکثر عملکرد خود به مواد مغذی مناسبی نیاز دارد، استفاده از کودهای آلی یکی از فناوری‌هایی است که به دلیل توانایی آن در بازیابی حاصل‌خیزی خاک، تأمین مواد مغذی اصلی گیاه مانند نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم و هم‌چنین تثبیت‌کننده ph خاک، در طول زمان و در طول سال‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Egbuchua and Enujeke, 2013).

کاربرد تیمار Integrated sources of nutrient supply (50% N through FYM (Farm yard manure) + 50% N from VC) نسبت به ورمی‌کمپوست و شاهد باعث افزایش ۳۳/۱ و ۵۸ درصدی عملکرد ریزوم زنجبیل شد (Das et al., 2020). پرلیت + پیت ماس (۱:۱، حجم/حجم) به دلیل محیط مناسب از جمله EC، ph و تخلخل مطلوب، بیشترین عملکرد تولید مینی غده سیب‌زمینی را در محیط گلخانه حاصل‌کرد (Hajiaghaei Kamrani et al., 2019).

بسترهای‌کاشت کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد خاک +کود زیستی، ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت+کود زیستی و کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت+کود زیستی باعث بیشترین میزان شاخص برداشت زنجبیل شد (جدول ۳). کاربرد ترکیب تیماری 75% RDN (100% recommended dose of nitrogen) + 25% N through (vermicompost on equivalent. basis + pine mulch باعث بیشترین شاخص برداشت با میانگین ۷۱/۴ در گیاه زنجبیل شد (Kakar et al., 2020). مصرف ۲/۵ کیلوگرم در هکتار کودهای زیستی نسبت به ۳/۷۵ و ۵ کیلوگرم در هکتار باعث بیشترین میزان شاخص برداشت با میانگین ۵۴/۳ در گیاه زنجبیل شد (Jyotsna et al., 2013).

به نظر می‌رسد که در صفت میزان اسانس نقش مصرف کود نسبت به بسترکاشت تأثیرگذاری بیشتری داشته است، به‌نحوی‌که بیشترین و کم‌ترین در یک نوع بسترکاشت اما با سطوح مصرف کودی متفاوت حاصل گشته است. در تمام بسترهای‌کاشت (به‌استثنای ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت) همواره مصرف کود نسبت به عدم کود باعث افزایش میزان اسانس گردیده است (جدول ۳). کیفیت محصولات توسط تعامل پیچیده محیط، ژنوتیپ، نوع خاک و نسبت مواد معدنی در کودهای آلی اضافه شده کنترل می‌گردد (Das et al., 2017). در طی بررسی کشاورزی تلفیقی با کودهای آلی و معدنی بر عملکرد و کیفیت زنجبیل مشخص‌شد که بیشترین میزان اسانس در ترکیب تیماری آزوسپیرولوم + فسفر+ خاکستر چوب مشاهده شد (Rana and Korla, 2010). افزایش عملکرد اسانس آویشن تحت تیمارهای کود ترکیبی (آلی و معدنی) احتمالاً به دلیل افزایش در دسترس بودن عناصر اساسی مانند نیتروژن یا ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC) خاک است که ممکن است تجمع عناصر غذایی را در گیاه افزایش دهد که منجر به تولید زیست‌توده و متابولیت‌های ثانویه بیشتر می‌شود (Anwar et al., 2005).

بسترکاشت ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت+کود زیستی منجر به تولید بالاترین میزان ماده مؤثره Geranial شد. به نظر می‌رسد که در صفت ماده مؤثره Geranial تأثیرگذاری نوع بسترکاشت بیشتر از مصرف کود بود، به شکلی که بیشترین و کم‌ترین درصد ماده مؤثره Geranial هر دو در کود زیستی حاصل شده است. هم‌چنین مشاهده شد که در بسترهای کاشت ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد خاک و ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت توأم با مصرف کودهای شیمیایی NPK و زیستی باعث افزایش درصد ماده مؤثره Geranial نسبت به عدم مصرف کود گردید. هم‌چنین مشخص‌شد که مصرف هر دو نوع کود شیمیایی NPK و زیستی نسبت به عدم مصرف کود در بسترکاشت کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت باعث افزایش درصد α-Zingiberene شد (جدول ۳). کودهای آلی از طریق مدیریت کوددهی (ریزمغذی‌ها) تأثیر مثبتی بر متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارند (Fallah et al., 2013). در طی بررسی بسترهای کشت آلی بر رشد، عملکرد و محتوی ۶-

جینجرول در سیستم‌های کشت بدون خاک مشاهده شد که بیشترین درصد ۶-جینجرول پس از ۹ ماه از رشد در محیط کشت ۱۰۰٪ در خاکستر الیاف نارگیل (Coir dust) به دست آمد (Suhaimi et al., 2018).

بستر کاشت ورمی‌کمپوست ۷۰ درصد+۳۰ درصد پرلیت+ مصرف کودهای شیمیایی NPK باعث تولید بیشترین میزان ماده مؤثره α-Zingiberene در زنجبیل شد (جدول ۳). نیتروژن باعث افزایش سنتز اسانس می‌شود که به شکل مستقیم یا غیرمستقیم در متابولیسم گیاهی دخالت دارد که در نهایت در افزایش تولید متابولیت‌های گیاهی ایفای نقش می‌کند (Said-Al Ahl et al., 2009). در طی بررسی مدیریت مواد مغذی (کودهای بیولوژیکی، شیمیایی و آلی+بیولوژیکی) در گیاه زنجبیل نشان داد که بیشترین میزان Zingiberene با میانگین ۲۰/۴۱ درصد در ترکیب تیماری کود آلی+بیولوژیکی مشاهده شد (Srinivasan et al., 2019).

اثرات اصلی بستر کاشت کود دامی ۷۰ درصد+۳۰ درصد خاک و اثر اصلی مصرف کود زیستی باعث تولید بیشترین تولید میزان ماده مؤثره Neral در زنجبیل شدند (شکل ۱ و ۲). کودهای زیستی سازگارتر با محیط زیست هستند و در بسیاری از موارد در مقایسه با کودهای معدنی بازدهی یکسان یا حتی بهتر را دارا می‌باشند. به‌علاوه، کودهای زیستی عمدتاً شامل میکروارگانیسم‌های تثبیت‌کننده نیتروژن، حل‌کننده فسفات و محرک رشد گیاه هستند که تغذیه متعادل‌تری را برای گیاهان فراهم می‌کنند (Rashnoo et al., 2020). مطالعات متعدد روی گیاهان معطر و دارویی نشان داده است که استفاده از کودهای آلی باعث افزایش زیست توده و بهبود محتوای اسانس و ترکیبات شیمیایی این گیاهان می‌شود (Rostaei et al., 2018). در طی بررسی کودهای آلی (گوسفندی، گاوی، مرغی و شیمیایی) در گیاه بادرنجبویه (*Dracocephalum kotschyi*) بیشترین درصد Neral با میانگین ۲۸/۲ درصد در کود دامی گوسفندی مشاهده شد (Fallah et al., 2020). در گیاه مرزنگوش شیرین (*Marjorana hortensis*) مصرف ۵-۳ کیلوگرم در مترمربع کودهای زیستی منجر به تولید بیشترین مقادیر اسانس و ترکیبات اسانس گردید (Gharib et al., 2008). کاربرد اسید هیومیک در گیاه (*Foeniculum vulgare var*) بر میزان ترکیبات استراگول و آنتول اسانس در این گیاه اثر مثبت داشت (Omer and El Gendy, 2015).

۲.٤. نتیجه‌گیری

برنامه‌های کود برای سیستم‌های کشت بدون خاک یا درصد پایین خاک باید شامل تمام مواد مغذی موردنیاز گیاهان باشد. کربن، هیدروژن و اکسیژن از آب و دی‌اکسیدکربن موجود در هوا تأمین می‌شود درحالی‌که نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، گوگرد و ریزمغذی‌ها باید توسط پرورش‌دهندگان تأمین شود، در همین راستا استفاده از بسترهای کاشتی که شامل کودهای آلی است، می‌تواند مؤثر و راه‌گشا باشد. نتایج این تحقیق نیز تأییدکننده این موضوع است که کاربرد بسترهای-کاشت مانند ورمی‌کمپوست و پرلیت در کشاورزی پایدار هم‌زمان با افزایش جمعیت و فعالیت میکروارگانیزم‌های مفید خاک، مواد غذایی موردنیاز گیاه را تأمین‌کرده و در نهایت باعث افزایش صفات موردبررسی در این آزمایش شد، به‌نحوی‌که نیازی به کوددهی (شیمیایی و زیستی) نداشت. از طرف دیگر، کاربرد منابع کودی (شیمیایی و زیستی) توأم با بسترهای کاشت آلی با افزایش حاصل‌خیزی بیشتر جهت تأمین رفع نیازهای غذایی جهت تولید مواد مؤثره، مثمر ثمر بود.

منابع

Anwar, M., Patra, D.D., Chand, S., Alpesh, K., Naqvi, A.A., Khanuja, S.P.S. 2005. Effect of organic manures and inorganic fertilizer on growth, herb and oil yield, nutrient accumulation, and oil

Communications in Soil Science and Plant Analysis. 36(13-14): 1737- quality of French basil. 1746.
Chitra, R., Vinothini, L. 2021. Effect of organic manures and bio-stimulant on physiological and characters of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). International Journal of Innovative biochemical Horticulture. 10(2): 191-195.
Daharia, A., Jaiswal, V.K., Royal, K.P., Sharma, H., Joginath, A.K., Kumar, R., Saha, P. 2022. A review on ginger and garlic with their pharmacological Action. Asian Journal of comparative Pharmaceutical Research and Development. 10(3): 65-69.
Das, A., Layek, J., Babu, S., Kumar, M., Yadav, G.S., Patel, D.P., Buragohain, J. 2020. Influence of configuration and organic sources of nutrient supply on productivity and quality of ginger land Rosc.). grown in Eastern Himalayas, India. Environmental (*Zingiber officinale* Sustainability. 3(1): 59-67.
Das, A., Layek, J., Babu, S., Kumar, M., Yadav, G.S., Patel, D.P., Idapuganti, R.G., Lal, R., 2020. Influence of land configuration and organic sources of nutrient supply on Buragohain, J. (*Zingiber officinale* Rosc.). grown in Eastern Himalayas, productivity and quality of ginger India. Environmental Sustainability. 3(1): 59-67.
Das, A., Patel, D.P., Kumar, M., Ramkrushna, G.I., Mukherjee, A., Layek, J., Ngachan, S.V., 2017. Impact of seven years of organic farming on soil and produce quality and Buragohain, J. India. Agriculture, Ecosystems & Environment. 236:142-153. crop yields in eastern Himalayas,
Egbuchua, C.N., Enujeke, E.C. 2013. Growth and yield responses of ginger (*Zingiber officinale*) to of organic manures in a typical rainforest zone, Nigeria. Journal of Horticulture sources three and Forestry. 5(7):109-114.
Fallah, S., Ghalavand, A., Raiesi, F. 2013. Soil chemical properties and growth and nutrient uptake grown with different combinations of broiler litter and chemical fertilizer in a calcareous of maize soil science and plant analysis. 44(21): 3120-3136. soil. Communications in
Fallah, S., Mouguee, S., Rostaei, M., Adavi, Z., Lorigooini, Z., Shahbazi, E. 2020. Productivity and quality of *Dracocephalum kotschyi* under organic and chemical fertilization essential oil Production. 255: 120189. conditions. Journal of Cleaner
Gharib, F.A., Moussa, L.A., Massoud, O.N. 2008. Effect of compost and bio-fertilizers on growth, essential oil of sweet marjoram (*Majorana hortensis*) plant. International Journal of yield and Biology. 10(4): 381-387. Agriculture and
Haile, A.A., Tsegay, B.A., Seid, A., Adnew, W., Moges, A. 2022. A Review on medicinal plants management of respiratory problems in Ethiopia over a twenty-year period (2000– used in the Complementary and Alternative Medicine. *2022*. 2021). Evidence-Based
Hajiaghaei Kamrani, M., Rahimi Chegeni, A., Hosseinniya, H. 2019. Effects of different growing and growth parameters of potato minitubers (*Solanum tuberosum* yield media on plant analysis. 50(15): 1838-1853. L.). Communications in soil science and
Hussain, N., Abbasi, S.A. 2018. Efficacy of the vermicomposts of different organic wastes as "clean" state-of-the-art. Sustainability. 10(4): 1205. fertilizers:
Jyotsna, N., Ghosh, M., Ghosh, D.C., Meitei, W.I., Timsina, J. 2013. Effect of biofertilizer on growth, productivity, quality and economics of rainfed organic ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) Bhaisey cv. North-Eastern Region of India. Journal of Agricultural Science and Technology. 3:83-98.
Kakar, R., Sharma, J.C., Mogta, A., Guleria, A., Thakur, J. 2020. Assessment of various nutrient technologies for quality, fertilizer use efficiency, and economics of ginger management production under subtropical to subtemperate conditions. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 51(22): 2805-2820.
Kumar, R., Shankar Jha, SH., Pratap Singh, SH., Kumar, M., Kumari, N., Padbhushan, R. 2022. application of chemical fertilizer and enriched household vermicompost influences Combined under calcareous soil. The Pharma Innovation Journal. 11(8): 2069- maize yield and soil quality 2075.

dynamics Markoska, V., Spalevic, V. 2020. the adsorption character of perlite, influence on nitrogen in soil. Agriculture & Forestry/Poljoprivreda i Sumarstvo. 66(4).
Nasrin, M. al-Sadat, Ghasemi, S., Shahbazi, M. 2022. The effect of phosphorus, selenium and fertilizer on quantitative and qualitative characteristics of saffron (*Crocus sativus* L.). biological Research (semi-annual). 9(2): 295-279. (in Persian). Journal of Saffron
Omer, E.A., El Gendy, A.G. 2015. Impact of organic compost and humic acid on essential oil sweet fennel (*Foeniculum vulgare* var. Dulce) under sandy soil conditions in composition of Pharmaceutical Sciences. pp.160-166. Egypt. World Journal of
Rana, N., Korla, B.N. 2010. Integrated farming with organic and inorganic fertilizers on yield and ginger (*Zingiber officinales* Rosc.). Agricultural Science Digest. 30(4): 250-253. quality of
Rashnoo, A., Movahedi, Z., Rostami, M., Ghabooli, M. 2020. Piriformospora indica Culture Filtrate Biofertilizer (Nitrokara) Promote Chicory (*Cichorium intybus* L.) Growth and morpho- and physiological traits in an aeroponic system and soil culture. International Journal of Horticultural Science and Technology. 7(4): 353-363.
Rostaei, M., Fallah, S., Lorigooini, Z., Surki, A.A. 2018. Crop productivity and chemical cumin essential oil in sole crop and intercropped with soybean under compositions of black Products. 125: 622-629. contrasting fertilization. Industrial Crops and
Said-Al, A.H., Omer, E.A., Naguib, N.Y. 2009. Effect of water stress and nitrogen fertilizer on herb essential oil of oregano. International Agrophysics. 23(3): 269-275. and
Singh, S.P. 2015. Nutrient supplementation through organic manures for growth and yield of ginger *officinale* Rose.). Journal of Eco-Friendly Agriculture. 10(1): 28-31. (*Zingeber*
Shibamoto, T. 1987. Retention indices in essential oil analysis, in capillary gas chromatography in essential oil analysis. Sandra, P., Bicchi, C., (ed). HuethingVerlag. New York. 74 - 259.
Srinivasan, V., Thankamani, C.K., Dinesh, R., Kandiannan, K., Hamza, S., Leela, N.K., John 2019. Variations in soil properties, rhizome yield and quality as influenced by Zachariah, T. schedules in rainfed ginger. Agricultural Research. 8(2): 218-230. different nutrient management
Suhaimi, M.Y., Adzemi, M.A., Zaliha, W.S.W. 2018. Effect of organic substrates on ginger growth, (6)-gingerol content cultivated using soilless culture system. AGROFOR. 3(1). yield and
Supriya, G.S., Bhoomika, H.R., Ganapathi, M., Nataraj SKand Ravi, C.S. 2020. Effect of different media and nutrients on growth and yield of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) in soilless culture structure. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 9(6): 2004-2007. under protected
Valiki, S.R.H., Ghanbari, S., Golmohammadzadeh, S., Tat, O.F. 2015. The effect of vermicompost fertilizer on yield, growth parameters and essential oil of fennel *(Foeniculum* and NPK *vulgare*). International Journal of Life Sciences. 9(4): 38-43.
Ye, S., Peng, B. Liu, T. 2022. Effects of organic fertilizers on growth characteristics and fruit quality 12(1): 1-11..jujube in the Loess Plateau. Scientific Reports in Pear-

Investigating the effect of different cultivation substrates and biological and inorganic fertilizers on the yield and active ingredients of ginger medicinal plant (*Zingiber officinale* Rosc)

Gholam Ali Akbari, Seyedeh Akram Miri*

Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Technology (Aborihan), University of .Tehran, Iran

Abstract

In order to investigate the effect of different cultivation substrates and organic and inorganic fertilizers on the yield and active ingredients of ginger medicinal plant, an experiment was carried out during the crop year 1400 in the greenhouse of the Faculty of Agricultural Technology of Tehran University. This experiment was factorial in the form of randomized complete block design in three replications. This experiment was factorial in the form of randomized complete block design in three replications. The investigated treatments include culture medium in four levels (70% vermicompost + 30% soil, 70% vermicompost + 30% perlite, 70% animal manure + 30% soil and 70% animal manure + 30% perlite) and fertilizer consumption in three level (no fertilizer use, NPK use and biofertilizer use). The results showed that the highest amount of biological yield and yield per hectare was observed in the mutual effect of substrate-planting-vermicompost 70%+perlite 30% and no fertilizer consumption. The culture medium of 70% animal manure + 30% perlite combined with the use of NPK chemical fertilizer produced the highest amount of essential oil. The highest amount of Geranial was observed in the interaction effect of vermicompost planting bed 70% + perlite 30% combined with the use of biological fertilizer. The highest amount of α-Zingiberene was observed in the interaction effect of vermicompost 70% + 30% perlite + use of NPK chemical fertilizers. The highest amount of Neral was obtained in the main treatments of 70% animal manure + 30% soil and the main treatment of biological fertilizer. It seems despite the very good reaction of the ginger to the use of sufficient amounts of fertilizers in the planting medium, it has provided the nutritional needs of this plant for the best efficiency and reaction in the mentioned traits. Therefore, correct management in the preparation of organic cultivation substrates and reasonable use of adequate amounts of fertilizer can be appropriate and necessary.

Keywords: Essential oil, Ginger, yield, Geranial, α-Zingiberene, Neral

* e-mail: akram.miri@ut.ac.ir

بررسی اثر رویشگاه بر میزان فلاونوییدها در گیاه دارویی برازمبل

مریم فرزانه*، عاطفه امیراحمدی، وحید پوزش

گروه علوم گیاهی ، دانشکده زیست شناسی ، دانشگاه دامغان، دامغان ، ایران

چکیده

برازمبل جنس کوچکی از خانواده Lamiaceae می باشد که در ایران و برخی کشورهای همسایه به صورت خودرو وجود دارد. خواص درمانی این گیاه از دیرباز مورد توجه مردم بوده است. در این بررسی سه جمعیت از گیاه دارویی برازمبل *Perovskia abrotanoides* Kar. از سه رویشگاه طبیعی شامل دامغان (ایستگاه ۱، ۱۵۰۴ متر)، کردمیر (ایستگاه ۲، ۱۶۷۲ متر) و شاهرود (ایستگاه ۳، ۱۲۸۵ متر) در تیر ماه ۱۳۹۷جمع آوری شدند. سپس اطلاعات میزان دما و بارش از سازمان هواشناسی دریافت شد و میزان فلاونوییدها در سرشاخه‌های گلدار گیاه نیز اندازه گیری شدند. آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. براساس نتایج به دست آمده ایستگاه ۱ خشک ترین ایستگاه و ایستگاه ۲ مرطوب ترین ایستگاه می باشد. همچنین بیشترین مقدار فلاونوییدها از رویشگاه کردمیر متعلق به ایستگاه ۲ اندازه گیری شد. نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش ارتفاع از سطح دریا میزان فلاونوییدها در جمعیت‌های گیاه برازمبل افزایش می‌یابند.

واژگان کلیدی: برازمبل، رویشگاه، فلاونوییدها، استان سمنان.

* ایمیل نویسنده مسئول

E-mail: a.amirahmadi@du.ac.ir

۱. مقدمه

گونه *Perovskiaa brotanoides* Karel با نامهای محلی برازمبل، حوش، دوموو و گوره از تیره نعناعیان (Labiatae) می باشد. این گیاه علاوه بر ایران در ترکمنستان، افغانستان، پاکستان، کشمیر، تیان شان و تبت پراکنش دارد. در ایران حضور این گونه از استانهای گرگان، مازندران، اصفهان، سیستان و بلوچستان، خراسان، سمنان و تهران گزارش شده است. گیاه برازمبل بیشتر در اطراف جاده ها یا آبراهه های با آب موقت می روید. در تب سنتی این گیاه مسکن، ضدسرفه، نرم کننده و خلط آور است. در مصرف داخلی آن را به منظور درمان آسم، سرماخوردگی، سرمازدگی، دل بهم خوردگی، دل آشوبه، دردهای شکمی و مسمومیت غذایی، برونشیت و یبوست بکار می برند. ضمنا مصرف این گیاه در بارداری ممنوع است. بیشتر مطالعات انجام شده روی این گیاه مربوط به اسانس و ترکیبات اسانسی آن در رویشگاه ها و مراحل مختلف رویشی است (Sajjadi et al., 2005; Beik Mohammadi et al., 2012) (شهرکی و همکاران ۱۳۹۲). بخشی از مطالعات انجام شده روی برازمبل مربوط به بررسی فعالیت های ضدمیکروبی این گیاه می شود (Ashraf et al., 2014; Mahboubi and Kazempour, 2009; Safaei Ghomi and Batouli 2010; Ghafourian and Mazanadarni, 2017). به دلیل اهمیت نقش رویشگاه بر روی ویژگی های بیوشیمیایی گیاهان در مطالعه حاضر اثر رویشگاه بر روی میزان فلاونوییدها در گیاه برازمبل مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. منطقه مورد مطالعه

نمونه برداری گیاهی از سه منطقه مورد مطالعه در استان سمنان شامل دامغان(۱۵۰۴ متر)، شاهرود(۱۲۸۵ متر) و کردمیر(۱۶۷۲ متر) به روش تصادفی سیستماتیک صورت گرفت. به این ترتیب که در هر منطقه سه ترانسکت به طول ۳۰ متر ایجاد شد. در طول ترانسکت ۱۰ پلات یک متر مربعی ایجاد شد. نمونه های ده پلات با هم مخلوط شدند و به عنوان یک نمونه در نظر گرفته شدند. در نهایت سه نمونه از هر رویشگاه بدست آمد که برای انجام آنالیز به آزمایشگاه منتقل شد.

۲.۲. روش تحقیق

پس از انتقال به آزمایشگاه ابتدا برگهای حشره خورده و یا آفت زده بطور کامل از نمونه ها جدا شدند، سپس سرشاخه های گلدار با آب مقطر شسته شد. از هر نمونه چند برگ به منظور انجام سنجش میزان فلاونوییدها جدا شده و در فریز منهای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد. اندازه گیری میزان فلاونوییدها نیز به روش Kerizek et al. (1989) انجام شد. نتایج حاصل از سنجش فلاونوییدها با نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین ها با آنالیز واریانس یک طرفه و با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار Exel انجام شد.

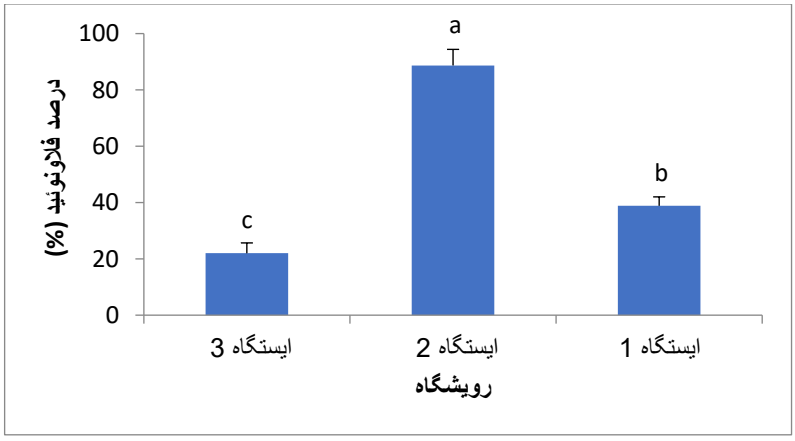
۳.۲. داده‌های ایستگاه هواشناسی

منطقه موردمطالعه شامل اطلاعات سه ایستگاه هواشناسی به نامهای ایستگاه دامغان ، ایستگاه کیاسر و ایستگاه شاهرود می باشد که آمارهای ۱۰ساله (از سال ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۹) مربوط به میانگین دما و بارش آن از سازمان هواشناسی کشور دریافت گردید. سپس نمودار آمبروترمیک برای شناخت ماه های خشک هر ایستگاه تهیه شد.

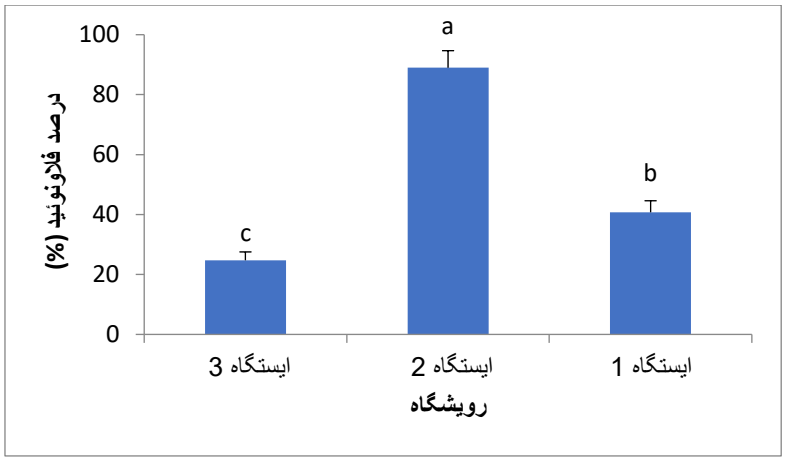
۳. نتایج

نمودارهای آمبروترمیک برای شناخت ماه‌های خشک در ایستگاههای اقلیمی مورد مطالعه تهیه می‌شوند. در نمودار ترسیم‌شده ماه‌هایی که در آن‌ها محورهای بارش و دما یکدیگر را قطع می‌کنند و منحنی دما بالاتر از منحنی بارش قراردارد ماه‌های خشک محسوب می‌شوند. این منحنی بر اساس نظریه کوپن استوار است. در این روش تغییرات ماهانه متوسط درجه حرارت و بارندگی در یک دستگاه محور مختصات قائم ترسیم می‌شود که محور افقی آن ماه‌های سال، محور عمودی سمت چپ درجه حرارت ماهانه و محور عمودی سمت راست به بارندگی ماهانه اختصاص دارد. درجه‌بندی محورهای عمودی به نحوی است که عدد مربوط به تقسیمات بارندگی دو برابر عدد مربوط به درجه حرارت در نظر گرفته می‌شود. با توجه به داده های آمبروترمیک، منطقه دامغان در ماه‌های مارس، آوریل، می، ژوئن، جولای، اوت، سپتامبر، اکتبر، نوامبر و دسامبر خشک می‌باشد. منطقه کیاسر در ماههای می، ژوئن، جولای، اوت و سپتامبر، خشک بوده و منطقه شاهرود در ماههای آوریل، می، ژوئن، جولای، اوت، سپتامبر و اکتبر خشک است (تصاویر منحنی آمبروترمیک نشان داده نشده است).

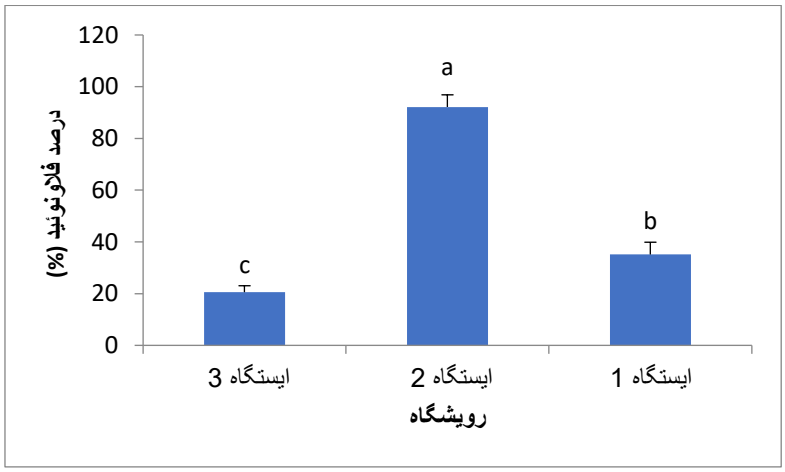
نتایج سنجش میزان فلاونوییدها در آنالیز واریانس یک‌طرفه در طول موج های ۲۷۰ ، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر گیاه برازمبل سه منطقه مورد مطالعه نشان داد که میزان فلاونوئید در هر سه ایستگاه اختلاف معنی داری دارند. بطوریکه بیشترین میزان مربوط به ایستگاه ۲ می باشد. میزان فلاونوییدها در ایستگاه های ۱ و ۳ در رتبه های بعدی هستند (شکل های ۱، ۲ و ۳).



شکل ۱. اثر رویشگاه بر میزان فلاونوئید در طول موج ۲۷۰ نانومتر. حروف مشترک در هر نمودار نشانگر غیرمعنی‌دار بودن و حروف غیرمشترک نشانگر معنی‌دار بودن اختلافات است (مقادیر، میانگین سه تکرار±SE، $P \leq 0.05$).



شکل ۲ . اثر رویشگاه بر میزان فلاونوئید در طول موج ۳۰۰ نانومتر. حروف مشترک در هر نمودار نشانگر غیرمعنی‌دار بودن و حروف غیرمشترک نشانگر معنی‌دار بودن اختلافات است (مقادیر، میانگین سه تکرار±SE، $P \leq 0.05$).



شکل ۳ . اثر رویشگاه بر میزان فلاونوئید در طول موج ۳۰۰ نانومتر. حروف مشترک در هر نمودار نشانگر غیرمعنی‌دار بودن و حروف غیرمشترک نشانگر معنی‌دار بودن اختلافات است (مقادیر، میانگین سه تکرار±SE، $P \leq 0.05$).

٤. بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اطلاعات ایستگاه های هواشناسی و نمودار آمبروترمیک، منطقه دامغان در ماه‌های مارس، آوریل، می، ژوئن، جولای، اوت، سپتامبر، اکتبر، نوامبر و دسامبر همچنین منطقه کیاسر در ماههای می، ژوئن، جولای، اوت و سپتامبر و منطقه شاهرود در ماههای آوریل، می، ژوئن، جولای، اوت، سپتامبر و اکتبر را خشک می باشند. بنابراین ایستگاه ۱ خشک ترین ایستگاه و ایستگاه ۲ مرطوبترین ایستگاه در این بررسی می باشد.

فلاونوئیدها جز متابولیتهای ثانویه و یکی از بزرگترین گروههای ترکیبات فنلی می باشد که به طور وسیعی در تمام سلسله گیاهی حضور دارند. این دسته از ترکیبات با ایجاد متیلاسیون، گلیکوزیلاسیون و آسیلاسیون گروههای متنوع زیادی از جمله چالکون ها، فلاون ها، فلاونول ها، آنتوسیانین ها و غیره را تولید می کنند. فلاونوئیدها هم به عنوان عوامل آنتی اکسیدان و هم به عنوان ترکیبات کلاته کننده فلزات، نقش مهمی در ایجاد تحمل نسبت به تنش فلزات سنگین در گیاهان به عهده دارند (Matsouka et al. 2011). در مراحل اولیه سنتز فلاونوئیدها، ترکیب فنیل آلانین در مسیرشیکمیک اسید (مسیر بیوسنتزی آمینواسیدهای حلقوی مانند فنیل آلانین و تیروزین) سنتز می شود (Wink 2010). فلزات سنگین بر فعالیت آنزیمهایی مانند فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) و چالکون سنتاز (CHS) اثر می گذارد. آنزیم چالکون سینتاز آنزیم کلیدی و اولین آنزیم سنتز فلاونوئیدها می باشند که در واکوئل ها و غشای واکوئلی (تونوپلاست) قرار دارند و باعث ترکیب کوآنزیم A و سه مولکول مالونیل کوآ (تشکیل شده از استیل کوآ) می شوند که برای تشکیل نارین ژنین ضروری است (Dao et al. 2011). فلاونولها به عنوان رنگیزه همراه با آنتوسیانین در گلها و میوه ها، نقش حفاظتی دارد و به عنوان یک سد در برابر ورود UV هستند (Jaakola et al. 2002). در پژوهش ذاکری مهرو همکاران (۱۳۹۲) بررسی میزان فلاونوئید کل در گیاه نارنج نشان داد که در گل های گیاه به ترتیب در رویشگاه‌های آمل و گرگان (۸۱/۸۱- ۹۲/۹۰) پوست میوه نارس (۴۳/۲۴-۹۱/۴۹) و در برگ به ترتیب (۷۸/۴۹-۷۴/۸۷) میلی گرم معادل کوئرستین در هر گرم وزن خشک گیاه متغیر گزارش گردید. نتایج فوق در تائید تنوع، کمیت و کیفیت مواد مؤثره دارویی گیاه، در اندام های مختلف و همچنین تاثیرپذیری آنها در رویشگاه‌های متفاوت قابل بحث است. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که میزان فلاونوییدها در رویشگاه های مختلف گیاه برازمبل متفاوت است. بطوریکه بیشترین میزان فلانوییدها در تمام طول موج ها مربوط به ایستگاه ۲ (کردمیر) می باشد. و ایستگاه ۳ (شاهرود) کمترین میزان فلاونوییدها را دارد. بنابراین می توان اینطور استنباط نمود که در گیاه برازمبل با افزایش ارتفاع از سطح دریا میزان فلاونوییدها افزایش می یابد.

منابع

شهرکی، س.، مهدوی، س. خ.، حسینی، س. ع.، مازندرانی، م.، توان، م. ۱۳۹۲. بررسی کمیت و کیفیت روغن اسانسی گیاه دارویی *Proveskia abrotanoides* . فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی.۳، ۶۸-۸۱

ذاکری مهر، م.، مازندرانی، م.، پیردشتی، ه. ۱۳۹۲. مقایسه میزان فلاونوئید کل برگ، پوست میوه نارس و گل نارنج (*Citrus aurantium* L.) در دو رویشگاه آمل و گرگان، سومین همایش ملی گیاهان دارویی،آمل، ایران.

Ashraf, S.N., Zubair, M., Rizwan, K., Tareen, R.B., Rasool, N., Zia-Ul-Haq, M., Ercisli, S. 2014. Compositional studies and biological activities of *Perovskia abrotanoides* Kar. oils. Biol Res. 47: 1–9.

Beikmohammadi, M. 2012. The evaluation of medicinal properties of *Perovskia abrotanoides* Karel. Middle East J Sci Res. 11: 189–193.

Dao, T.H., Linthorst, H.J., Verpoorte, R. 2011. Chalcone synthase and its functions in plant resistance.Phytochem Rev. 10: 397–412.

Ghafourian, M., Mazandarani, M. 2017. Ethnopharmacology, Ecological Requirements, Antioxidant and Antimicrobial activities of *Perovskia abrotanoides* Karel. Extract for Vaginal Infections From Semnan Province. International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences. 5: 295–300.

Jaakola, L., Maatta, K., Pirttila, A.M., Torronen, R., Karenlampi, S., Hohtola, A. 2002. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in141relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. Plant Physiology. 130(2): 729–739.

Krizek, D.T., Britz, S.J., Mirecki, R.M. 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. Physiologia Plantarum. 103: 1-7.

Mahboubi, M., Kazempour, N. 2009. The antimicrobial activity of essential oil from *Perovskia abrotanoides* karel and its main components. Indian J Pharm Sci. 71: 343–347.

Matsouka, I., Beri, D., Chinou, I., Haralampidis, K.G., Spyropoulos, C. 2011. Metals andselenium induce medicarpin accumulation andexcretion from the roots of fenugreek seedlings: a potential detoxification mechanism. Plant soil. 343: 235–245.

Safaei-Ghomi, J., Batooli, H. 2010. Determination of bioactive molecules from flowers, leaves, stems and roots of *Perovskia abrotanoides* Karel growing in central Iran by nano scale injection. DIG J NANOMATER BIOS. 5: 551–556.

Sajjadi, S.E., Mehregan, I., Khatamsaz, M., Asghari, G.H. 2005. Chemical composition of the essential oil of *Perovskia abroatanoides* Karel growing wild in Iran. Flavour Frag J. 20: 445–446.

Wink, M. 2010. Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. second edition. Inc. New Delhi, India. 20–30.

Investigating the effect of habitat on the amount of flavonoids in the medicinal plant Brazambal

Farzaneh Maryam[1], Amirahmadi Atefe[1*], Poozesh Vahid[1]

[1] Plant Biology Group, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran.

Abstract

Brazambal is a small genus of Lamiaceae family that exists in Iran and some neighbor's country as native. The medicinal properties of this plant have long been of interest to people. In this study, three populations of the medicinal plant *Perovskia abrotanoides* Kar. were collected from three natural habitats including Damghan (station 1, 1504 m), Kordmir (station 2, 1672 m) and Shahroud (station 3, 1285 m) in July 2017. Then, the information about temperature and precipitation was obtained from the Meteorological Organization, and the amount of flavonoids in the flowering branches was also measured. The experiment was carried out as a completely randomized design with 3 and comparing the average data using Duncan's test at a probability level of 5%. The obtained results show that station 1 is the driest station and station 2 is the wettest station. Also, the highest amount of flavonoids was measured from Kordmir belonging to station 2. The results of this study showed that the amount of flavonoids increase in Brazambal populations with the increase in altitude.

Keywords: Barazambal, Habitat, Felavenoeids, Semanan Province

a.amirahmadi@du.ac.ir

بررسی اثر قارچ‌های اندوفیت جدا شده از گیاه *Rhabdociadium aucheri* بر روی قارچ *Fusarium oxysporum*

هانیه سرفرازی صالح[۱]، رضاحبیبی پور[۱*]، محسن رجبی[۲]

۱. گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی علوم پزشکی ، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران
۲. گروه تحقیقات جنگل و مرتع، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، همدان، ایران

چکیده

فوزاریوم یک سردهٔ بزرگ از کپک‌هاست که بخشی از گروهی که اغلب به عنوان هایفومایسیتیز می‌شناسند است که به طور گسترده‌ای در خاک گسترش می‌یابد و با گیاهان درگیر می‌شود. این نوع قارچ بیشتر در گیاه گندم و ذرت دیده می‌شود. بخصوص در مناطق با رطوبت بالا، از مهم‌ترین قارچ‌های خاک زی می باشد. هدف از انجام این پژوهش تعیین اثر قارچ های اندوفیت جدا شده ازگیاه *Rhabdociadium aucheri* بر روی قارچ فوزاریوم آکسیسپوروم است.

در این تحقیق ابتدا به منظور ایزوله کردن گونه‌های قارچی مورد نظر در محیط کشت PDA کشت داده شد. پس از اینکه گونه‌ها به میزان مناسبی رشد نمود و نیمی از سطح پلیت را دربرگرفت از هرکدام پنج تکه از قارچ و یک تکه به عنوان شاهد برداشته و درون محیط مایع PDB ریخته تا قارچ‌ها در این محیط رشد و تشکیل میسیلیوم دهند. در پایان تأثیر قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از گیاه *Rhabdociadium aucheri* بر قارچ فوزاریوم آکسیسپوروم بررسی گردید. آزمایش به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ و مقایسه‌ی میانگین‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ ٪ انجام شد.

نتایج پس از گذشت هفت روز از زمان کشت، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد اثر قارچ‌های اندوفیت بر قارچ‌فوزاریوم بسیار معنی‌دار بودد ($p<۰/۰۵$). مقایسه میانگین اثر قارچ‌های اندوفیت گیاه *Rhabdosciadium aucheri* بر روی قارچ فوزاریوم مورد مطالعه نشان داد کشت متقابل *Alternaria radicinas train* 3 در مقابل *Fusarium oxysporum* با ۱۵ میلی‌متر شعاع رشد قارچی نشان دهنده بیشترین میزان رشد این اندوفیت در برابر این قارچ بیماری‌زا بود و همچنین کشت متقابل *Paraphoma radicana* در مقابل *Fusarium oxysporum* با ۷/۵ میلی‌متر شعاع رشد قارچی نشان دهنده کمترین میزان رشد اندوفیت‌ها در برابر قارچ فوزاریوم بود و درصد بازدارندگی قارچ‌های اندوفیت گیاه *Rhabdosciadium aucheri* بر

* Habiby.reza@gmail.com

روی این قارچ مورد مطالعه نشان داد کشت *متقابل* *Alternaria radicina* strain 3 در *مقابل* *Fusarium oxysporum* با درصد بازدارندگی ۶۰ درصد نشان دهنده توان بالای بازدارندگی این اندوفیت دربرابراین قارچ بود و همچنین *Paraphoma radicina* در مقابل قارچ فوزاریوم با ۳۰ درصد بازدارندگی نشان دهنده کمترین توان بازدارندگی است.

نتایج بررسی اثر قارچ‌های اندوفیت برقارچ‌های بیماری‌زا در کشت متقابل نشان داد، در بیشتر موارد این قارچ ها دارای اثر مهارکنندگی و بیوکنترلی بر قارچ بیماری‌زای فوزاریوم آکسیسپورم بوده است.

کلید واژه‌ها: اندوفیت، متابولیت ثانویه، قارچ، *Rhabdosciadium aucheri*، میکروارگانیسم.

۱. مقدمه

اندوفیت‌ها به موجوداتی اطلاق می‌شود که بین سلول‌های گیاه زنده زندگی می‌کنند. رابطه‌ای که آنها با گیاه برقرار می‌کنند از همزیستی تا مرز بیماری‌زایی متفاوت است. اندوفیت به معنای «درون گیاه» می‌باشد. استفاده از این واژه طیف وسیعی از موجودات نظیر باکتری، قارچ، گیاهان و حشرات درون گیاهان را در برمی‌گیرد. آن‌ها در هر ارگانی از میزبان می‌توانند ساکن شوند. اندوفیت واژه‌ای است، که به عنوان مثال، مورد استفاده برای جلبک‌ها و گیاهان اندوفیتی، انگلی، همزیستی باکتری اندوفیتی و قارچی و باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا در فاز رشدی نهفته است. اما همچنین برای میکروارگانیسم‌های همزیست نیز استفاده می‌شود (سیبر و همکاران، ۲۰۰۲). قارچ‌های اندوفیت همه جا زی بوده و تقریباً در همه‌ی سلسله‌ی گیاهان و حتی پروتیست‌های گیاه‌مانند یافت شده‌اند. دو گروه اکولوژیکی از قارچ‌های اندوفیت‌ها تشخیص داده شده‌اند؛ اندوفیت‌های باریک برگ‌ها و اندوفیت‌های گیاهان چوبی (وانی و همکاران، ۲۰۰۰). اندوفیت‌های قارچی اغلب شامل آسکومیست‌ها بوده و تعداد کمی از بازیدیومیست‌ها، زیگومیست‌ها و ائومیست‌هارا شامل می‌شود (ژو و همکاران، ۲۰۱۰).

نقش بیولوژیکی و طبیعی اندوفیت‌ها، بسته به میزبان گیاهی‌شان متفاوت است. اندوفیت‌ها معمولا به عنوان همزیست با میزبان‌شان شناخته می‌شوند. اندوفیت‌ها اغلب گیاه را در مقابل حمله‌ی حشرات گیاه‌خوار و یا پاتوژن‌های مهم بافتی محافظت می‌کنند. قارچ‌های اندوفیتی، اغلب به عنوان قارچ‌های بدون علامت که در همه‌ی گیاهان می‌توانند باشند، اطلاق می‌شوند. آنها در فضای درون سلولی ساقه‌ها، گوشوارک‌ها، ریشه‌ها و برگ‌های گیاهان بدون ایجاد هیچگونه اثرات منفی آشکار، سکونت می‌کنند (باکن و همکاران، ۲۰۰۰). اندوفیت‌ها ممکن است،به صورت افقی از طریق اسپورهای موجود در هوا یا به صورت عمودی از طریق بذر منتقل شوند (سوراناریان و همکاران، ۲۰۱۳). همانند دیگر قارچ‌ها، قارچ‌های اندوفیتی هتروتروف‌اند و سوخت و سازشان را ازگیاهان میزبان تأمین می‌کنند. متابولیت‌های ثانویه‌ی مختلفی با خواص مختلف دارویی (بویژه خواص ضد سرطانی)، خواص بازدارندگی از گیاه‌خوارها، حشرات، عوامل بیماری‌زای گیاهی و نماتودها و محرک‌های رشد گیاهی توسط اندوفیت‌ها تولید می‌شوند. بعلاوه، اندوفیت‌ها از طریق روش‌هایی از قبیل کلنیزاسیون، تحریک پاسخ‌های دفاع مکانیکی میزبان و سنتز متابولیت‌های دفاعی باعث القاء مقاومت گردیده، که یک واکنش عمومی غیر اختصاصی می‌باشد که جلوی اثرات سمیت پارازیت را گرفته، و بدین ترتیب باعث جلوگیری از بیماری و محافظت گیاه می‌گردد (سومان و همکاران، ۲۰۱۶).هدف از انجام این پژوهش تعیین اثر قارچ های اندوفیت جدا شده از گیاه *Rhabdociadium aucheri* بر روی قارچ *Fusarium oxysporum* است.

۲. مواد و روش ها

این مطالعه از نوع مشاهده‌ای می‌باشد و قارچ های اندوفیت از کلکسیون میکروارگانیسم های دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان که به صورت ایزوله به عنوان اندوفیت از گیاه *Rhabdociadium aucheri* و برای بررسی‌های بیشتر خالص سازی انجام شد و نهایتا به کمک روش های مولکولی اندوفیت های زیر شناسایی شده بودند که از میان این موارد- K11 -K23 K2

K18- K21 قابل دسترس بود (جدول ۱). قارچ بیماری زای گیاهی از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان تهیه شد.

جدول ۱: مشخصات ایزوله‌های اندوفیتی دریافت شده از دانشگاه ازاد اسلامی همدان

کد ایزوله قارچی	کدآزمایشگاه	میزبان	گونه	منطقه جغرافیایی
K2	$EMR_1(2)$	*Rhabdociadium aucheri*	Alternaria radicina strain 2	امامزاده کوه (محسن)
K23	$PR_3(3)$	*Rhabdociadium aucheri*	Paraphoma radicana	پیست اسکی (تاریکدره)
K11	PSS1(1)	*Rhabdociadium aucheri*	Alternaria rosae	پیست اسکی (تاریکدره)
K18	$DR_1(1)$	*Rhabdociadium aucheri*	Alternaria radicina	دره مرادبیگ
K21	$DB_1(3)$	*Rhabdociadium aucheri*	Alternaria radicina strain 2	دره مرادبیگ

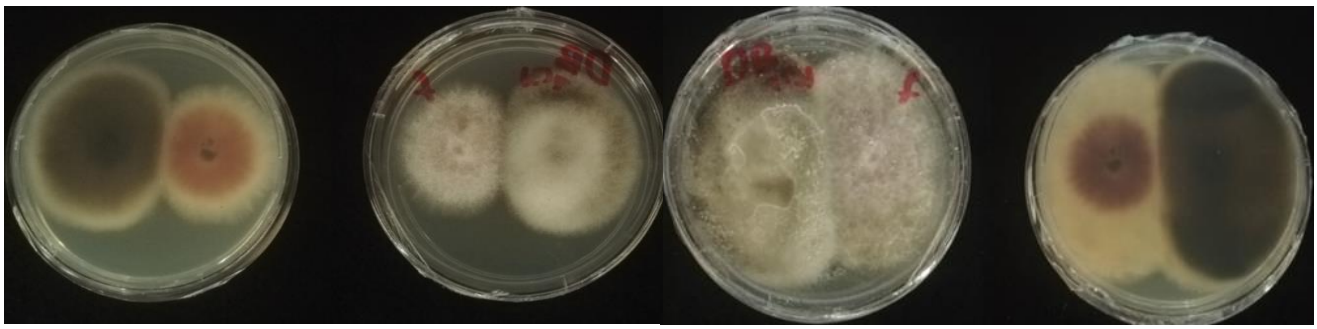
به منظور کشت قارچ اندوفیت از محیط کشت PDA (شرکت Condalsb،اسپانیا) استفاده شد. قارچ‌های اندوفیت بر روی محیط کشت‌های تهیه شده کشت گردید؛ در ادامه به علت کند رشد بودن قارچ‌های اندوفیت به مدت حدود ۷روز در انکوباتور با دمای ۲۶±۲ درجه سانتی گراد قرار گرفتند تا به رشد مطلوب و به حدود رشدی با شعاع دو تا سه سانتی متر برسند.

به منظور بررسی تست‌های ضدمیکروبی مرتبط با کشت متقابل قارچ‌های اندوفیت و قارچ‌های بیماری زا گیاهی بر اساس روش اصلاح شده مرتن و استروبل (۱۹۹۵) انجام گرفت. بدین منظور، در یک طرف پلیت۹ سانتی متری دارای محیط کشت PDB+۶گرم در لیتر عصاره مخمر، یک قطعه به قطر ۵ میلی متر از کشت فعال گونه‌های اندوفیت قرار داده شد و در سمت مقابل آن به فاصله سه سانتی متر یک قارچ بیماری‌زا کشت گردید و بعد مدت روز۷ در انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و اثر آنتاگونیستی قارچ‌های اندوفیت دربرابر قارچ‌های بیماری‌زا گیاهی بررسی و مشاهده گردید. آزمایش به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ و مقایسه‌ی میانگین‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ ٪ انجام شد.

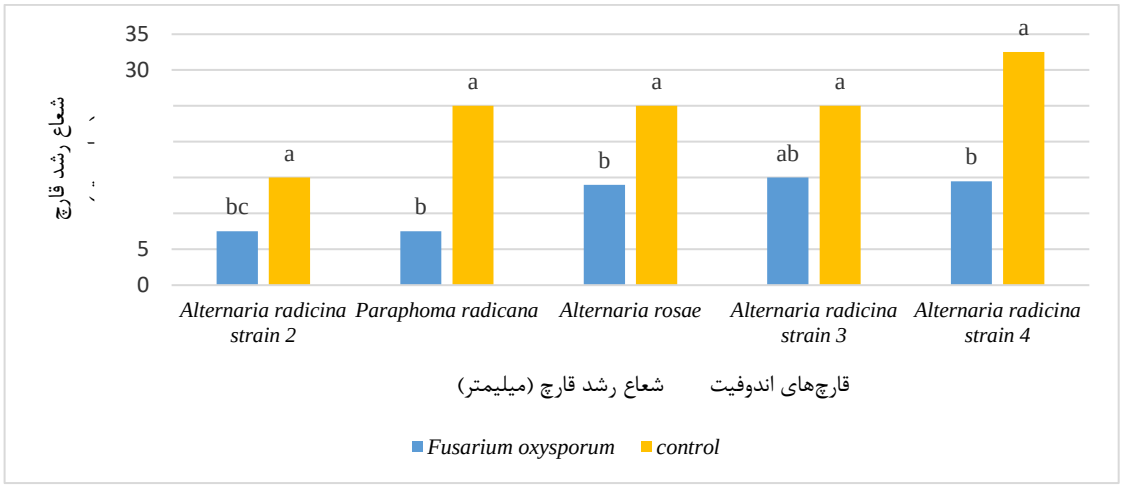
۳. نتایج

نتایج پس از گذشت هفت روز از زمان کشت، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد اثر قارچ‌های اندوفیت بر قارچ-فوزاریوم بسیار معنی‌دار بودند ($p<۰/۰۵$). مقایسه میانگین اثر قارچ‌های اندوفیت گیاه *Rhabdosciadium aucheri* بر روی قارچ فوزاریوم مورد مطالعه، بررسی شد و نتایج نشان داد کشت *متقابل* *Alternaria radicina* strain 3 در مقابل *Fusarium oxysporum* با ۱۵ میلی‌متر شعاع رشد قارچی نشان دهنده بیشترین میزان شعاع رشد این اندوفیت دربرابر قارچ‌های بیماری‌زا بود و همچنین کشت متقابل *Paraphoma radicana* در مقابل Fusarium oxysporum با ۷/۵ میلی‌متر شعاع رشد قارچی نشان دهنده کمترین میزان شعاع رشد اندوفیت ها در برابر قارچ فوزاریوم است (شکل۱) و درصد بازدارندگی قارچ‌های اندوفیت گیاه *Rhabdosciadium aucheri* بر روی این قارچ مورد مطالعه، بررسی شد و نتایج نشان داد کشت متقابل *Alternaria radicina* strain 3 در *مقابل* *Fusarium oxysporum* با درصد بازدارندگی ۶۰ درصد نشان دهنده توان بالای بازدارندگی

این اندوفیت دربرابرانقارچ بودوهمچنین *Paraphoma radicina* در مقابل قارچ فوزاریوم با درصد بازدارندگی ۳۰ درصد نشان دهنده کمترین توان بازدارندگی است (شکل۲).



شکل ۱. تأثیر متقابل قارچ‌های اندوفیت *Alternaria radicina* strain 3 در مقابل قارچ *Fusarium oxysporum* الف)کشت ۷ روزه سطح رویی (سمت چپ)، سطح زیرین (سمت راست) ب)کشت ۱۴روزه سطح رویی (سمت راست)، سطح زیرین (سمت چپ)



شکل۲: مقایسه میانگین اثر قارچ های اندوفیت Rabdociadium aucheri بر روی قارچ بیماری‌زای گیاهی مورد مطالعه

۴. بحث

در این پژوهش نتایج نشان داد کشت متقابل Alternaria radicina strain 3 در مقابل Fusarium oxysporum با درصد بازدارندگی ۶۰ درصد نشان دهنده توان بالای بازدارندگی این اندوفیت دربرابر این قارچ بود.

در این پژوهش پنج ایزوله قارچی که از گیاه *Rhabdosciadium aucheri* همدان به عنوان ایزوله‌های برتر که اثرات بازدارندگی از رشد قارچ‌های بیماری‌زا گیاهی نظیر فوزاریوم را در سطح آزمایشگاهی نشان داده بودند شناخته شدند.

دالال و همکاران اثر آنتاگونیستی گونه‌های مختلف باسیلوس را روی آسپرژیلوس نایجر، فوزاریوم اکسی پاروم، کاندیدا آلبیکنس و موکور بررسی و مشاهده کردند که بین قارچ‌های مختلف از لحاظ مهار رشد تفاوت معنی داری وجود دارد به طوری‌که بیشترین بازدارندگی روی آسپرژیلوس نایجر مشاهده شد (دالال و همکاران، ۲۰۱۳). این مطالعه به لحاظ آزمون بازدارندگی جدایه‌ها روی پاتوژن‌های مهم قارچی (*آسپرژیلوس نایجر*، *آلترناریا آلترناتا*، *فوزاریوم اکسیس پاروم*) با مطالعه ما مطابق بود.

در پژوهشی که در بررسی مربوط به اثر جدایه های *Trichoderma* روی بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی در اثر قارچ *F. oxysporum f . sp . lycopersici* ملاحظه شد درصد کاهش بیماری در اثر تریکودرما در حضور قارچ فوزاریوم عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی رقم Mony maker که یکی از ارقام حساس به بیماری تشخیص داده شده بود و در مورد تاثیر تریکودرما در افزایش طول بوته ها و وزن تر بونه های گوجه فرنگی نسبت به شاهد آلوده فوزاریوم، تمامی جدایه ها تاثیر متفاوتی روی افزایش طول بوته ها و وزن تر بوته های گوجه فرنگی داشتند که می تواند تأییدی بر اثر قارچ های بیولوژیکی بر این قارچ بیماری‌زای گیاهی باشد (نیک نژاد و همکاران، ۱۳۷۸).

۵. نتیجه گیری:

نتایج بررسی اثر قارچ‌های اندوفیت برقارچ‌های بیماری‌زا در کشت متقابل نشان داد، در بیشتر موارد این قارچ ها دارای اثر مهار کنندگی و بیوکنترلی بر قارچ بیماری‌زای فوزاریوم آکسیسپورم بوده است وهمچنین نتایج نشان داد کشت متقابل *Alternaria radicina* strain 3 در مقابل *Fusarium oxysporum* با درصد بازدارندگی ۶۰ درصد نشان دهنده توان بالای بازدارندگی این اندوفیت دربرابراینقارچ‌بوده است

تشکر و قدردانی

بدینوسیله ازهمکاری حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان قدردانی می گردد.

منابع

نیک نژادکاظم پور، مصطفی؛ شریفی تهرانی، عباس؛ اخوت، محمود. ۱۳۷۸. بررسی تاثیر قارچ های اندوفیت آنتاگویست *Trichoderma* spp علیه بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی در اثر *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Bacon, C.W. & White, J.F. (editors) (2000). Microbial Endophytes. New York: Marcel Dekker. – ISBN 0-8247-8831-1.

Dalal J, Kulkarni N (2013). Antagonistic and plant growth promoting potentials ofindigenous – endophytic bacteria of soybean (Glycine max (L) Merril). *Current Research in Microbiology and Biotechnology*. 1(2): 62-9.

Suman A, Yadav AN, Verma P (2016). "Endophytic Microbes in Crops: Diversity and Beneficial – Impact for Sustainable Agriculture". In Singh DP, Singh HB, Prabha R (eds.). *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. Springer India. pp. 117–143.

Suryanarayanan TS (2013). "Endophyte research: going beyond isolation and metabolite – documentation". *Fungal Ecology*. 6 (6): 561–568.

Wani ZA, Ashraf N, Mohiuddin T, Riyaz-Ul-Hassan S (2015). "Plant-endophyte symbiosis, an – ecological perspective". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99 (7): 2955–65.

Zhao J, Zhou L, Wang J, Shan T, Zhong L, Liu X & Gao X (2010) Endophytic fungi for producing – bioactive compounds originally from their host plants. *Current research, technology and education in tropics in applied microbiology and microbial biotechnology Microbiology*, 2 (2): 567-576.

Effect of endophytic fungi isolated from *Rhabdociadium aucheri* on *Fusarium oxysporum*

Haniyeh Sarfarazi Saleh[1], Habibipour Reza[1*], Mohsen Rajabi[2]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Medical Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran.
[1]Forest and Rangeland Research Department, Hamedan Agricultural and Natural
[2]Resources Research and Education Center, AREEO, Hamedan, Iran.

Introduction and purpose

Fusarium is a large genus of molds that is part of a group often known as hyphomycetes that spreads widely in soil and interacts with plants. This type of fungus is mostly found in wheat and corn plants. Especially in areas with high humidity, it is one of the most important soil fungi. The purpose of this research is to determine the effect of endophytic fungi isolated from *Rhabdociadium aucheri* on *Fusarium oxysporum*.

Materials and methods

In this study, first, in order to isolate the desired mushroom species, it was cultured in PDA culture medium. After the species grew to a suitable extent and covered half of the surface of the plate, five pieces of each mushroom and one piece as a control were taken and poured into the PDB liquid medium so that the mushrooms grow and form mycelium in this medium. to give At the end, the effect of endophytic fungi isolated from *Rhabdociadium aucheri* on *Fusarium oxysporum* was investigated. Data analysis was done with SPSS software and comparison of averages was done with Duncan's multi-range test method at 5% probability level and complete randomized block design was carried out with 3 repetitions.

Results

The results were analyzed after seven days of cultivation. The results showed that the effects of endophytic fungi on *Fusarium* were very significant ($p<0.05$). The comparison of the average effect of endophytic fungi of *Rhabdosciadium aucheri* on the studied *Fusarium* fungus was investigated and the results showed Cross-cultivation of *Alternaria radicina* strain 3 against *Fusarium oxysporum* with 15 mm showed the highest rate of growth of this endophyte against pathogenic fungi, and also the cross-cultivation of *Paraphoma radicana* against *Fusarium oxysporum* with 7.5% showed the lowest rate. The growth of endophytes is against *Fusarium* fungus, and the percentage of inhibition of endophytic fungi of *Rhabdosciadium aucheri* was investigated on this studied fungus, and the results showed that Alternaria radicina strain 3 was cross-cultivated against *Fusarium oxysporum* with an inhibition percentage of 60%, indicating a high inhibitory power. This endophyte was compared to this fungus and also *Paraphoma radicina* showed the lowest inhibition power against *Fusarium* fungus with 30% inhibition percentage.

Conclusion: The results of investigating the effect of endophytic fungi on pathogenic fungi in cross-cultivation showed that, in most cases, these fungi had an inhibitory and biocontrol effect on the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*.

Keywords: Endophyte, Secondary Metabolite, Fungus, *Rhabdosciadium aucheri*, Microorganism.

بررسی اثر مهاری ترکیب فلاونوئیدی کوئرستین بر فعالیت آنزیم کربنیک انیدراز IX

سمیه خاطری[۱]، مریم مهرابی[۱]، رضا خدارحمی[۲]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

[۲] مرکز تحقیقات زیست شناسی پزشکی، پژوهشکده فناوری سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

[۳] گروه فارماکوگنوزی و بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

چکیده

کوئرستین یکی از فراوان ترین ترکیبات فلاونوئیدی موجود در سبزیجات، گل ها، میوه ها و بسیاری از دانه ها است که دارای اثرات ضد التهابی و ضد سرطانی می باشد. در سلول های سرطانی میزان بیان بعضی از ایزوزیم های کربنیک انیدراز از جمله CA IX افزایش می یابدکه نقش مهمی در تنظیم pH، تکثیر سلولی و متاستاز این سلول ها دارد. کوئرستین به دلیل ماهیت پلی فنولی توانایی مهار فعالیت آنزیم کربونیک انیدراز را دارد. در این پژوهش، ابتدا تخلیص ایزوزیم CA IX با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل–سفارز انجام شد. سپس اثر مهاری کوئرستین بر فعالیت آنزیمی ایزوزیم CA IX بررسی شد. ایزوزیم CA IX خالص شده به صورت تک باند در ژل الکتروفورز SDS-PAGE قابل مشاهده بود. تعیین فعالیت آنزیم در حضور غلظت های مختلف کوئرستین نشان دهنده اثر مهاری قابل توجه این ترکیب بر آنزیم بود. مقدار IC_{50} کوئرستین برابر با ۱/۳۷ ± ۵۴/۴۵ میکرومولار تعیین شد. بنابراین کوئرستین می تواند به عنوان یک کاندید دارویی با منشاء طبیعی برای درمان سرطان مورد مطالعات بیشتر قرار بگیرد.

واژگان کلیدی: کربنیک انیدراز IX، کوئرستین، فلاونوئید، مهارکننده

* E-mail: m.mehrabi@razi.ac.ir

۱. مقدمه

کربنیک انیدرازها متالوآنزیم هایی هستند که هیدراسیون برگشت پذیر مولکول دی اکسید کربن (CO_2) را به پروتون (H^+) و بی کربنات (HCO_3^-) کاتالیز می کنند (Lindskog, 1997). کربنیک انیدرازها در پروکاریوت ها و یوکاریوت ها بیان می شوند و تاکنون هفت خانواده از این آنزیم ها شناخته شده است (Meyer-Almes, 2021). هرکدام از این خانواده های کربنیک انیدراز، با وجود داشتن تفاوت های ساختاری، واکنش آنزیمی مشابهی را کاتالیز می کنند. در پستانداران ۱۶ ایزوزیم از α–CAs وجود داردکه توزیع متفاوتی در بدن دارند (Jensen et al., 2019). ایزوزیم CA IX یک پروتئین دایمر غشایی است که دارای ۴۵۹ اسید آمینه می باشد و ساختار آن شامل یک سیگنال پپتید در انتهای آمین (۳۷–۱ اسیدآمینه)، بخش خارج سلولی (۴۱۴–۳۸ اسیدآمینه)، ناحیه گذرنده از غشا (۴۳۳–۴۱۵ اسیدآمینه) و بخش درون سلولی (۴۵۹–۴۳۴ اسیدآمینه) می باشد (Genis et al., 2009). در شرایط فیزیولوژیک، CA IX دارای بیان بسیار محدودی است که به صورت عمده در سطح بازولترال معده، روده، صفرا و پوشش اپیتلیال حفره های بدن می باشد و در تنظیم pH سلولی نقش دارد (Hilvo et al., 2008). از طرف دیگر، بیان این پروتئین در انواع مختلف سلول های سرطانی از جمله سرطان سینه، روده، ریه و مغز افزایش می یابد. افزایش مقدار بیان این پروتئین در سلول های سرطانی، در شرایط هیپوکسی و به واسطه فعال شدن کمپلکس HIF–1 القا می گردد (Ledaki et al., 2015). در طی مطالعات بیوشیمیایی صورت گرفته، اثبات شده است که مهار کردن فعالیت ایزوزیم CA IX امکان کنترل تومورهای هیپوکسیک را که به داروهای شیمی درمانی معمول پاسخ نمی دهند، فراهم می سازد و با توجه به این موضوع می توان رویکرد مناسب تری در الگوی طراحی داروهای ضد سرطان داشت (Jamali et al., 2015).

به طور کلی، ترکیبات مهار کننده کربنیک انیدراز ها به دو گروه اصلی طبقه بندی می شوند که شامل ترکیبات مهار کننده کلاسیک و غیر کلاسیک می باشند. ترکیبات سولفونامیدی از مهار کننده های کلاسیک به طور گسترده به عنوان اهداف دارویی در پزشکی مورد استفاده قرار می گیرند. ترکیبات بسیاری از جمله فنول ها، پلی آمین ها ، کومارین ها ، اسید های کربوکسیلیک و مشتقات آن ها به عنوان مهارکننده های غیر کلاسیک کربنیک انیدرازها شناخته می شوند (Singh et al., 2018). فنول ها و پلی فنول ها یکی از بزرگ ترین دسته های متابولیت های ثانویه در گیاهان هستند. استفاده از ترکیبات طبیعی که دارای ماهیت فنولی می باشند، در طراحی ترکیبات مهار کننده ی آنزیم کربنیک انیدراز، امکان سنتز ترکیبات غیر سمی و بدون گوگرد را فراهم ساخته اند که با جلوگیری از بروز آلرژی های احتمالی نسبت به گوگرد، می توانند به صورت قابل اطمینان در میان عموم مردم به عنوان ترکیبات ایمن مورد استفاده قرار گیرند(Karioti et al., 2015).کوئرستین یکی از فراوان ترین ترکیبات فلاونوئیدی موجود در سبزیجات، گل ها، میوه ها (سیب، انگور قرمز، انواع توت ها، و بیشتر مرکبات)، بسیاری از دانه ها و انواع نوشیدنی ها مانند چای می باشد که به دلیل اثرات ضد التهابی، ضد فشار خون، ضد دیابت، ضد سرطان، ضد کلسترول به عنوان تقویت کننده سیستم ایمنی بدن شناخته شده است (Lesjak et al., 2018). همچنین به علت ماهیت فنولی کوئرستین، به عنوان یکی از انواع مهارکننده های آنزیم کربنیک انیدراز استفاده می شود (Aygul et al., 2016). در این پژوهش، ابتدا خالص سازی ایزوزیم CA IX انجام شد. سپس اثر مهاری کوئرستین بر ایزوزیم CA IX، با سنجش بیوشیمیایی فعالیت آنزیمی بررسی شد.

۲. مواد و روش ها

کوئرستین و *p*-NPA از شرکت شیمیایی سیگما (ایالات متحده آمریکا) تهیه شد. معرف های دیگر از شرکت مرک (آلمان) بودند.

۱.۲. بیان و خالص سازی آنزیم CA IX

در این پژوهش جهت بیان و خالص سازی پروتئین CA IX، از پلاسمید pET32a–CA IX استفاده شد (Araste et al., 2014). این وکتور حاوی یک ژن مقاوم به آمپی سیلین است. ابتدا یک کلونی از باکتری BL21–DE3 که پلاسمید pET32a–CAIX با روش شیمیایی به آن منتقل شده بود، برداشته شد و به یک فالکون حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت LB استریل حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (با غلظت نهایی ۱۰۰µg/ml) اضافه گردید و به مدت ۱۷–۱۴ ساعت در انکوباتور شیکر دار با دمای ۳۷ ℃ و با سرعت دورانی ۲۰۰ rpm انکوبه شد. سپس یک فلاسک یک لیتری حاوی ۵۰۰ میلی لیتر محیط کشت LB استریل به همراه آمپی سیلین (با غلظت نهایی ۱۰۰µg/ml) تهیه و از نمونه باکتری کشت داده شده، به نسبت ۱:۱۰۰ به آن افزوده شد و در انکوباتور شیکر دار با دمای ۳۷ ℃ و با سرعت دورانی ۲۰۰ rpm قرار داده شد. هنگامی که جذب نمونه حاصل در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۸–۰/۶ رسید (تقریبا پس از گذشت ۵–۴ ساعت)، ۳۰ میلی لیتر از نمونه حاصل به عنوان نمونه شاهد (القا نشده) جدا سازی و در یک فالکون مجزا جمع آوری گردید. به منظور القای بیان پروتئین، محلول ایزوپروپیل بتا–دی–۱– تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) با غلظت نهایی ۰/۵ میلی مولار به فلاسک حاوی نمونه اضافه گردید و به مدت ۲۰–۱۸ ساعت درون انکوباتور شیکر دار با دمای ۲۰ ℃ و با سرعت دورانی ۲۰۰ rpm قرار داده شد.

۲.۲. تهیه عصاره سلولی حاوی پروتئین CA IX

نمونه باکتری القا شده در مرحله قبل، پس از گذشت مدت زمان انکوباسیون، به مدت ۲۰ دقیقه در ۷۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی حذف و رسوب حاصل در ۲۰ میلی لیتر بافر لیز حاوی محلول PMSF با غلظت نهایی ۱ میلی مولار، کاملا حل و به مدت یک ساعت در یخچال قرار داده شد. بافر لیز شامل سدیم دی هیدروژن فسفات ۵۰ میلی مولار، سدیم کلرید ۳۰۰ میلی مولار و ایمیدازول ۵ میلی مولار و PMSF ۱ میلی مولار بود. پس از آن، جهت تخریب کامل دیواره سلول باکتری و آزاد سازی اجزای سلولی، محلول حاصل با استفاده از دستگاه سونیکاتور پروب دار تحت سونیکاسیون (در معرض امواج فرا صوت) قرار گرفت. برنامه سونیکاسیون شامل ۱۵ مرحله ۲۰ ثانیه ای با فاصله زمانی ۶۰ ثانیه استراحت میان هر مرحله، بود. همچنین برای پیشگیری از تخریب گرمایی پروتئین، تمامی مراحل سونیکاسیون در حمام یخ انجام شد. سپس نمونه لیز شده در ۵۰۰۰ g و به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ ℃ سانتریفیوژ گردید. پس از پایان سانتریفیوژ، مایع رویی (جهت بررسی مقدار پروتئین های محلول) و همچنین رسوب حاصل (جهت بررسی مقدار پروتئین های نامحلول به صورت اینکلوژن بادی)، به صورت مجزا جمع آوری شدند.

۳.۲. کروماتوگرافی تمایلی نیکل- سفارز

با توجه به وجود توالی His–Tag در پلاسمید pET32 – CA IX، خالص سازی پروتئین CA IX با استفاده از ستون تمایلی نیکل- سفارز (Ni–NTA) انجام شد. از بافر تعادل برای متعادل سازی pH ستون استفاده می شود. در این بافر، غلظت نهایی سدیم کلرید ۳۰۰ میلی مولار، سدیم دی هیدروژن فسفات ۵۰ میلی مولار و ایمیدازول ۵ میلی مولار است. از بافر شست و شو جهت شست وشوی ستون از ناخالصی هایی که در هنگام بارگذاری نمونه روی ستون به آن متصل شده اند، استفاده می شود. در این بافر، غلظت نهایی سدیم دی هیدروژن فسفات ۵۰ میلی مولار، سدیم کلرید ۳۰۰ میلی مولار و ایمیدازول ۱۵ میلی مولار بود. از بافر جداکننده (NPI 250) با توجه به غلطت بالای ایمیدازول در این بافر، جهت خروج پروتئین مورد نظراستفاده می گردد. در این بافر، غلظت نهایی سدیم دی هیدروژن فسفات ۵۰ میلی مولار، سدیم کلرید ۳۰۰ میلی مولار و ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار بود.

٤.۲. مراحل آماده سازی ستون تمایلی Ni–NTA و بارگذاری نمونه

به ازای هر میلی لیتر رزین Ni-NTA، تقریبا۱۰ میلی لیتر عصاره سلولی به دست آمده از مراحل قبل، به ستون منتقل شد. پس از عبور کامل نمونه، جهت شست و شوی ستون از ناخالصی های متصل به آن، حدود ۲۰-۱۰ میلی لیتر بافر شست و شو به ستون اضافه گردید. زمانی که جذب نمونه های جمع آوری شده به صفر نزدیک شد، شست و شوی ستون پایان یافت. جهت خروج پروتئین مورد نظر از ستون، ۲۰-۱۰ میلی لیتر بافر ۲۵۰ NPI به ستون منتقل و مایع خروجی ستون در لوله های آزمایش جداگانه و در حجم های ۱ میلی لیتر، جمع آوری گردید. پس از خوانش جذب نمونه های جمع آوری شده در طول موج ۲۸۰ نانومتر، نمونه هایی با جذب بیش از ۰/۲ جداسازی و جمع آوری گردید. در تمامی مراحل، سرعت عبور نمونه و بافر های ستون با استفاده از پمپ در حدود ml/min ۱ تنظیم شد. درنهایت، به منظور حذف نمک و ایمیدازول از نمونه های حاصل، دیالیز صورت گرفت. سپس، کیسه دیالیز مخصوص این پروتئین با شعاع قطع حدود ۱۰ کیلودالتون و نمونه پروتئین CA IX، در برابر بافر تریس–سولفات در۷/۸ pH دیالیز شد.

۵.۲. ارزیابی کیفی نمونه های پروتئین با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE

در کلیه مراحل این پژوهش جهت ارزیابی کیفی روند تخلیص پروتئین، از الکتروفورز SDS-PAGE در شرایط بافری تریس- گلایسین استفاده شد. در این شرایط، غلظت ژل بالا ۵٪ و با توجه به وزن مولکولی پروتئین مورد نظر از غلظت۱۲٪ برای ژل پایین استفاده گردید. تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد انجام شد.

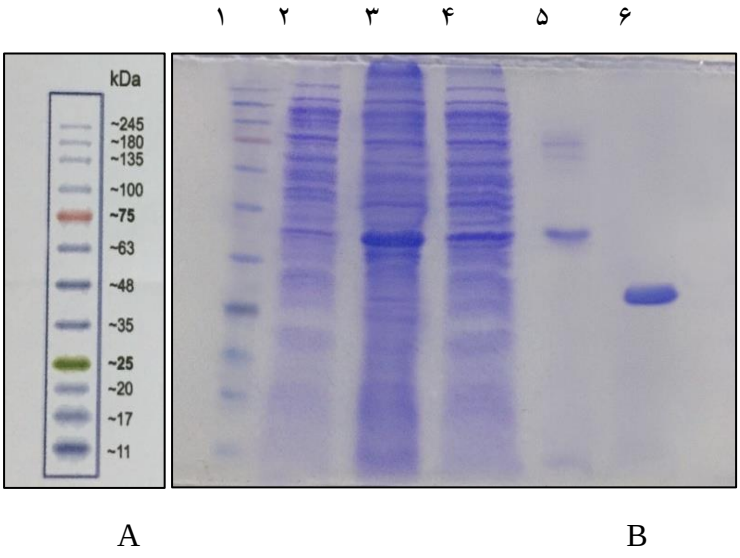
۶.۲. سنجش فعالیت استرازی ایزوزیم CA IX

در این پژوهش، جهت سنجش فعالیت استرازی ایزوزیم CA IX از سوبسترای *p*–NPA استفاده شد. با توجه به اینکه هیدرولیز *p*–NPAتوسط آنزیم کربنیک انیدراز منجر به تولید ترکیب رنگی پارا نیترو فنیل در محلول واکنش می شود، در این مرحله خوانش جذب نمونه ها در طول موج ۴۰۰ نانومتر جهت سنجش فعالیت آنزیمی، با استفاده از مد سینتیک دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی- فرابنفش انجام شد و در نهایت سرعت فعالیت استرازی آنزیم بر حسب تغییرات جذب در دقیقه (ΔAbs/min) محاسبه گردید. سرعت فعالیت استرازی آنزیم CA IX در حضور غلظت های مختلف سوبسترا *p*–NPA، غلظت ثابت ۰/۰۵ mg/ml آنزیم و در بافر تریس- سولفات ۵۰ میلی مولار با pH ۷/۷۵ بررسی شد. در این سنجش، خوانش جذب نمونه ها در طول موج ۴۰۰ نانومتر با استفاده از سل های کوارتز دو طرف شفاف با پهنای یک سانتی متر انجام شد. در طول آزمایش از دو سل کوارتز استفاده شد که یک سل به عنوان شاهد و دیگری حاوی آنزیم و به عنوان سل نمونه بود. در مرحله بعد سرعت فعالیت استرازی ایزوزیم CA IX در غیاب و حضور غلظت های مختلف کوئرستین مورد بررسی واقع شد.

۳. نتایج

۱.۳. تخلیص آنزیم کربنیک انیدراز IX

جهت بیان ژن CA IX، وکتور pET32a–CA IX به روش شیمیایی به سویه بیانی باکتری BL21.DE3 انتقال یافت. در ادامه پس از کشت باکتری حاصل، برای خالص سازی آنزیم CA IX از ستون تمایلی نیکل سفارز Ni–NTA استفاده گردید وکیفیت پروتئین تخلیص شده با استفاده از الکتروفورز SDS–PAGE ۱۲٪ مورد بررسی واقع شد (شکل ۱).



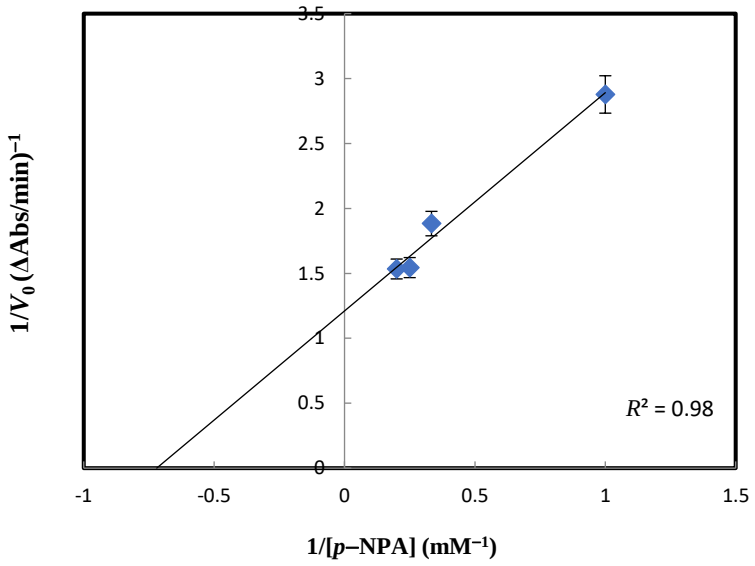
شکل ۱. نمایش SDS-PAGE نمونه پروتئین CA IX قبل و پس از ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni–NTA. A: مارکر پروتئینی که نمایانگر وزن مولکولی نمونه های پروتئینی بر اساس کیلودالتون می باشد. B: ستون ۱ مارکر پروتئینی، ستون ۲ نمونه شاهد (القا نشده)، ستون ۳ رسوب حاصل از سانتریفیوژ عصاره سلولی لیز شده جهت بررسی پروتئین های نامحلول (Inclusion bodies)، ستون ۴ نمونه ناخالص قبل از ستون جهت بررسی

پروتئین های محلول، ستون ۵ نمونه پروتئین CA IX پس از عبور از ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni–NTA، ستون ۶ نمونه تخلیص شده پروتئین CA II جهت مقایسه وزن مولکولی این پروتئین با پروتئین CA IX می باشد.

با توجه به نتایج حاصل از الکتروفورز SDS–PAGE در شکل ۱، آنزیم CA IX در محدوده ۴۲-۴۰ کیلودالتون تخمین زده شد. همچنین غلظت آنزیم CA IX تخلیص شده با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی تقریبا برابر ۰/۵ mg/ml به دست آمد.

۲.۳. بررسی سرعت فعالیت استرازی آنزیم CA IX

سنجش سرعت فعالیت استرازی آنزیم CA IX با غلظت ۰/۰۵ mg/ml، در حضور غلظت های ۱، ۳، ۴ و ۵ میلی مولار سوبسترای *p*–NPA و در بافر تریس- سولفات ۵۰ میلی مولار با pH ۷/۷۵ انجام شد. در ادامه نمودار لاین ویور- برک رسم و با استفاده از برون یابی و تعیین عرض از مبدا این نمودار، K_m آنزیم CA IX محاسبه گردید (شکل ۲). مقدار K_m به دست آمده برای آنزیم CA IX در این آزمایش برابر ۰/۱۱±۱/۳۸ تعیین شد.

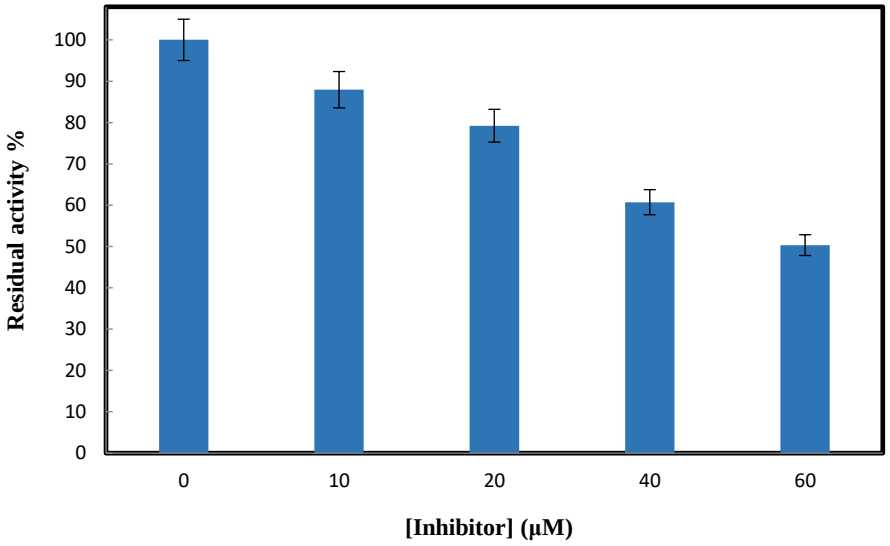


شکل ۲. نمودار لاین ویور- برک جهت محاسبه K_m آنزیم CA IX با غلظت ۰/۰۵ mg/ml، در حضور غلظت های ۱، ۳، ۴ و ۵ میلی مولار سوبسترای *p*–NPA و در بافر تریس- سولفات ۵۰ میلی مولار با pH ۷/۷۵ .

۳.۳. بررسی IC_{50} کوئرستین برای آنزیم CA IX

سرعت فعالیت استرازی آنزیم CA IX با غلظت ۰/۰۵ mg/ml در غیاب و حضور غلظت های مختلف کوئرستین و در غلظت ثابت ۵ میلی مولار سوبسترای *p*–NPA با خوانش جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی گردید. در این آزمایش، با افزایش میزان غلظت کوئرستین در محلول واکنش، سرعت فعالیت استرازی آنزیم کاهش یافت. در ادامه، نمودار فعالیت باقی مانده آنزیم CA

IX بر حسب درصد، در برابر غلظت های مختلف کوئرستین رسم گردید (شکل۳). همچنین، مقدار IC_{50} کوئرستین با استفاده از نرم افزار Prism برابر با ۱/۳۷ ± ۵۴/۴۵ تعیین شد.



شکل۳. نمودار بررسی IC_{50} کوئرستین برای آنزیم CA IX با غلظت ۰/۰۵ mg/ml در غیاب و حضور غلظت های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرو مولار کوئرستین و در بافر تریس- سولفات ۵۰ میلی مولار با pH ۷/۷۵.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نقش ایزوزیم های مختلف کربنیک انیدراز در برخی از شرایط پاتولوژیکی مانند سرطان و گلوکوما، مهارکننده های این آنزیم بسیار حایز اهمیت می باشند. برخی از ایزوزیم های غشایی مانند CA IX و CA XII در روند تومور زایی و پیشرفت سرطان نقش دارند. کارسینومای سلول کبدی از انواع تومورهای شناخته شده است که در سال های اخیر مورد مطالعه قرار گرفته است. شرایط هیپوکسی سبب افزایش رشد سلولی HCC به واسطه القا بیان آنزیم هگزوکیناز II می شود که در شرایط گلیکولیتیک جهت تامین انرژی سلول ضروری است. در مطالعه ای که اخیرا در نمونه های موش صورت گرفته است، مشخص شده است که مهار شدن فعالیت CA IX، سبب بهبود کارآیی مهارکننده ی آنزیم هگزوکیناز II و ممانعت از پیشرفت تومور به واسطه القا آپوپتوز می گردد (Cho et al., 2019). ترکیبات فنولی از مهم ترین انواع مهارکننده های غیرکلاسیک این آنزیم ها هستند. فلاونوئیدها به عنوان متابولیت های ثانویه در گیاهان، گروه مهمی از ترکیبات طبیعی هستند که دارای ساختارهای پلی فنولی می باشند. استفاده از ترکیبات طبیعی که دارای ماهیت فنولی می باشند، به عنوان ترکیبات مهار کننده ی آنزیم کربنیک انیدراز، امکان استفاده از ترکیبات غیر سمی و بدون گوگرد را فراهم می سازند که با جلوگیری از بروز آلرژی های احتمالی که نسبت به سولفونامید ها وجود دارد، می توانند به صورت قابل اطمینان در میان عموم مردم به عنوان ترکیبات ایمن مورد استفاده قرار گیرند. در یک مطالعه اثرات مهاری برخی از اسیدهای فنولیک همچون کوئرستین، اسید الاجیک، اسید گالیک، اسید

فرولیک و اسید کافئیک بر روی ایزوآنزیم های hCA I و hCA II سیتوزولی کربنیک انیدراز انسانی مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس نتایج این ترکیبات مقادیر K_I در محدوده میکرومولار برای hCA I و hCA II نشان دادند. دراین مطالعه کوئرستین برای hCA I اثر بازدارندگی رقابتی با ۴-نیتروفنیل استات به عنوان سوبسترا از خود نشان داد (Beyza Öztürk Sarıkaya et al., 2010). مطالعات متعدد دیگری اثر مهاری مشتقات فنولی همچون سالیسیک اسید و پاراستامول بر ایزوزیم های مختلف کربونیک انیدراز را مورد بررسی قرار دادند (Innocenti et al. 2008, Sentürk et al., 2009).

در این پژوهش پس از تخلیص ایزوزیم CA IX، اثر مهاری ترکیب فلاونوئیدی کوئرستین بر فعالیت این ایزوزیم با استفاده از مطالعات سینتیکی، بررسی گردید. با توجه به نتایج حاصل از بررسی سرعت فعالیت استرازی ایزوزیم CA IX در غیاب و حضور کوئرستین، کاهش سرعت فعالیت استرازی در حضور غلظت های افزایش یابنده این ترکیب مشاهده گردید. IC_{50} کوئرستین ۱/۳۷ ± ۵۴/۴۵ میکرومولار تعیین شد که البته مقدار آن نسبت به داروهای سولفونامیدی تجاری همچون سلکوکسیب و دورزولامید که قدرت مهار کنندگی آنها در حد نانومولار می باشد، بیشتر است. اما اگرچه قدرت مهارکنندگی آن در مقایسه با داروهای تجاری سلکوکسیب و دورزولامید کمتر می باشد، اما مزیت هایی همچون سطح مهاری متوسط و منشاء طبیعی آن می تواند آن را به عنوان یک سرنخ در راستای تولید دارو جهت درمان بیماری های مرتبط با ایزوزیم های مختلف کربنیک انیدراز مطرح سازد.

منابع

Araste, F., Ebrahimizadeh, W., Rasooli, I., Rajabibazl, M. and Mousavi Gargari, S. L. 2014. A novel VHH nanobody against the active site (the CA domain) of tumor associated, carbonic anhydrase isoform IX and its usefulness for cancer diagnosis, Biotechnology letters. 36: 21-28.

Aygul, I., Yaylaci Karahalil, F. and Supuran, C.T. 2016. Investigation of the inhibitory properties of some phenolic standards and bee products against human carbonic anhydrase I and II, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 31: 119-124.

Beyza Öztürk Sarıkaya, S., Gülçin, İ., & Supuran, C. T. 2010. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of phenolic acids. Chemical biology & drug design, 75(5): 515-520.

Cho, E.J., Yu, S.J., Kim, K., Cho, H., Cho, Y.Y., Lee, Y.B., Lee, J.H., Kim, Y.J., Youn, H. and Yoon, J.H. 2019. Carbonic anhydrase-IX inhibition enhances the efficacy of hexokinase II inhibitor for hepatocellular carcinoma in a murine model, Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 51: 121-129.

Genis, C., Sippel, K.H., Case, N., Cao, W., Avvaru, B.S., Tartaglia, L.J., Govindasamy, L., Tu, C., Agbandje-McKenna, M., Silverman, D.N., Rosser, C.J. and McKenna, R. 2009. Design of a carbonic anhydrase IX active-site mimic to screen inhibitors for possible anticancer properties, Biochemistry. 48(6): 1322-1331.

Hilvo, M., Baranauskiene, L., Salzano, A. M., Scaloni, A., Matulis, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Monti, S.M., Di Fiore, A., De Simone, G., Lindfors, M., Janis, J., Valjakka, J., Pastorekova, S., Pastorek, J., Kulomaa, M.S., Nordlund, H.R., Supuran, C.T. and Parkkila, S. 2008. Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes, Journal of Biological Chemistry. 283(41): 27799-27809.

Innocenti, A., Vullo, D., Scozzafava, A. and Supuran, C.T., 2008. Carbonic anhydrase inhibitors: Interactions of phenols with the 12 catalytically active mammalian isoforms (CA I–XIV). Bioorganic & medicinal chemistry letters, 18(5): 1583-1587.

Jamali, S., Klier, M., Ames, S., Barros, L.F., McKenna, R., Deitmer, J.W. and Becker, H.M. 2015. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX facilitates lactate flux in human breast cancer cells by non-catalytic function, Scientific reports. 5(1): 13605.

Jensen, E.L., Clement, R., Kosta, A., Maberly, S.C. and Gontero, B. 2019. A new widespread subclass of carbonic anhydrase in marine phytoplankton, The ISME Journal. 13(8): 2094-2106.

Karioti, A., Ceruso, M., Carta, F., Bilia, A.R. and Supuran, C.T. 2015. New natural product carbonic anhydrase inhibitors incorporating phenol moieties, Bioorganic & Medicinal Chemistry. 23(22): 7219-7225.

Ledaki, I., McIntyre, A., Wigfield, S., Buffa, F., McGowan, S., Baban, D., Li, J.L. and Harris, A.L. 2015. Carbonic anhydrase IX induction defines a heterogeneous cancer cell response to hypoxia and mediates stem cell-like properties and sensitivity to HDAC inhibition, Oncotarget. 6(23): 19413-19427.

Lesjak, M., Beara, I., Simin, N., Pintac, D., Majkic, T., Bekvalac, K., Orcic, D. and Mimica Dukic, N. 2018. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives, Journal of Functional Foods. 40: 68-75.

Lindskog, S. 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase, Pharmacology & therapeutics. 74(1): 1-20.

Meyer-Almes, F. J. 2021. Carbonic Anhydrase as Drug Target-Thermodynamics and Structure of Inhibitor Binding, edited by Daumantas Matulis., Springer Nature, Switzerland, 209-210.

Sentürk, M., Gülçin, I., Daştan, A., Küfrevioğlu, O.I. and Supuran, C.T., 2009. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of antioxidant phenols. Bioorganic & medicinal chemistry, 17(8): 3207-3211.

Singh, S., Lomelino, C.L., Mboge, M.Y., Frost, S.C. and McKenna, R. 2018. Cancer Drug Development of Carbonic Anhydrase Inhibitors beyond the Active Site, Molecules. 23(5): 1-22.

Investigating the inhibitory effect of the flavonoid compound quercetin on the carbonic anhydrase IX enzyme activity

Somayeh Khateri[1], Maryam Mehrabi[11], Reza Khodarahmi[2, 3]

[1] Department of biology, Faculty of Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran

[2]Medical Biology Research Center, Health Technology Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

[3]Department of Pharmacognosy and Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

Abstract

Quercetin is one of the most abundant flavonoid compounds found in vegetables, flowers, fruits and many seeds, which has anti-inflammatory and anti-cancer effects. In cancer cells, the expression level of some carbonic anhydrase isozymes including CA IX increases, which plays an important role in pH regulation, cell proliferation and metastasis of tumor cells. Quercetin, a polyphenol compound, has the ability to inhibit the carbonic anhydrase enzyme activity. In this research, CA IX isozyme was first purified using a Nickel-sepharose affinity chromatography column. Then the inhibitory effect of quercetin on CA IX activity was investigated. Purified CA IX isozyme was appeared as a single band in SDS-PAGE gel. Determining the enzyme activity in the presence of different concentrations of quercetin showed the significant inhibitory effect of quercetin on the enzyme activity. IC_{50} value of quercetin was determined as 54.45 ± 1.37. Therefore, quercetin can be further studied as a natural origin drug candidate for cancer treatment.

Keywords: Carbonic anhydrase IX, quercetin, flavonoid, inhibitor

[1] E-mail: m.mehrabi@razi.ac.ir

بررسی اثرات آللوپاتیک عصاره آبی گیاه دارویی اسفند (*Peganum harmala* L.) بر شاخص های جوانه زنی چند گیاه زراعی

محمد اسماعیل پور[۱] *، معصومه رحمانیان کوشککی[۲]، عسکر غنی[۳]، عبدالکریم زارعی[۱]

[۱] گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم
[۲] دانش آموخته گروه گیاهان دارویی و معطر، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم
[۳] گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم

چکیده

میوه گیاه دارویی اسفند به علت داشتن ترکیبات آلکالوئیدی بسیار متنوع نظیر هارمین و هارمالین اثرات بازدارنده قوی بر جوانه زنی بذر و سرکوب رشد بسیاری از علف‌های هرز دارد. در پژوهش حاضر، به منظور ارزیابی اثرات آللوپاتیک اسفند بر شاخصه-های جوانه زنی بذر گلرنگ، گندم، تربچه و کلزا، از عصاره آبی میوه اسفند در غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ درصد در آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد. نتایج نشان داد که عصاره اسفند بر طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه در هر چهار گونه گیاهی تأثیر منفی و معنی داری داشت. با افزایش غلظت عصاره، جوانه‌زنی و رشد گیاهچه با شدت بیشتری کاهش یافت. همچنین در گیاهان مورد مطالعه مقاومترین گیاه، گلرنگ بود. از دلایل احتمالی مقاومت‌تر بودن گلرنگ، می‌توان به ضخامت بیشتر پوسته ی بذر و در نتیجه جذب کمتر ترکیبات آللوپاتیک و یا داشتن آنزیم‌های مقاوم به ترکیبات آللوپاتیک اشاره نمود. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، درصورت استفاده از عصاره اسفند بصورت خاک مصرف و با هدف سرکوب جوانه زنی بذر علف‌های هرز قبل از کشت گیاهان زراعی، بایستی میزان پایداری و دوام ترکیبات آللوپاتیک اسفند در خاک در نظر گرفته شود تا با رعایت فاصله زمانی مناسب برای کشت، از عدم ایجاد اختلال در جوانه زنی بذر گیاهان زراعی اطمینان حاصل شود.

ایمیل نویسنده مسئول
E-mail: esmailpour@jahromu.ac.ir ; msp1362@yahoo.com

واژگان کلیدی: ترکیبات آللوپاتیک، عصاره آبی، درصدجوانه زنی، کشاورزی پایدار.

۱. مقدمه

با توجه به تبعات منفی مصرف دراز مدت علف‌کش های شیمیایی در اراضی کشاورزی از جمله آلودگی‌های زیست محیطی، تهدید سلامتی انسان، بروز مقاومت در علف‌های هرز و غیره، یکی از راهکارها جهت کاهش مصرف علف‌کش‌ها بهره‌گیری از قابلیت آللوپاتیک گیاهان دارویی می باشد. بطور کلی ترکیبات آللوپاتیک به متابولیت های ثانویه‌ی آزاد شده به محیط اطراف توسط موجودات، که بر روی سلامت و زیست موجودات دیگر اثر می گذارند اطلاق می شود. برخی ازگیاهان دارویی از طریق تولید و ترشح متابولیت های ثانویه، تأثیر منفی بر جوانه زنی و رشد علف‌های هرز مجاور دارند و از این طریق رشد و تراکم آن‌ها را در اراضی کشاورزی محدود می کنند و استفاده از این نوع گیاهان، یا بقایای آن ها می تواند موجب کاهش مصرف علف‌کش‌های شیمیایی شود. لذا مطالعه‌ی اثرات آللوپاتیک گیاهان دارویی، در راستای توسعه کشاورزی پایدار بوده و می تواند راهنمای مفیدی برای انتخاب تناوب زراعی مناسب باشد.

اسفند گیاه دارویی چند ساله از خانواده Zygophyllaceae است که عصاره آن خاصیت حشره‌کشی، لاروکشی و دورکنندگی دارد و همچنین سبب کاهش جمعیت بیماری‌های گیاهی خاکزاد نظیر قارچ‌های جنس فوزاریوم، فیتوفتورا و پوکسینیا می شود (Bitchagno et al., 2022). عصاره‌ی اسفند می تواند بر خصوصیات جوانه‌زنی بذر علف‌های هرز و رشد و نمو آنها نیز تأثیرگذار باشد. در این خصوص مکی زاده تفتی و همکاران (۱۳۹۰) با هدف بررسی اثر آللوپاتیک عصاره‌ی هیدروالکلی اسفند بر جوانه‌زنی و رشد علف‌های هرز سلمه تره و تاج خروس و یولاف وحشی به صورت آزمایشگاهی و گلخانه‌ای گزارش دادند که درصد جوانه زنی و سبز شدن بذرهای هر سه علف هرز تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره اسفند به طور معنی داری در آزمایشگاه و گلخانه کاهش یافت. همچنین Ehtaiwesh and Yarboa (2021) گزارش دادند اسپری کردن عصاره آبی دانه و ساقه اسفند بر روی شاخساره علف‌هرز مرغ (*Cynodon dactylon* L.)، تعداد انشعابات ساقه، تعداد برگ، ارتفاع و وزن بوته مرغ را کاهش داد و عصاره دانه اثر بازدارندگی بیشتری نسبت به عصاره ساقه بر صفات مورد مطالعه داشت. همچنین گزارش شده است که عصاره برگ اسفند، طول گیاهچه، وزن خشک گیاهچه، سطح برگ و میزان کلروفیل کل را در علف‌های هرز پیچک صحرایی و یولاف وحشی کاهش داد و میزان کاهش صفات بستگی به غلظت بکار برده شده[1] داشت و هرچه غلظت عصاره اسفند بیشتر می شد میزان بازداری نیز بیشتر می شد (Sodaeizadeh et al., 2010).

اسفند دارای آلکالوئیدهای متنوعی از نوع بتاکاربولین نظیر هارمان، هارمول، هارمین و هارمالین و همچنین آنتراکوئینون‌ها است که منحصراً در دانه گیاه تجمع می یابند و بطور کلی دانه‌های رسیده، محتوای آلکالوئیدهای بیشتری نسبت به دانه‌های نارس دارند. با این حال اسفند دارای انواع فلاونوئیدها و کوئینازولین‌ها نیز است که در دانه و همچنین شاخساره اسفند وجود دارند (Bitchagno et al., 2022). در این زمینه Shao et al., (2013) گزارش دادند که هارمین و هارمالین استخراج شده از دانه اسفند

[1]- Dose dependent

سبب بازداری رشد گیاهچه گیاهان تک لپه و دو لپه می شود. هارمالین در غلظت بسیار کم (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) طول ریشه‌چه و ساقه‌چه در کاهو و تاج خروس را به ترتیب ۳۰ و ۴۷ درصد کاهش داد در حالی‌که هارمین اثر بازدارندگی کمتری داشت. بنابراین عصاره اسفند این پتانسیل را دارد که بعنوان یک علفکش زیستی[1] برای کنترل علف‌های هرز در اراضی کشاورزی در نظر گرفته شود. با این حال این سوال مطرح می شود که آیا ممکن است عصاره اسفند اثر آللوپاتیک انتخابی بر بذر گیاهان زراعی داشته باشد. لذا پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات آللوپاتیک عصاره آبی دانه اسفند بر جوانه زنی بذر چند گیاهان زراعی انجام شد.

۲. مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه گیاهان دارویی دانشگاه جهرم انجام شد. فاکتورها شامل غلظت‌های مختلف عصاره اسفند (شامل پنج سطح صفر، پنج، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ درصد) و بذر گیاهان مختلف (شامل گندم، گلرنگ، کلزا و تربچه) بود. برای تهیه عصاره آبی اسفند، ۵۰۰ گرم پودر آسیاب شده‌ی کپسول محتوی دانه اسفند را با ۲۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط نموده و به مدت ۲۴ ساعت در ظرف دربسته بر روی شیکر قرار داده شد. سپس محلول از مش بسیار نازک عبور داده و از عصاره بدست آمده، غلظت های ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵ درصد تهیه و از آب مقطر نیز به عنوان تیمار شاهد استفاده گردید (شکل۱-الف). برای جلوگیری از کپک زدن عصاره‌ها، به همه ی غلظت‌ها و همچنین تیمار شاهد مقدار ۰/۲ گرم قارچ‌کش زینب به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره اضافه شد.

جهت کشت بذرها، از پتری دیش های شیشه‌ای به قطر ۶ سانتی متر استفاده گردید. در هر پتری دیش، یک لایه کاغذ صافی ضد عفونی شده و ۲۵ عدد بذر قرار داده شد. به هر پتری دیش ۵ میلی‌لیتر عصاره اضافه و اطراف هر پتری دیش جهت جلوگیری از تبخیر و ورود آلودگی پارافیلم پیچیده شد وکلیه پتری‌دیش‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ژرمیناتور در روشنایی قرار داده شدند (شکل ۱-ب). پس از ده روز صفاتی نظیر طول ریشه چه، طول ساقه‌چه، وزن تر ریشه‌چه و وزن خشک ریشه‌چه اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، ۱۰ بذر جوانه‌زده در هر تکرار انتخاب و بعد از جداسازی ریشه‌چه و ساقه‌چه از یکدیگر از کولیس دیجیتال با دقت یک میلی‌متر برای اندازه‌گیری استفاده شد (شکل ۱-ج).



[1]- Bio-herbicide

شکل ۱: الف) عصاره غلیظ (استوک) اسفند، ب) پتری‌دیش های محتوی بذر و غلظت‌های مختلف عصاره اسفند قبل از قرارگیری در ژرمیناتور، ج) اندازه گیری طول ریشه‌چه با کولیس دیجیتال

سپس وزن تر ریشه‌چه و ساقه‌چه به طور مجزا با استفاده از ترازو دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ اندازه‌گیری شد. بعد از آن ریشه‌چه و ساقه‌چه ها در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و وزن خشک هر یک با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. آنالیز آماری داده‌ها در نرم افزار JMP و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

۳. نتایج

تفاوت معنی داری بین تیمارها در سطح احتمال یک درصد در مورد کلیه صفات مورد مطالعه وجود داشت. در تیمار شاهد (آب مقطر) طول ساقه‌چه در گلرنگ، تربچه، گندم و کلزا به ترتیب ۱۱/۹، ۱۰/۵، ۲۴/۳ و ۸ میلی‌متر بود. عصاره ۵ درصد که رقیق‌ترین عصاره بود، مانع از رشد ساقه‌چه در بذر تربچه، گندم و کلزا شد و طول ساقه‌چه و وزن تر و وزن خشک ساقه‌چه در گلرنگ را به ترتیب ۵۸/۱، ۶۴/۷ و ۶۲/۶ درصد نسبت به شاهد کاهش داد.

درحالی که طول ریشه‌چه در گلرنگ، تربچه، گندم و کلزا در تیمار شاهد به ترتیب ۱۱/۲، ۱۷، ۱۸/۷ و ۱۳/۶ میلی‌متر بود، تیمار ۵ درصد عصاره طول ریشه‌چه را در گلرنگ به ترتیب ۶۷/۳ و ۸۷/۴ درصد کاهش داد و مانع از رشد ریشه‌چه و خروج آن از بذر گندم و کلزا شد. عصاره‌های ۱۰، ۲۰ و ۲۵ درصد نیز مانع رشد ریشه چه در تربچه، گندم و کلزا شدند و به ترتیب طول ریشه‌چه را در گلرنگ به میزان ۷۷/۵، ۸۳/۲ و ۸۹/۴ درصد کاهش دادند. در رابطه با وزن تر و وزن خشک ریشه‌چه نیز نتایج مشابهی بدست آمد. وزن تر ریشه‌چه در گندم و کلزا در تیمار شاهد به ترتیب ۲۱ و ۷۴ میلی گرم و وزن خشک ریشه چه ۳ و ۵ میلی‌گرم بود در حالی که در تیمار عصاره ۵ درصد، وزن تر و خشک ریشه‌چه به علت عدم خروج ریشه‌چه صفر در نظر گرفته شد. در تیمار شاهد، در گلرنگ و تربچه وزن تر ریشه‌چه به ترتیب ۲۰۶ و ۹۲ میلی‌گرم و وزن خشک آنها ۱۰ و ۱۰ میلی‌گرم بود. در تیمار عصاره ۱۰ درصد، وزن تر و وزن خشک ریشه‌چه در گلرنگ به ۲۰ و ۷ میلی‌گرم کاهش یافت و وزن تر و خشک ریشه‌چه در تربچه به علت عدم خروج ریشه‌چه، صفر در نظر گرفته شد.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که عصاره اسفند بر طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن تر و خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه در هر چهار گیاه تأثیر منفی و معنی داری داشت. در این زمینه Almahmody and Hameda, (2022) گزارش دادند که عصاره آبی دانه اسفند، تعداد و طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه گیاه زراعی جو را کاهش داد و در این میان حساسیت ریشه‌چه جو بیشتر از ساقه‌چه بود. همچنین Aslam et al., (2016) تأثیر عصاره آبی برگ اسفند (۴۰ گرم برگ خشک در ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر) در غلظت‌های ۵ تا ۲۵ درصد بر سرعت جوانه زنی بذر گندم و خردل[1] را مورد ارزیابی قرار دادند و مشاهده کردند که عصاره ۲۵ درصد که غلیظ‌ترین

[1]- Mustard

عصاره بود، سرعت جوانه‌زنی بذر گندم و خردل را به ترتیب ۵۳ و ۸۰ درصد کاهش داد. در پژوهش حاضر در غلظت ۵ درصد عصاره دانه که رقیق ترین عصاره بود مانع از جوانه‌زنی بذر گندم و کلزا شد که نشان می‌دهد دانه‌های اسفند ترکیبات آللوپاتیک بسیار قوی دارند. حساسیت بذرهای مورد مطالعه به عصاره ۵ و ۱۰ درصد اسفند یکسان نبود و بذر گلرنگ نسبت به سایر بذرها مقاوم‌تر بود و بطورکلی در بذر این گیاه با افزایش غلظت عصاره، رشد گیاهچه با شدت بیشتری کاهش یافت و نهایتا به صفر رسید. از دلایل احتمالی مقاومت‌تر بودن دانه گلرنگ، می توان به ضخامت بیشتر پوسته‌ی بذر و در نتیجه جذب کمتر ترکیبات آللوپاتیک و یا داشتن آنزیم‌های مقاوم به ترکیبات آللوپاتیک اشاره نمود. با این حال عصاره اسفند در کمترین غلظت مورد استفاده نیز در رشد گیاهچه گلرنگ ایجاد اختلال کرد. مکانیزم عمل عصاره اسفند در بازداری از جوانه زنی بذر کاملاً مشخص نیست و ممکن است شامل ممانعت از تقسیم سلولی، اختلال در فعالیت آنزیم‌های دخیل در جوانه‌زنی بذر، تخریب سلول‌های جنین و غیره باشد. لذا عصاره آبی دانه اسفند می تواند شبیه به علف‌کش‌های شیمیایی نظیر تریفلورالین و آلیون که مانع از جوانه‌زنی بذر می شوند، بعنوان یک ترکیب بذرکش با منشأ گیاهی مخصوصاً در کشت ارگانیک گیاهان که امکان استفاده از علف‌کش‌های شیمیایی وجود ندارد، مطرح باشد.

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، عصاره اسفند در غلظت‌های مورد آزمایش بصورت انتخابی عمل نمی‌کند و به بذر گیاهان زراعی نیز آسیب می رساند. لذا درصورت قرار دادن اسفند در تناوب زراعی و یا استفاده از عصاره اسفند بصورت خاک مصرف و با هدف سرکوب جوانه زنی بذر علف‌های هرز قبل از کشت گیاهان زراعی، بایستی میزان آزاد سازی ترکیبات آللوپاتیک اسفند و همچنین پایداری و دوام این ترکیبات در خاک در نظر گرفته شود تا با رعایت فاصله زمانی مناسب برای کشت محصول، از عدم ایجاد اختلال در جوانه‌زنی بذر گیاه زراعی اطمینان حاصل شود.

منابع

مکی زاده، تفتی م.، فرهودی، ر.، ربیعی، م.، راستی فر، م. ۱۳۹۰. بررسی اثر آللوپاتیک گیاه دارویی اسفند برجوانه زنی و رشد سه گونه علف هرز. فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۲۷(۱): ۱۳۵–۱۴۶.

Almahmody, A. and Hameda, A.A.B. 2022. The allelopathic effect of Harmala (*Peganum harmala* L.) seeds on grains germination and seedlings growth of Barley (*Hordeum vulgare* L.). Available at SSRN 4300978.

Aslam, M.M., Jamil, M., Malook, I., Khatoon, A., Rehman, A., Rahim, A., Khan, P., Shakir, S.U.K., Irfan, S., Ullah, F. and Bashar, K.U. 2016. Phytotoxic effects of *Calotropis procera*, *Tamarix aphylla* and *Peganum harmala* on plant growth of wheat and mustard. Pakistan Journal of Agricultural Research, 29(1): 43-52.

Bitchagno, G.T.M., El Bouhssini, M., Mahdi, I., Ward, J.L. and Sobeh, M. 2022. Toward the allelopathy of *Peganum* sp. and related chemical constituents in agriculture. Frontiers in Plant Science, p.3352.

Ehtaiwesh, A. and Yarboa, L. 2021. Assessment of Allelochemicals Potential of *Peganum harmala* L. for Biological Control of *Cynodon dactylon* L. Scientific Journal for Faculty of Science-Sirte University. 1(2): 1-6.

Shao, H., Huang, X., Zhang, Y. and Zhang, C. 2013. Main alkaloids of *Peganum harmala* L. and their different effects on dicot and monocot crops. Molecules. 18(3): 2623-2634.

Sodaeizadeh, H., Rafieiolhossaini, M. and Van Damme, P. 2010. Herbicidal activity of a medicinal plant, *Peganum harmala* L., and decomposition dynamics of its phytotoxins in the soil. Industrial Crops and Products. 31(2): 385-394.

Investigation on Allelopathic Effects of Aqueous Extract of Wild Rue (*Peganum Harmala*) on Germination Parameters of Some Crops

, Masoumeh Rahmanian-Koshkaki [2], Askar Ghani [3], Abdolkarim [*]Mohammad Esmailpour [1] Zarei [1]

[1] Department of Plant Production and Genetic, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran
[2] Department of Medicinal and Aromatic Plants, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran
[3] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran

Abstract

Fruits of Wild Rue (*Peganum Harmala*) contain various alkaloid constituents such as harmine and harmaline which strongly suppress different weed seed germination and growth. In order to evaluate the allelopathic effect of wild Rue fruits on the germination characteristics of safflower, wheat, radish and rapeseed, aqueous extract of wild Rue was used at concentrations of 0, 5, 10, 20 and 25%. A randomized complete block design with three replications was employed. The results showed that the aqueous extract of wild Rue had a negative effect on root length, stem length, root and stem fresh and dry weight in all of the four plant species. By increasing the concentration of the extract, germination and seedling growth of the crops decreased more severely. Among the studied crops, the most resistant seed against the effects of wild Rue was safflower. Possible reasons for the resistance of safflower are the greater thickness of its seed coat, resulting in less absorption of allelopathic compounds and/or the presence of enzymes that are less affected by allelopathic compounds. It can be concluded that applying Rue extract in order to suppress weed seed germination prior to crop cultivation, persistence duration of applied Rue extract allelopathic constituents in the soil should be evaluated since it may inhibit seed germination and seedling growth of immediately cultivated crops.

Keywords: Allelopathic compounds, Aqueous extract, Germination percentage, Sustainable agriculture

[*] e-mail for the corresponding author: esmailpour@jahromu.ac.ir ; msp1362@yahoo.com

بررسی اسیدهای فنلی و خواص آنتی اکسیدانی گیاه *Artemisia annua*

سعید ملائی[۱] ، پوپک فرنیا[۲] ، جلال الدین غنوی[۲*]

[۱] گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز

[۲] مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماریهای ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماریهای ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری؛ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

چکیده

جنس *Artemisia* یکی از بزرگترین و گسترده‌ترین جنس‌های خانواده چتریان می‌باشد و دارای بیش از ۵۰۰ گونه متنوع است که به طور عمده در اروپا ، آسیا و آمریکای شمالی گسترش یافته‌اند. در این کار پژوهشی، درمنه یکساله (*A. annua*) از شمال‌غرب ایران جمع‌آوری شد. هدف از این کار تحقیقاتی، بررسی اسیدهای فنلی و خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه درمنه یکساله بود. اسیدهای فنلی آزاد، استری و باند شده به کمک التراسونیک استخراج شدند و با استفاده از HPLC جداسازی و شناسایی شدند. محتوای کل فنلی و فلاونوئیدی نمونه‌ها نیز با استفاده از روش رنگ‌سنجی Folin-Ciocalteu و کلرید آلومینیوم تعیین شدند. همچنین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها با استفاده از روش DPPH ارزیابی شدند. بر اساس نتایج بدست آمده، فنولیک اسیدهای باند شده دارای بیشترین بازده بودند. اندازه گیری محتوای فنول و فلاونوئیدکل نشان داد که عصاره فنولیک اسیدهای آزاد دارای بیشترین مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بود. همچنین، عصاره فنولیک اسیدهای آزاد دارای خاصیت آنتی-اکسیدانی بهتری نسبت به بقیه عصاره‌ها بود. نتایج HPLC نشان داد که از بین فنولیک اسیدهای مورد بررسی، رزمارینیک اسید، متا کوماریک اسید و کافئیک اسید عمده ترین ترکیباتی بودند که در عصاره فنولیک اسیدهای آزاد یافت شدند. عصاره فنولیک اسید استری نشان داد که متا کوماریک اسید و به دنبال آن کافئیک اسید عمده ترین ترکیبات هستند. فراوانترین فنولیک اسید موجود در عصاره فنولیک اسیدهای باند شده نیز مربوط به متا کوماریک اسید بود.

واژگان کلیدی: درمنه یکساله، عصاره، فلاونوئید، فنول

* e-mail: j.ghanavi@sbmu.ac.ir

۱. مقدمه

درمنه با نام علمی *Artemisia* شامل گیاهان مقاوم و بوته‌هایی است که به خاطر روغن‌های فرار آن‌ها شناخته شده‌اند. اکثر گونه‌ها دارای عطرهای قوی و طعم‌های تلخ به واسطه وجود ترپنوئیدها به عنوان ترکیبات طبیعی به ویژه سزکویی‌ترپن‌لاکتون‌ها هستند. درمنه متعلق به تیره کاسنیان است و شامل بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی می‌باشد که عمدتاً در آسیا، اروپا و آمریکای شمالی یافت می‌شوند. جنس درمنه همیشه از گیاهان فراوان و برخوردار از خواص دارویی بوده و در داروهای سنتی برای درمان انواع بیماری‌ها مفید بوده است.

درمنه یکساله با نام علمی *Artemisia annua*، گیاهی یکساله، معطر و بومی مناطق شمالی استان‌های چاهار و سوئویان در چین است. با این حال، این گیاه اکنون در اروپا و آمریکا به صورت خودرو رشد می‌کند. این گیاه در مقیاس وسیع در چین، ویتنام، ترکیه، ایران، افغانستان و استرالیا کشت داده می‌شود. همچنین در هندوستان، این گیاه به صورت آزمایشی در شرایط معتدل و نیمه‌گرمسیری کشت شده است. درمنه یکساله می‌تواند تا ۲/۴ متر رشد کند. ساقه آن استوانه‌ای و شاخه‌دار است. برگ‌های متناوب، سبز تیره یا قهوه‌ای مایل به سبز دارد. رایحه‌ای معطر دارد در حالی که طعم آن تلخ است. این گیاه با خوشه‌های بزرگی از گل‌آذین‌های کپه‌ای (قطر ۲-۳ میلی‌متر) با پوشش‌های غشایی سفیدمانند و توسط برگ‌های بریده شانه‌ای که پس از دوره شکوفایی از بین می‌روند با گل‌های زرد کم‌رنگ (۲-۱ میلی متر) کوچک که رایحه مطبوعی نیز دارند مشخص می‌شود (Bhakuni et al., 2001; Bilia et al., 2014).

درمنه یکساله گسترده‌ای از فلاونوئیدها، فنل‌ها و اسیدهای فنولیک را تولید می‌کنند. برخی از این ترکیبات به ویژه فلاونوئیدها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدسرطانی هستند (Apostolidis et al., 2006). Ferreira و همکاران (۲۰۱۰)، در مروری به بررسی ترکیبات فنلی درمنه یکساله پرداختند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره درمنه یکساله را ناشی از حضور این ترکیبات دانسته‌اند که عمدتاً شامل فلاون‌ها، فلاونول‌ها، کومارین‌ها و فنولیک‌اسیدها می‌شوند. کومارین‌های شناسایی شده برجسته درمنه یکساله از جمله کومارین، اسکولتین، ایزوفراکسیدین، اسکوپولتین، اسکوپولین و تومنتین بودند. فنولیک‌اسیدهای عمده شناسایی شده نیز شامل کلروژنیک‌اسید، کوئینیک‌اسید و کوماریک‌اسید بود. همچنین آپیژنین و لوتئولین از ترکیبات مهم فلاون‌ها و رامنتین و روتین هم از ترکیبات قابل ذکر برای فلاونول‌ها در اینجا هستند.

هدف از این مطالعه، بررسی فنولیک اسیدهای آزاد، استری و باند شده موجود در درمنه یکساله جمع آوری شده از شمال غرب ایران و ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی آن می باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. جمع آوری *Artemisia annua*

درمنه *Artemisia annua* از حوالی شهرستان خوی-آذربایجان‌غربی جمع‌آوری شدند و بعد از شناسایی، در دمای اتاق خشک گردید و سپس به صورت دستی پودر شده و برای عصاره‌گیری آماده شد.

۲.۲. استخراج فنولیک اسیدها

برای استخراج فنولیک اسیدهای آزاد، ۴ گرم از گیاه به ۴۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ اضافه شده و در دستگاه التراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه تحت امواج فراصوت قرار داده شد. بعد از اینکه محلول توسط قیف معمولی و کاغذصافی از تفاله جدا شد، تفاله

برای استخراج فنولیک اسیدهای باند شده نگهداری شد و محلول صاف با استفاده از دستگاه تبخیرکننده دوار، حلال‌پرانی شد و سپس، pH عصاره در ۲ تنظیم شد. در ادامه با استفاده از حلال هگزان استخراج حلال-حلال انجام گرفت و فاز آبی جداشده با حلال دی‌اتیل‌اتر و اتیل‌استات استخراج شد. فاز آلی به دست آمده حلال‌پرانی شد و در آون تحت دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید (Krygier et al., 1982).

برای استخراج فنولیک اسیدهای استری، به فاز آبی باقی‌مانده از مرحله قبل ۲۰ میلی‌لیتر محلول ۴ نرمال سدیم‌هیدروکسید افزوده گردید و به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق ماند. سپس، pH عصاره در ۲ تنظیم شد و با کمک حلال هگزان استخراج حلال-حلال انجام گرفت. روی فاز آبی، حلال دی‌اتیل‌اتر و اتیل‌استات اضافه شده و بعد از دو دقیقه همزدن، فاز آلی حلال‌پرانی شد و سپس محلول به دست آمده در آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد (Krygier et al., 1982).

برای استخراج فنولیک اسیدهای باند شده، روی تفاله‌ای که از مرحله استخراج فنولیک‌اسیدهای آزاد باقی مانده بود، ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۴ نرمال سدیم هیدروکسید، اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. در ادامه، محلول صاف شد و pH آن در ۲ تنظیم شد و با کمک حلال هگزان استخراج حلال-حلال انجام گرفت. فاز آبی توسط حلال دی‌اتیل‌اتر و اتیل‌استات به مدت دو دقیقه استخراج شدو در نهایت فاز آلی خشک گردید (Krygier et al., 1982).

۳.۲. جداسازی فنولیک‌اسیدها

برای جداسازی و شناسایی فنولیک‌اسیدهای عصاره‌ها از سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. شویش گرادیانی با حلال‌های متانول اسیدی و آب HPLC گرید، به عنوان فاز متحرک با سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه، صورت گرفت و ستون کروماتوگرافی C18 از نوع تجزیه‌ای و فازمعکوس با طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر و خلل و فرج ۵ میکرومتر به عنوان فاز ساکن بود. از حجم تزریق ۵۰ میکرولیتر و آشکارساز UV در طول موج ۲۷۵ نانومتر بهره گرفته شد.

۳.۲. بررس خاصیت آنتی اکسیدانی با روش DPPH

۱۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH (۱ میلی مولار) به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شدند؛ سپس جذب آن‌ها در ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری گردید.

۳. نتایج

بر اساس نتایج بدست آمده، بازده فنولیک‌اسیدهای آزاد، استری و باند شده استخراج‌شده از درمنه یکساله به ترتیب ۱/۲۵، ۱/۳۴ و ۳/۲۹ درصد بودند. تا بحال، طبق جست‌وجوی کتابخانه‌ای، مطالعه‌ای در مورد اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنلی در عصاره فولیک‌اسیدهای آزاد، استری و باندشده درمنه یکساله گزارش نشده است. لذا، ابتدا مقادیر آنها با دستگاه اسپکتروسکوپی اندازه‌گیری شد و در ادامه مقادیر آنها با هم مقایسه شدند. بر اساس نتایج، مقادیر آنها به ترتیب ۱۱۹/۴۴، ۲۵/۳۴ و ۳۴/۴۳ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم عصاره بود. همچنین، میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی ان عصاره‌ها به ترتیب ۱۰/۶۵، ۲/۲۰ و ۳/۱۷ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره بود که نشان می‌دهد عصاره عصاره فنولیک اسیدهای آزاد دارای بیشترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی هست.

در این کار تحقیقی، ابتدا فنولیک‌اسیدهای استاندارد با استفاده از HPLC جداسازی شدند و در ادامه فنولیک‌اسیدهای موجود در نمونه‌ها با مقایسه زمان جداسازی استانداردها و روش اسپایک شناسایی شدند. بعد از شناسایی فنولیک‌اسیدها، مقدار آنها با استفاده از معادلات کالیبراسیون بدست‌آمده از استانداردها محاسبه گردید. در جدول ۱، نتایج حاصل از مقادیر فنولیک-اسیدها (بر حسب میلی‌گرم بر گرم) در عصاره فنولیک‌اسیدهای آزاد، استری و باند شده استخراج‌شده از درمنه یکساله ذکر شده است. از بین فنولیک‌اسیدهای مورد بررسی، رزمارینیک اسید، متا کوماریک اسید و کافئیک اسید عمده ترین ترکیباتی بودند که در عصاره فنولیک اسیدهای آزاد یافت شدند. عصاره فنولیک اسید استری نشان داد که متا کوماریک اسید و به دنبال آن کافئیک اسید به ترتیب با مقادیر ۳/۹۳ و ۲/۷۸ میلی‌گرم بر گرم عصاره عمده ترین ترکیبات هستند. فراوانترین فنولیک اسید موجود در عصاره فنولیک اسیدهای باند شده نیز مربوط به متا کوماریک اسید بود.

برای بدست آوردن خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها، ابتدا غلظت‌های مختلف از نمونه‌ها تهیه گردید و درصد مهارکنندگی آنها محاسبه شد. در ادامه نمودار آنها رسم گردید و بر اساس نمودار و رابطه بدست آمده از نمودار، مقدار دقیق IC_{50} محاسبه گردید. بر اساس داده‌ها، مقادیر IC_{50} در عصاره فنولیک اسیدهای آزاد، استری و باند شده به ترتیب برابر با ۶۱/۹۵، ۴۴۹/۴۲ و ۸۵/۰۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر است که این نتایج نشان می‌دهد که عصاره فنولیک اسیدهای آزاد دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به بقیه عصاره‌ها است.

جدول ۱. میزان فنولیک اسیدهای آزاد، استری و باند شده در درمنه یکساله

شماره	ترکیب	آزاد	استری	باند شده
۱	سینامیک‌اسید	–	–	۰/۲۱
۲	متا کوماریک‌اسید	۴/۱۸	۳/۹۳	۳/۳۴
۳	سالسیلیک‌اسید	–	۲/۰۴	–
۴	فرولیک‌اسید	–	۰/۱۳	–
۵	پارا کوماریک‌اسید	۰/۱۲	–	–
۶	رزمارینیک‌اسید	۵/۷۸	۲/۲۳	–
۷	کافئیک‌اسید	۳/۱۲	۲/۷۸	–
۸	وانیلیک‌اسید	–	–	۰/۱۵
۹	پارا هیدروکسی بنزوئیک‌اسید	۰/۲۳	۰/۳۴	۰/۳۷
۱۰	گالیک‌اسید	–	–	۰/۹۷

مقادیر بر حسب میلی‌گرم بر گرم عصاره می باشد.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

امروزه، استفاده از ترکیبات گیاهی از جمله گونه‌های درمنه به عنوان یک روش برای درمان بیماری‌ها، به دلیل دسترسی آسان، عوارض جانبی کمتر و طبیعی و غیر سنتزی بودن، در مقایسه با دیگر روش‌های درمانی برای انواع بیماری‌ها، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. اسیدهای فنلی زیر گروهی از دسته ترکیبات فنلی هستند که در گیاهان به‌صورت آزاد یا مشتق شده با سایر ترکیبات طبیعی از جمله فلاونوئیدها، الکل‌ها، هیدروکسی اسیدهای چرب، استرول‌ها و گلوکوزیدها یافت می‌شوند (Lam et al., 2001). این ترکیبات موادی با یک حلقه فنلی و حداقل یک گروه عاملی کربوکسیلیک اسید هستند و می‌توان آنها را بسته به واحدهای کربنی زنجیره جانبی متصل به حلقه فنلی، به ترکیبات دارای ساختارهای C_6-C_3، C_6-C_2 و C_6-C_1 تقسیم‌بندی کرد که مهم‌ترین آن‌ها C_6-C_3 (مشتق شده از سینامیک اسید) و C_6-C_1 (مشتق شده از اسید بنزوئیک) هستند. بسیاری از اسیدهای فنلی مانند مشتقات سینامیک و بنزوئیک اسید در تمام گیاهان و گیاهانی که به‌عنوان غذا استفاده می‌شوند (مانند میوه‌ها، سبزیجات و غلات) وجود دارند. با این حال، فقط یک بخش جزئی از اسیدهای فنلی، به شکل اسید آزاد دیده می‌شوند. با توجه به نکات ذکر شده و اهمیتی که اسیدهای فنلی دارند این ترکیبات موضوع بسیاری از مطالعات شیمیایی، بیولوژیکی، کشاورزی و پزشکی بوده‌اند (Verpoorte et al., 2002). نتایج این تحقیقات مشخص کرده‌اند که ترکیبات فنلی در مدیریت بیماری‌های مزمن مرتبط با استرس اکسیداتیو مانند دیابت، سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی دارای پتانسیل بالایی هستند (Shetty et al., 2004). در مطالعه بر روی میزان کل ترکیبات فنلی معلوم شد که میزان کل ترکیبات فنلی عصاره فنولیک‌اسیدهای آزاد گیاه درمنه مورد مطالعه از عصاره فنولیک‌اسیدهای استری و باندشده بالاتر است. همچنین، در خصوص بررسی میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی، عصاره فنولیک‌اسیدهای آزاد نسبت به عصاره فنولیک‌اسیدهای استری و باندشده آن‌ها از میزان بالاتری برخوردار بود. در مطالعه بر روی شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات فنولیک‌اسیدی عصاره‌ها توسط سیستم HPLC، ترکیبات متا کوماریک‌اسید و پارا هیدروکسی‌بنزوئیک‌اسید در تمامی عصاره‌ها، اعم از عصاره فنولیک‌اسیدهای آزاد، استری و باندشده گونه‌های یافت شدند؛ البته در عصاره فنولیک‌اسیدهای آزاد و استری، ترکیب رزمارینیک‌اسید نیز جز ترکیبات عمده بودند. در بررسی خاصیت آنتی-اکسیدانی، عصاره فنولیک‌اسیدهای آزاد گونه درمنه مورد مطالعه، بیشترین خاصیت را نسبت به دو عصاره دیگر فنولیک‌اسیدها، نشان داد. طاهرخانی (۱۳۹۳) میزان فلاونوئید کل گونه های مختلف درمنه رو مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که عصاره *A. diffusa* دارای بیشترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی است و ارتباط مستقیمی بین میزان ترکیبات فنل با خاصیت آنتی اکسیدانی برقرار است. در یک مطالعه، توسط حاتمی و همکاران (۲۰۱۴)، میزان کل ترکیبات فنلی حاصل از ۵ عصاره مختلف (اتر نفت، دی کلرو متان، اتیل‌استات، اتانول و اتانول- آب) درمنه دوساله اندازه گیری شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با سه روش مختلف: آزمایش بلچینگ بتاکاروتن، روش مهار رادیکال ۲و۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل و سنجش یون آهنی کی‌لیت‌ساز مورد بررسی قرار گرفت. در بین تمام عصاره‌های آنالیز شده، عصاره هیدرو اتانولی، به طور قابل توجهی نسبت به سایر نمونه‌ها، مقدار فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نشان داد.

در نتیجه استخراج و بررسی ترکیبات طبیعی تولیدشده به وسیله این گونه گیاهی جنس درمنه و مشخص شدن عصاره با بیشترین متابولیت و خواص بیولوژیکی، در آینده گام مؤثری در جهت کاربردهای دارویی و درمانی این گونه‌ها به منظور تجاری‌سازی می‌تواند برداشته شود.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه شهید مدنی آذربایجان بخاطر حمایت مالی کمال تشکر و قدردانی رو داریم.

منابع

طاهرخانی, م. ۱۳۹۳. بررسی محتوای فنولی اسانس و فلاونوئیدی عصارهٔ شش گونه از جنس *Artemisia* در استان‌های خراسان، سمنان و آذربایجان غربی. اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، (۳) ۲، ۲۵-۱۸.

Apostolidis, E., Kwon, Y.I., Shetty, K., Apostolidis, E., Kwon, Y.I. 2006. Potential of cranberry-based herbal synergies for diabetes and hypertension management. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. 15(3): 433-441.

Bhakuni, R.S. Jain, D.C. Sharma, R.P., Kumar, S. 2001. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. Current Science. 80: 35-48.

Bilia, A.R. Santomauro, F., Sacco, C. Bergonzi, M.C., Donato, R. 2014. Essential oil of *Artemisia annua* L.: An extraordinary component with numerous antimicrobial properties. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2014: 1-7.

Ferreira, J.F.S., Luthria, D.L., Sasaki, T., Heyerick, A. 2010. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. Molecules. 15(1): 3135-3170.

Hatami, T., Emami, S.A., Miraghaee, S., Mojarrab, M. 2014. Total phenolic contents and antioxidant activities of different extracts and fractions from the aerial parts of *Artemisia biennis* Willd. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 13: 551-558.

Krygier, K., Sosulski, F., Hogge, L. 1982. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. extraction and purification procedure. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 30: 330-334.

Lam, T. B. T., Kadoya, K., Iiyama, K. 2001. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the β-position, in grass cell walls. Phytochemistry. 57(6): 987-992.

Shetty, K., and Wahlqvist, M. 2004. A model for the role of the proline-linked pentose-phosphate pathway in phenolic phytochemical bio-synthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. 13(1): 1–24.

Verpoorte, R., Contin, A., and Memelink, J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochemistry reviews. 1(1): 13-25.

Investigation of phenolic acids and antioxidant activity of Artemisia annua

[*]Saeed Mollaei[1], Poopak Farnia[1], Jalaledin Ghanavi[2]

[1] Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
[2] Mycobacteriology Research Centre (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Artemisia is one of the largest and most widely distributed genera of the family Astraceae (Compositae). It consist over 500 diverse species distributed mainly in Europe, Asia and North America. In this study, *A. annua* was collected from North-West of Iran. The aim of this research was to investigate the phenolic acids and antioxidant properties of *A. annua*. Free, esterified and bound phenolic acids were extracted using ultrasonic, and separated and identified using HPLC. The total phenolic and flavonoid content of the samples were also determined using Folin–Ciocâlteu colorimetric method and aluminum chloride, respectively. Also, the antioxidant activity of the samples was evaluated using the DPPH method. Based on the obtained results, bound phenolic acids had the highest efficiency. Measurement of total phenol and flavonoid contents showed that the phenolic extract of free acids had the highest amount of phenolic and flavonoid compounds. Also, free phenolic acids extract had better antioxidant properties than other extracts. HPLC results showed that among the investigated phenolic acids, rosmarinic acid, meta-coumaric acid and caffeic acid were the main compounds found in the extract of free phenolic acids. The extract of esterified Phenolic acid showed that meta-coumaric acid followed by caffeic acid are the main compounds. The most abundant phenolic acid in the extract of bound phenolic acids was related to meta-coumaric acid.

Keywords: *Artemisia annua*, Extract, Flavonoid, Phenol

[*] e-mail: j.ghanavi@sbmu.ac.ir

بررسی برخی از ترکیبات فیتوشیمیایی موجود دراندام های مختلف گیاه دارویی پنیرک قرمز *Malva sylvestris* L.

محمد اسماعیل پور[۱] *، نازنین اوجی[۲]، عسکر غنی[۳]، عبدالکریم زارعی[۱]، محمود اسماعیل پور حیدرآبادی[۴]

[۱] گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم

[۲] دانش آموخته کارشناسی گیاهان دارویی و معطر، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم

[۳] گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم

[۴] دانش آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

چکیده

پنیرک قرمز (*Malva sylvestris* L.) به علت داشتن ترکیبات فیتوشیمیایی متنوع، خواص دارویی فروانی از جمله خاصیت ضد سرطان، ضد التهاب، خلط آور، ضد میکروبی و ضد زخم دارد. هدف از انجام این پژوهش مقایسه میزان ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در اندام های مختلف رویشی و زایشی پنیرک قرمز در شرایط آب و هوایی جهرم بود. به این منظور بذر های پنیرک قرمز در آبان ماه ۱۳۹۶ در مزرعه پردیس دانشگاه جهرم طی آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار کشت شدند و بخش های مختلف گیاه در فروردین ۱۳۹۷ برداشت شدند. ترکیبات فیتوشیمیایی مختلف شامل میزان فنول کل، تانن، موسیلاژ و فعالیت آنتی اکسیدانی از بخش‌های مختلف گیاه شامل گل، برگ، میوه و ریشه اندازه گیری شدند. نتایج نشان داد که در بین بخش های مورد مطالعه، گل ها دارای بیشترین میزان فنول و تانن و فعالیت آنتی اکسیدانی بودند و همبستگی مثبت و معنی داری بین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی و مقدار این ترکیبات وجود داشت. هم چنین برگ های پنیرک حاوی بیشترین میزان موسیلاژ و ریشه و میوه دارای کمترین میزان موسیلاژ بودند. با توجه به اینکه گل ها و برگ های پنیرک قرمز خاصیت آنتی اکسیدانی و محتوای موسیلاژی بالایی دارند، این بخش‌ها سودمندترین قسمت های گیاه بوده و می‌توانند بعنوان غذا/دارو استفاده شوند.

واژگان کلیدی : آنتی اکسیدان، ترکیبات فیتوشیمیایی، فنول کل، موسیلاژ.

* ایمیل نویسنده مسئول

E-mail: esmailpour@jahromu.ac.ir; msp1362@yahoo.com.

۱. مقدمه

جنس پنیرک در ایران ۱۰ گونه دارد که اغلب بصورت علف‌هرز در اراضی کشاورزی دیده می شوند. مشهورترین گونه از نظر دارویی، پنیرک قرمز (*Malva sylvestris* L.) است که گیاهی دو یا چند ساله و به ارتفاع تا ۱۲۰ سانتی‌متر و دارای برگهای کرکدار، قلبی شکل و با ۵ تا ۷ لوب می باشد. گلبرگهای جوان آن به رنگ قرمز مایل به بنفش و در حالت خشک شده بنفش تیره هستند (مظفریان، ۱۳۹۴؛ Batiha et al., 2022). این گیاه خواص درمانی متنوعی از جمله خاصیت ضد سرطانی، ضد التهاب، خلط آور، ضد میکروبی، بهبود دهنده زخم و ملین دارد و در تهیه پماد کالاندنیکس، شربت ضد سرفه زوفا و همچنین کرم مرطوب کننده گیاهی مالوا نیز از گیاه پنیرک استفاده می شود. ترکیبات شیمیایی زیادی از جمله فنول ها، فلاونوئیدها، موسیلاژ ها، انواع پلی ساکاریدها، ترکیبات آنتی اکسیدانی قوی، ترکیب ضد میکروبی مالوون[1]، ویتامین‌های C و E، تانن، ترپنوئیدها، آنتوسیانین‌ها و کومارین‌ها در پنیرک قرمز یافت شده اند (Mousavi et al., 2021). در این زمینه Barros et al., (2010) بخش های هوایی پنیرک (شامل برگ های جوان، گل ها، ساقه های گلدار و میوه های نابالغ) را از عرصه پارک های طبیعی در شمال شرقی پرتغال جمع آوری و میزان ترکیبات مختلف در این اندام ها را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق بیشترین میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها و توکوفرول کل در برگ‌ها وجود داشت و بیشترین میزان آسکوربیک اسید در گل ها یافت شد. کمترین میزان فنول ها و فلاونوئیدها در گل‌ها مشاهده شد. میوه های نارس بیشترین میزان چربی و ارزش انرژی‌زایی[2] (۳۹۳ کیلوکالری در ۱۰۰ گرم وزن خشک) داشتند.

موسیلاژ ها خاصیت ضد انعقادی و فرو نشاندن سرفه دارند و یکی از ترکیبات اصلی مسئول اثرات درمانی پنیرک هستند. موسیلاژ ها پلی ساکارید هایی با وزن مولکولی متوسط هستند که از به هم پیوستن ۱۰ تا ۲۵ نوع انواع قندها شامل گالاکتورونیک اسید، فروکتوز، گلوکز، گالاکتوز، تری هالوز، ساکارز و رامنوز، رافینوز، زایلوز و غیره به وجود آمده اند (Barros et al., 2010). موسیلاژها در کانال ها، حفره‌ها و سلول‌های اپیدرمی تخصصی ذخیره می شوند. Pakravan et al., (2007) با مقایسه میزان موسیلاژ در اندام های مختلف پنیرک (*Malva neglecta*) و ختمی (*Altheae officinalis*) گزارش دادند که موسیلاژ در برگ و گلبرگ هر دو گونه گیاهی وجود دارد و میزان موسیلاژ در برگ ها و گلبرگ های پنیرک بیشتر از ختمی است. با توجه به خواص دارویی فراوان و مصارف متعدد پنیرک در طب سنتی و مدرن، هدف از پژوهش حاضر مقایسه ی اندام های مختلف رویشی و زایشی گیاه دارویی پنیرک از نظر میزان تجمع ترکیبات فیتوشیمیایی مختلف در شرایط اقلیمی جهرم بود.

۲. مواد و روش‌ها

بذر های پنیرک قرمز (*Malva sylvestris*) در آزمایشی به صورت طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه جهرم (28°49′73″N, 53°56′03″E) در آبان ماه سال ۱۳۹۶ کشت شدند. قبل از کشت به هر کرت معادل ۱۵ تن در هکتار کود دامی اضاف شد و در طول دوره رشد گیاه، مراقبت های زراعی لازم شامل وجین دستی علف‌های هرز و

[1]- Malvon phytoalexin
[2]- Energetic value

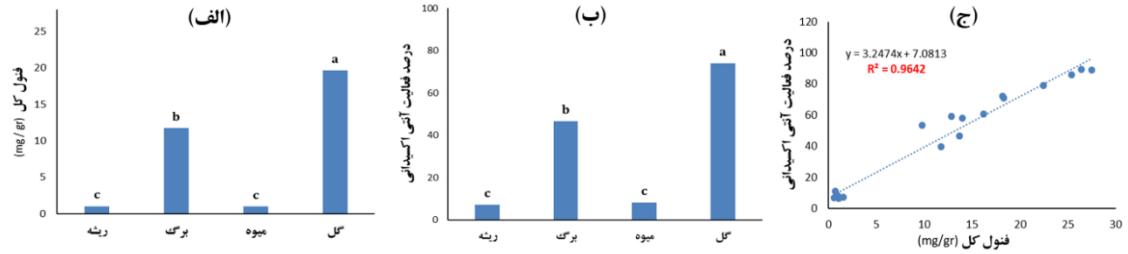
آبیاری انجام شد. بعد از رشد کامل گیاه و زمانی که به ارتفاع حدود یک متر رسید، بخش‌های مختلف پنیرک شامل گل، برگ، میوه و ریشه در فروردین ۱۳۹۷ جمع آوری و در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. برای عصاره گیری، ۰/۵ گرم از نمونه پودر شده با ۵۰۰۰ میکرولیتر متانول ۷۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت روی دستگاه شیکر قرار داده و بعد از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدن، محلول رو شناور جدا شد.

برای اندازه گیری میزان فنول کل، بطور خلاصه به ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره‌ی هرکدام از نمونه ها ۲۰۰ میکرو لیتر فولین ۵۰ درصد و ۲۰۰۰ میکرو لیتر آب مقطر اضافه شد. بعد از گذشت سه دقیقه ۱۰۰۰ میکرو لیتر سدیم کربنات ۲۰ درصد اضافه شد. سپس نمونه ها به مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی و شرایط اتاق نگهداری شده و بعد عدد جذب آن ها در دستگاه اسپکتروفوتومتر با طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. برای اندازه‌گیری میزان تانن ابتدا به ۰/۵ میلی لیتر از عصاره (برای گل ها، عصاره رقیق شده و برای برگ، میوه و ریشه عصاره اصلی)، سه میلی‌لیتر معرف وانیلین چهار درصد اضاف کرده و پس از افزودن ۱/۵ میلی لیتر HCl نمونه هابه مدت ۱۵ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد و در نهایت میزان جذب در دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۰۰ نانومتر قرائت شد. برای اندازه گیری میزان فعالیت آنتی اکسیدانی ابتدا ۱۰۰ میکرو لیتر از عصاره اصلی درون لوله فالکون ریخته و پنج میلی لیتر محلول DPPH به آن اضاف کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. در نهایت میزان جذب نمونه ها در دستگاه اسپکتروفوتومتر با طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. برای اندازه گیری درصد موسیلاژ به ۵۰ گرم نمونه پودر شده‌ی هر اندام، ۲۰۰ میلی لیتر هگزان اضاف گردید و به مدت یک ساعت توسط شیکر مخلوط شدند. سپس با عبور دادن مخلوط از کاغذ صافی، حلال هگزان از مواد گیاهی جدا شد. پس از آن نمونه های گیاهی به نسبت پنج درصد حجمی با آب دیونیزه مخلوط شدند و به مدت دو ساعت در حمام آب ۹۰ درجه قرار گرفتند. مخلوط های به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) شدند. سپس بخش روشناور جداسازی و نگهداری شد. در ادامه به بخش آبی جدا شده، محلول ۰/۱ درصد استیک اسید افزوده شد و نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس به محلول های جدا شده به حجم دو برابر الکل اتیلیک ۹۶ درصد اضافه گردید و موسیلاژ به صورت رسوب از فاز مایع جدا شد. پس از تبخیر آب و الکل در دمای محیط، وزن موسیلاژ به دست آمده ثبت گردید و به صورت درصد وزنی از اندام خشک پنیرک گزارش گردید. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار JMP انجام شد و برای مقایسه میانگین از آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد استفاده شد و نمودارها در نرم افزار Excel رسم شدند.

۳. نتایج

براساس نتایج بدست آمده در بین اندام های مورد مطالعه، گل ها دارای بیشترین (۱۹/۷ میلی‌گرم برگرم وزن خشک) و میوه و ریشه کمترین میزان فنول کل را دارا بودند (شکل ۱ الف). در بین اندام های مورد مطالعه فقط گل دارای تانن بود (۷۱/۷ میلی‌گرم بر گرم) و در سایر اندام ها تانن به میزان قابل اندازه گیری مشاهده نشد. فعالیت آنتی اکسیدانی در گل ها بیشتر از سایر اندام ها بود و میوه و ریشه فعالیت آنتی اکسیدانی بسیار کمی داشتند (شکل ۱ ب). همبستگی مثبت و معنی داری بین میزان فنول کل و درصد فعالیت آنتی اکسیدانی مشاهده شد (شکل ۱ ج). بیشترین درصد موسیلاژ در برگ ها مشاهده شد بطوری که بر

اساس وزن خشک، بیش از ۱۲ درصد موسیلاژ داشتند. پس از برگ، گل بیشترین میزان موسیلاژ (۶/۳ درصد) داشت. ریشه حاوی کمترین میزان موسیلاژ بود.



شکل ۱: (الف) میزان فنول کل و (ب) درصد فعالیت آنتی اکسیدانی اندام های مختلف و (ج) همبستگی بین این دو صفت

٤. بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، گل ها بیشترین میزان فنول کل را دارا بودند در حالی که Barros et al., (2010) با مقایسه میزان فنول در اندام‌های مختلف پنیرک قرمز در کشور پرتغال گزارش دادند، بیشترین میزان فنول کل در برگ های آن وجود دارد که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی ندارد. علت نتایج متفاوت می تواند تفاوت در اقلیم‌های مناطق مورد آزمایش و یا مرحله‌ی رشدی متفاوت که نمونه گیری انجام شده است باشد. همچنین نامبردگان پنیرک را از عرصه‌های طبیعی جمع آوری کرده اند در حالی که در تحقیق حاضر پنیرک در مزرعه کشت شده و در معرض تنش‌های محیطی و کمبود عناصر معدنی نبوده است.

در پژوهش حاضر، گل های پنیرک محتوی مقدار قابل توجهی تانن بودند و سایر اندام ها فاقد تانن بودند. شکرالهی و حشمتی (۱۳۹۵) گزارش دادند که تمام اندام‌های پنیرک محتوی تانن هستند و گل‌های پنیرک مقادیر کمی تانن دارند که با نتایج پژوهش حاضر مغایرت دارد. گزارش شده است که گل‌های پنیرک قرمز میزان فنول کل و فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به برگ های پنیرک دارد (Mousavi et al., 2021). در پژوهش حاضر نیز در بین بخش های مورد مطالعه گیاه، گل‌ها دارای بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی بودند. بین درصد فعالیت آنتی اکسیدانی با میزان فنول ها و تانن همبستگی مثبت و معنی داری وجود داشت و بیشترین همبستگی با میزان فنول کل مشاهده شد. لذا بخشی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی در پنیرک مربوط به وجود ترکیبات فنولی و تانن می‌باشد.

Pakravan et al., (2007) با مقایسه میزان موسیلاژ در برگ و گلبرگ های پنیرک و ختمی گزارش دادند که میزان موسیلاژ در سلولهای اپیدرمی برگ و گلبرگ‌های پنیرک بیشتر از ختمی بود. لذا در برگ‌ها و گلبرگ های پنیرک مقدار قابل توجهی موسیلاژ ذخیره سازی می شود. در پژوهش حاضر نیز در بین اندام های مورد مطالعه، برگ های پنیرک حاوی بیشترین میزان موسیلاژ بود (۱۲/۲ درصد از وزن خشک) و گل، میوه و ریشه به ترتیب دارای ۶/۳، ۲ و ۰/۷ درصد از وزن خشک خود موسیلاژ بودند. Gasparetto et al., (2012) گزارش دادند میزان تجمع موسیلاژ در اندام های مختلف پنیرک متفاوت است و

بطورکلی درصد موسیلاژ در برگ های پنیرک بین ۶ تا ۷/۲ درصد، در گل‌ها بین ۳/۸ تا ۷/۳ درصد و در ریشه ۷/۵ درصد است که با نتایج پژوهش حاضر تا حدودی همخوانی دارد. از جمله دلایلی که میزان متفاوتی موسیلاژ در بخش های مختلف پنیرک گزارش شده این است که، شرایط محیطی و شرایط رشدی پنیرک می تواند در میزان تولید موسیلاژ در سلول‌های برگ این گیاه اثرگذار باشد و میزان موسیلاژ می تواند در مراحل مختلف رشدی گیاه نیز دچار تغییر شود و در گونه‌های مختلف پنیرک نیز متغیر باشد.

برگ ها و گل‌های پنیرک قرمز پر مصرف ترین بخش های گیاه هستند. در پژوهش حاضر، هرچند میوه های پنیرک قرمز در مقایسه با گل و برگ میزان ترکیبات فنول کل، تانن، موسیلاژ و فعالیت آنتی اکسیدانی کمتری داشت اما گزارش شده است میوه های نارس پنیرک نسبت به برگ ها و گل ها ارزش انرژی زایی بالاتری دارند و لذا میوه نارس پنیرک می تواند در کنار گل و برگ، در غذا و در سالاد مورد مصرف قرار گیرد. با توجه به اینکه ترکیبات فنولی و تانن ها به همراه فلاونوئیدها و اسید آسکوربیک موجود در پنیرک قرمز در درمان اغلب سرطان ها و بهبود زخم ها تأثیر دارند (Mousavi et al., 2021) و از طرف دیگر با توجه به اینکه گل‌ها و برگ‌های پنیرک قرمز خاصیت آنتی اکسیدانی و محتوای موسیلاژی بالایی دارند، این بخش های سودمندترین قسمت های گیاه هستند و می توانند بعنوان غذا/دارو[1] استفاده شوند. با این حال از آنجا که پنیرک قرمز توانایی قابل توجهی در جذب و تجمع فلزات سنگین نظیر سرب، کادمیوم و نیکل در اندام های خود دارد (Mousavi et al., 2021)، لذا این موضوع باید در زمان جمع آوری این گیاه از عرصه هایی که در خاک آنها میزان بالایی از این عناصر وجود دارد، مورد توجه قرار داشته باشد. همچنین لازم است تحقیقات بیشتری برای تعیین اینکه آیا مصرف دراز مدت عصاره پنیرک قرمز، اثرات سمیت بر مصرف کننده دارد یا خیر انجام شود.

منابع

مظفریان، و. ۱۳۹۴. شناخت گیاهان دارویی و معطر ایران. انتشارات فرهنگ معاصر

شکراللهی، ش.، حشمتی، غ. ۱۳۹۵. مروری بر جنب ههای مختلف گیاه دارویی پنیرک (*Malva sylvestris*) و یافته های تحقیقات نوین. مجله دانشکده علوم پزشکی نیشابور. ۴(۱)، ۱-۸

Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C. 2010. Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: a comparative study of the nutraceutical potential and composition. Food and Chemical Toxicology. 48(6): 1466-1472.

Batiha, G.E.S., Tene, S.T., Teibo, J.O., Shaheen, H.M., Oluwatoba, O.S., Teibo, T.K.A., Al-Kuraishy, H.M., Al-Garbee, A.I., Alexiou, A., Papadakis, M. 2022. The phytochemical profiling, pharmacological activities, and safety of *malva sylvestris*: a review. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 1-20.

Gasparetto, J.C., Martins, C.A.F., Hayashi, S.S., Otuky, M.F., Pontarolo, R. 2012. Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: a millennial herbal medicine. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 64(2): 172-189.

[1]- Nutraceutical food

Mousavi, S.M., Hashemi, S.A., Behbudi, G., Mazraedoost, S., Omidifar, N., Gholami, A., Chiang, W.H., Babapoor, A., Pynadathu Rumjit, N. 2021. A review on health benefits of *Malva sylvestris* L. nutritional compounds for metabolites, antioxidants, and anti-inflammatory, anticancer, and antimicrobial applications. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021: 1-13

Pakravan, M., Abedinzadeh, H., Safaeepur, J. 2007. Comparative studies of mucilage cells in different organs in some species of Malva, Althaea and Alcea. Pakistan Journal of Biological Sciences. 10(15): 2603-5.

An Investigation on some phytochemical compounds within different organs of Mallow (*Malva sylvestris* L.)

Mohammad Esmailpour [1*], Nazanin Owji [2], Askar Ghani [3], Abdolkarim Zarei [1], Mahmoud Esmaeilpour-Heidarabadi [4]

[1] Department of Plant Production and Genetic, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran
[2] Department of Medicinal and Aromatic Plants, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran
[3] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran
[4] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Abstract

Containing various amount of different phytochemicals, Mallow (*malva sylvestris*) has many medicinal properties such as anticancer, anti-inflammatory, expectorant, anti-bacterial and anti-ulcerogenic. The purpose of the present research was to compare the amount of phytochemical compounds within different vegetative and reproductive organs of mallow in Jahrom climatic condition. Mallow seeds were cultivated in an experiment based on randomized complete design in Jahrom university research farm in November, 2016. Plant samples including petal, leaf, fruit and root were harvested in April, 2017. Amount of total phenols, tannins, and mucilage as well as antioxidant activity in different harvested plant parts were measured separately. The results showed that flowers had the most amount of phenol, tannins and antioxidant activity. There were positive and significant correlation between antioxidant activity and amount of the foregoing compounds. Also, the mallow leaves contain the most amount of mucilage and the root and fruit had the least amount of mucilage. Since mallow flowers and leaves had considerable mucilage content and antioxidant activity, these parts of the plant are the most profitable parts to be used as nutraceutical food.

Keywords: Antioxidant, Phytochemicals, total phenols, mucilage

[*] e-mail for the corresponding author: esmailpour@jahromu.ac.ir ; msp1362@yahoo.com

بررسی بهترین حلال برای استخراج آلیزارین از گیاه دارویی و صنعتی روناس

علی رضاییان چناری[۱]، کاظم کمالی علی آباد[۲*]، حیدر مفتاحی زاده[۳]، علیرضا احمدیان[۴]، محمدرضا وظیفه شناس[۵]

۱ فارغ التحصیل علوم و مهندسی باغبانی، رشته گیاهان دارویی، دانشگاه علم و هنر، یزد

[۲] دانشیار: مدیریت منابع خشک و بیابانی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه یزد، یزد

[۳] دانشیار: علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان

[۴] دانشجوی کارشناسی ارشد: مدیریت مناطق خشک و بیابانی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه یزد، یزد

[۵] استادیار: تحقیقات علوم زراعی وباغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان یزد، یزد

چکیده

روناس گیاهی از تیره Rubiaceae می‌باشد که ریشه آن در صنایع رنگرزی کاربرد زیادی دارد. بخش مورد استفاده این گیاه، اندام‌های زیرزمینی یعنی ریشه است. ریشه گیاه روناس دارای بلانشیم پوستی گلوکوزی است که تحت تاثیر دیاستازی تجزیه می شود و آلیزارین را ایجاد می کند. در این تحقیق از روناس سه ساله و سه بخش شامل ریشه کامل، پوسته ریشه و مغز ریشه استفاده شد. حلال مورد استفاده اتانول ۷۵، ۸۰ و ۸۵ درصد بود. مقدار مواد رنگزای استخراج شده در هر آزمایش به روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. این تحقیق در قالب یک طرح کاملا تصادفی با سه حلال، از سه قسمت ریشه و در سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که استخراج آلیزارین با سطوح مختلف حلال اتانول در سطح آماری یک درصد معنی‌دار نمی‌باشد. مقدار میانگین آلیزارین در سطوح غلظتی حلال اتانولی که شامل ۷۵، ۸۰ و ۸۵ درصد است، به ترتیب ۰/۸۱، ۰/۹۶ و ۰/۷۳ می باشد و همچنین میانگین غلظت آلیزارین در پوست ریشه به میزان ۰/۸۹، مغز ریشه به میزان ۰/۷۶ و در ریشه کامل به میزان ۰/۸۶ مشاهده شد. بیشترین مقدار رنگیزه از پوست روناس با استفاده از حلال اتانول با غلظت ۸۰درصد و کمترین مقدار رنگیزه از مغز روناس با حلال اتانول ۸۵ درصد به میزان ۰/۸۱ می‌باشد.

واژگان کلیدی: آلیزارین، اتانول، روناس.

ایمیل نویسنده مسئول

E-mail: kkamali@yazd.ac.ir.

۱. مقدمه

گیاه چندساله روناس با نام علمی *Rubia tinctorum* ، گیاهی عمدتاً صنعتی است که در صنعت رنگرزی از گذشته مورد استفاده قرار می گرفته است. افزون بر این، این گیاه دارای ویژگی‌های دارویی (ضد سرطان و نقرس) است. موطن اولیه این گیاه مناطق مدیترانهای بوده که آن را برای مصارف صنعتی و دارویی در سطح وسیع کشت می‌کردند. ایران از لحاظ آب و هوا، موقعیت جغرافیایی و زمینه رشد گیاهان دارویی یکی از بهترین مناطق جهان محسوب می‌شود و در گذشته هم منابع تولید و هم یکی از بازارهای مصرف گیاهان دارویی بوده است. گیاهان دارویی از زمان‌های قدیم به عنوان یک منبعی از داروها استفاده می شود و در حال حاضر در سطح جهان به سرعت جانشین بسیاری از داروهای شیمیایی می‌شوند و از طرف دیگر صادرات این گیاهان نیز می‌تواند درآمد ارزی سرشاری برای کشور باشد (خلج و همکاران۱۳۹۷). گیاهان دارویی گیاهانی هستند که یک یا برخی از اندام‌های آنها حاوی ماده موثره با خاصیت دارویی است. این ماده کمتر از ۱٪ از وزن خشک گیاه را تشکیل داده و دارای خواص دارویی موثر بر موجودات زنده است. همچنین کاشت، داشت، برداشت این گیاهان به منظور استفاده از ماده موثره آن‌ها انجام می‌شود. ممکن است اندام خاصی چون ریشه، ساقه، برگ‌های گل حاوی مواد موثره مورد نظر باشد. از این رو نمی‌توان تمام اندام‌های گیاه مربوط را منبع ماده دارویی مورد نظر دانست. معمولاً اندام‌های مورد نظر به صورت تازه استفاده نمی‌شود یعنی اندام‌های موردنظر باید تحت تاثیر عملیات خاصی چون تمیز شدن، هوا خوردن، خشک گردیدن، پالودگی و غیره قرار بگیرند (امید بیگی،۱۳۹۳).

یکی از ویژگی‌های اساسی و طبیعی گیاهان شوری و خشکی پسند، دوام و بقای آن‌ها در خاک‌های شور و شرایط خشکی است روناس نیز از جمله این گیاهان است که در اراضی شور و خشک که تولید سایر محصولات زراعی با کاهش عملکرد همراه بوده و یا محصول آنها غیر اقتصادی می‌باشد، قادر خواهد بود افزون بر احیای اراضی، از عملکرد خوبی نیز برخوردار باشد. اهمیت بالای مواد موثره این گیاه بویژه ماده رنگی ریشه روناس که آلیزارین نام دارد یک ترکیب ۱و۲ دی هیدروکسی آنتراکینون می باشد که چنانچه استخراج شود و یا پودر عصاره روناس که بخش عمده آن نیز آلیزارین است حاصل شود آن‌گاه مشابه رنگ شیمیایی عمل کرده و کاملاً در آب حل می شود و باقی مانده موادگیاهی سلولزی که در رنگرزی سنتی با چسبیدن به نخ مشکل ساز شده و جداسازی آن‌ها مشکل می باشد را نخواهد داشت. هرچند متاسفانه امروزه به علت واردات رنگ‌های شیمیایی، رنگ‌های طبیعی مذکور از اهمیت کمتری در صنعت رنگرزی برخوردار شده اند (کمالی وهمکاران، ۱۳۹۸).

هدف از انجام این تحقیق تعیین بهترین حلال برای استخراج ماده رنگزای آلیزارین از ریشه گیاه دارویی و صنعتی روناس و همچنین تعیین بالاترین مقدار آلیزارین از قسمت‌های مختلف ریشه این گیاه می باشد. انتظار می‌رود که نتیجه این تحقیق در اختیار صنعت دارویی، رنگرزی و آرایشی به ویژه شرکت‌های فعال بخش خصوصی قرار گیرد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. منطقه مورد مطالعه

نمونه‌برداری از ریشه‌های چند ساله از منطقه احمدآباد در پنج کیلومتری شمال غرب اردکان انجام شد به این صورت که ریشه‌های سه ساله بصورت مرطوب برداشت شدند در ضمن از خاک باغ جهت آزمایش خاک در چند قسمت زمین چاله‌های ایجاد کرده و نمونه خاک برداشته و به آزمایشگاه فرستاده شد. همچنین از آب چاه که برای آبیاری نمونه برداشته و به آزمایشگاه فرستاده شد. لازم به ذکر است که نمونه برداری خاک طبق اصول آزمایشگاهی از ۳ عمق ۰ و ۴۰، ۴۰ و ۸۰، ۸۰ و ۱۲۰ سانتی‌متر

از کناره دیوار تراشیده شد. از سه نمونه خاک در گودال‌ها ترکیب و یک نمونه برداشته شد. نمونه‌های ریشه روناس سه ساله به مدت هفت روز در حیاط منزل آفتاب‌دهی شد تا کاملاً خشک شود. بعداز خشک شدن ریشه‌ها، آن‌ها را شستشو داده تا عاری از خاک و آلودگی شوند.

۲.۲. روش تحقیق

به منظور بررسی مقدار آلیزارین موجود در ریشه روناس آزمایش فاکتوریل بر پایهٔ طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تیمار پوست ریشه، مغز ریشه، ریشه کامل (پوست و مغز) روناس و در سه سطح اتانول ۸۵، ۸۰، ۷۵ درصد و سه تکرار در آزمایشگاه دانشگاه علم و هنر یزد انجام گرفت. برای تهیه حلال‌ها الکل ۹۶ درصد (رازی، ایران) تهیه شد. برای حلال ۷۵ درصد ۷۵ میلی لیتر اتانول را در داخل بشر ریخته مابقی را آب مقطر ریخته و به حجم ۹۶ میلی لیتر می‌رسانیم. برای ۸۰ و ۸۵ درصد به همین صورت انجام می‌گیرد.

عصاره گیری با استفاده از دستگاه سوکسله به مدت چهار ساعت انجام گرفت. بعد از جداسازی و تمیز کردن ریشه‌ها آن‌های که نسبتاً ضخیم‌تر بودند انتخاب شدند و به وسیله چاقوی اره‌ای پوست گیری شد و به سه نمونه پوسته، مغز و ریشه کامل که ریشه طبیعی بود تقسیم گردید، نمونه پوست روی ریشه بوسیله آسیاب خانگی پودر شد. دو نمونه دیگر یعنی ریشه کامل و مغز ریشه که خیلی محکم بود با هاون دستی خرد شد و سپس نمونه‌ها را بوسیله آسیاب پودر شدند. بالن‌های ۲۵۰ سی‌سی انتخاب شد و به وسیله گیره در داخل هیتر گذاشته و هرکدام از نمونه‌ها به طور جداگانه ۲۵ گرم وزن و درون صافی که از جوراب استفاده شد قرار داده و در داخل سوکسله گذاشته و به مدت ۱۲ ساعت در داخل سوکسله حلال روی نمونه ریخته شد و صبح روز بعد هیترها روشن و روی دمای ۱۵۰ درجه تنظیم گردید. هنگامی که آب به جوش آمد دما را روی ۱۰۰ درجه ثابت نگه داشته حدوداً ۱۲ بار حلال از روی نمونه رد شده و در داخل گالن ریخته شد، این ۱۲ بار حدودا ۴ ساعت طول کشید. عصاره گیری محلول‌های مورد استفاده اتانول ۸۵٪، ۸۰٪ و ۷۵٪ می‌باشد. قابل ذکر است که داخل هر بالن نیز ۱۵ عدد سنگ جوش ریخته شد تا بالن در دمای بالا بصورت یکسان جوش بخورد.

۳. نتایج

با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس استخراج آلیزارین از ریشه روناس با استفاده از حلال‌های ۸۵٪، و۸۰٪، ۷۵٪ در سطح یک درصد معنی دار نمی باشد(جدول ۱).

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس استخراج آلیزارین از ریشه روناس

منابع تغییرات	درجه ازادی	میانگین مربعات
نوع روناس	۲	ns ۰/۴۱
غلظت حلال	۲	۰/۱۲
خطا	۱۸	۰/۱۵
ضریب تغییرات	۱۵/۸	

بیشترین مقدار رنگیزه از پوست ریشه روناس با غلظت ۸۰ درصد و کمترین مقدار رنگیزه از مغز ریشه روناس با غلظت ۸۵ درصد با اعداد ۱/۱۳ و ۰/۸۱ می‌باشد که با تحقیق(شجری و همکاران ۱۳۸۰) برای تعیین میزان درصد رنگیزه‌های آنتروکوئینی با استفاده از روش اسپکتوفتومتری و HPLC انجام گرفت اندازه گیری‌ها بیشترین و کمترین مقدار این رنگیزه‌ها به ترتیب در بخش پوستی ریشه گیاه دوساله و بخش بالایی ساقه‌ها و برگ‌ها نشان داده شد مطابقت دارد(شکل شماره۱).



شکل شماره ۱- مقادیر آلیزالین در درصدهای مختلف اتانول

٤. بحث و نتیجه‌گیری

گیاهان دارویی حاوی ترکیبات متعددی موثره هستند که، ساختارهای متفاوتی از نظر شیمیایی دارند. استخراج این ترکیبات به عوامل متعددی بستگی دارد که مهمترین آنها حلال و روش استخراج می‌باشند. انتخاب حلال و روش استخراج بستگی به قسمت‌های مختلف اندام یک گیاه و نیز مواد متشکله آن دارد (مهدی پور و همکاران، ۱۳۸۸). در مطالعهٔ حاضر استخراج آلیزارین با استفاده از غلظت‌های مختلف حلال اتانول مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در سه سطح غلظت اتانول و سه قسمت ریشه روناس در سطح یک درصد معنی دار نمی باشد گرچه از لحاظ عددی پوست ریشه روناس در غلطت اتانول ٪۸۰ عملکرد بهتری دارد. لیکن طبق جدول تجزیه واریانس (جدول۱) بین تیمارها اختلاف معنی‌دار و در نتیجه قسمت های مختلف ریشه تفاوت چندانی با هم نداشته و همه دارای اهمیت هستند.

منابع

- ✓ امید بیگی، ر. ۱۳۹۳. تولیدوفراوری گیاهان دارویی. انتشارات آستان قدس رضوی.
- ✓ خلج، ح. لبافی حسین آبادی، م. ر. حسن آبادی، ط. شقاقی، ج. حاجی آقایی، ر. ۱۳۹۷. مروری بر خصوصیات گیاهشناسی، اکولوژیکی، زراعی و فارماکولوژیکی گیاه دارویی رازیانه. فصلنامه علمی پژوهشی گیاهان دارویی.
- ✓ زرگری، ع. ۱۳۷۶. گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران

- ✓ شجری، ا. ۱۳۸۰. بررسی کمی و کیفی آنتراکوئیونهای گیاه روناس در گیاه کامل ومحیط کشت بافت. دانشگاه تهران.
- ✓ کمالی، ک. میراب زاده، م. زمانی، ا. ۱۳۹۸. روناس طلای سرخ. انتشارات سید علی زاده.
- ✓ محمدی فر، ش. ۱۳۹۲. تار یخچه کشت گیاه روناس و کاربرد آن برا ی رنگرزی در ایران. انتشارات میراث علمی اسلام وایران.

An investigation of the best solvent for extracting Alizarin from Madder medicinal and industrial plant

, Haidar Meftahizadah[3], Ali Reza [*]Ali Rezaiyan Chenari[1], Kazem Kamali Aliabad[2] Ahmadian[4], Mohammad Reza Vazifashenas[5]

Graduated student of master science[1]: Department of engineering and science of horticultural, medicinal plants branch, Science and Art University, Yazd, Iran
Associate Professor: [2] Department of natural resources, Yazd University, Yazd, Iran
Associate Professor: [3] Department of natural resources, Ardakan University, Ardakan, Iran
Master student of agricultural biotechnology: [4] Department of natural resources, Yazd University, Yazd, Iran
Associate Professor: [5] Yazd Agricultural and Natural Resources Research and Education Centre, Yazd, Iran

Abstract

Madder is a plant from the Rubiaceae family whose root is widely used in dyeing industries. The part of used by this plant is the underground organs, i.e. the roots. The root of the Madder plant has glucose dermal blanching that decomposes under the influence of diastasis and creates alizarin. In this research, three years old Madder and three parts including whole root, root shell and root core were used. The solvent used was 75%, 80% and 85% of ethanol. The amount of extracted pigments in each experiment was determined by spectrophotometric method. This research was conducted in the form of a completely randomized design CRD with three solvents, from three parts of the root and in three replications. The results showed that alizarin extraction with different levels of ethanol solvent is not statistically significant at the 1% level. The average amount of alizarin in the concentration levels of ethanol solvent which includes 75, 80 and 85% is 0.81, 0.96 and 0.73, respectively, and also the average concentration of alizarin in the root bark is 0.89, the pith of the root is 0.76 and 0.86 was observed in the whole root. The highest amount of pigment from Madder skin using 80% ethanol solvent and the lowest amount of pigment from Madder brain with 85% ethanol solvent is 0.81.

Keywords: Alizarin, Ethanol, Madder.

[*] E-mail: kkamali@yazd.ac.ir.

بررسی تأثیر موادّ تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر نرخ کالزایی گیاه خارمریم *Silybum marianum*

ریحانه بهرامی تتماج[۱]، علی گنجعلی، *[۲] پروانه ابریشم چی [3]

[۱]کارشناسی ارشد، فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

[۲]دانشیار، فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

[3]دانشیار، فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

خارمریم (*Silybum marianum* L.Gaernt) گیاهی دولپّه متعلّق به خانواده Asteraceae از گیاهان دارویی مهم در درمان بسیاری از بیماری‌های کبدی، هپاتیت، دیابت می‌باشد که بیش از هزار سال است در طبّ‌سنّتی استفاده می‌شود. بذر خارمریم دارای خاصیت دارویی و منبع غنی از ریزمغذّی‌ها و ویتامین‌ها می‌باشد. این پژوهش با هدف ارزیابی اثرهورمون‌های گیاهی Kin و 2،4_D بر کالزایی خارمریم انجام شد. ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف موادّ تنظیم کننده رشد شامل (۰، ۰/۷۵، ۱/۵، ۲/۲۵، ۳ میلی گرم در لیتر) کشت شد. نتایج نشان داد که بیشترین درصد کالزایی به کالوس‌های تیمار شده با غلظت ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر Kin تعلّق داشت. غلظت پیشنهادی Kin می تواند به عنوان یک محرّک توانمند در القای کالوس زایی درخارمریم معرّفی گردد.

واژگان کلیدی: تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ،کشت بافت، خارمریم، سیلی مارین

* Email:ganjali@um.ac.ir

۱.مقدّمه

خارمریم (*Silybum marianum*) گیاهی دوساله، بومی مناطق مدیترانه‌ای، شمال افریقا و خاورمیانه است که به طور خودرو رشد می‌کند. مادّه فعّال خارمریم سیلی‌مارین است که از فلاونولیگنان‌ها شامل سیلیبین A و B، ایزوسیلیبین A و B، سیلیدیانین، سیلی‌کریستین و فلاونوئید تاکسی‌فولین تشکیل شده است. دانه‌های گیاه هم‌چنین حاوی فلاونولیگنان‌های دیگری مانند: بتائین، اپیژنین، سیلیبون، پروتئین‌ها، روغن ثابت و اسیدهای چرب آزاد می‌باشند (Abdel Azim *et al*., 2019). بررسی‌ها نشان می‌دهد که تولید سیلی‌مارین از طریق سیستم‌های مختلف بیوتکنولوژیک در مقایسه با روش‌های سنّتی تولید در مزرعه پایین است بنابراین افزایش سنتز این ترکیب در کشت‌های *invitro* به تلاش بیشتری نیازدارد. سیلی‌مارین و سایر ترکیبات فعّال خارمریم معمولاً از دانه‌های خشک گیاه استخراج می‌شوند که اغلب ماه‌ها تا حصول آن زمان لازم است. کشت *invitro* به عنوان یک روش جایگزین برای تولید سیلی‌مارین در این ارتباط مطرح است (Gopi *et al*., 2006). روش‌های نوین سنتز سیلی‌مارین نظیر کشت سلّول، تولید کالوس و ریشه‌های مویین تولید مداوم و مستقل از فصل این ترکیب را در مقیاس بالا توسّط سیستم بیوراکتور ممکن ساخته است.

در کشت سلّول، استفاده از تازن‌ها یک روش مهم برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانوی گیاهی است. ترکیبات تنظیم کننده رشد می‌توانند پاسخ‌های دفاعی یا استرسی را تحریک کنند و ژن‌ها و آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی را فعّال و در نهایت تولید متابولیت‌های ثانوی گیاهی را بهبود بخشند (Rahimi Ashtiani *et al*, 2010). بررسی‌ها نشان داده است اتّصال برخی ترکیبات فوق به گیرنده سبب افزایش فعّالیت لیپواکسیژناژی و تولید جاسمونات شده که نتیجه آن افزایش تولید متابولیت ثانوی، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها می‌باشد (Rahimi Ashtiani *et al*., 2010). تحقیق حاضر با هدف امکان بهبود کالزایی گیاه خارمریم با استفاده از ترکیبات تنظیم کننده رشد انجام شده است.

۲.مواد و روش‌ها

۱.۲.روش تحقیق

بذرهای خارمریم جمعیّت گرگان پس از جمع آوری در گلدان کشت داده شد. ریزنمونه های برگی جدا شده از گیاه پس از ضدّعفونی، در محیط کشت MS حاوی غلظت های مختلف هورمون kin (۲/۲۵ و ۱/۵، ۰/۷۵، ۰ میلی گرم در لیتر) و 2،4_D (۳و ۲/۲۵، ۱/۵، ۰/۷۵، ۰ میلی گرم در لیتر) در pH =۵/۷ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. کالوس زایی در ریزنمونه های برگی تحت تأثیر تیمارهای مختلف پس از چهار هفته رشد، مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه بهترین ترکیب تیماری از حیث کالوس زایی و مقدار کمّی آن تعیین شد. این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار اجرا شد و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.

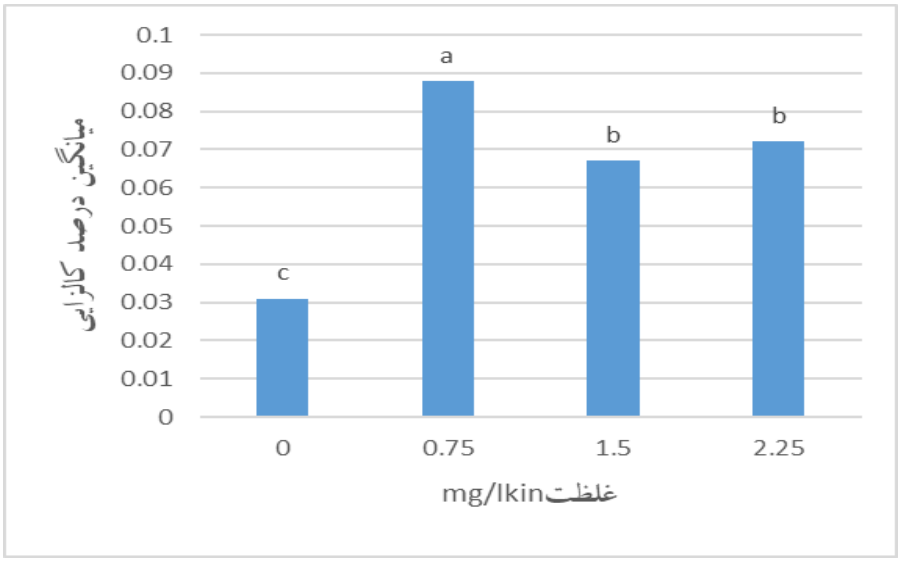
۳. نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مشاهدات درصد کالزایی ریزنمونه برگ گیاه خارمریم نشان داد که کاربرد موادّ تنظیم کننده رشد گیاهی تأثیر معنی‌داری بر درصد کالزایی ریز نمونه ها دارد. نتایج مقایسه میانگین مشاهدات حاکی از آن است که غلظت ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر هورمون Kin بیشترین تأثیر را در افزایش وزن خشک کالوس داشته است و تفاوت آن با شاهد و غلظت ۲/۲۵ معنی دار است . کاربرد غلظت های ۱/۵و ۲/۲۵ میلی گرم در لیتر هورمون Kin از حیث نرخ کالوس زایی تفاوت معنی داری نداشتند.

جدول۱:تجزیه واریانس درصد کالزایی، در تیمار هورمونی حاصل از کشت درون شیشه ریزنمونه برگ گیاه خارمریم

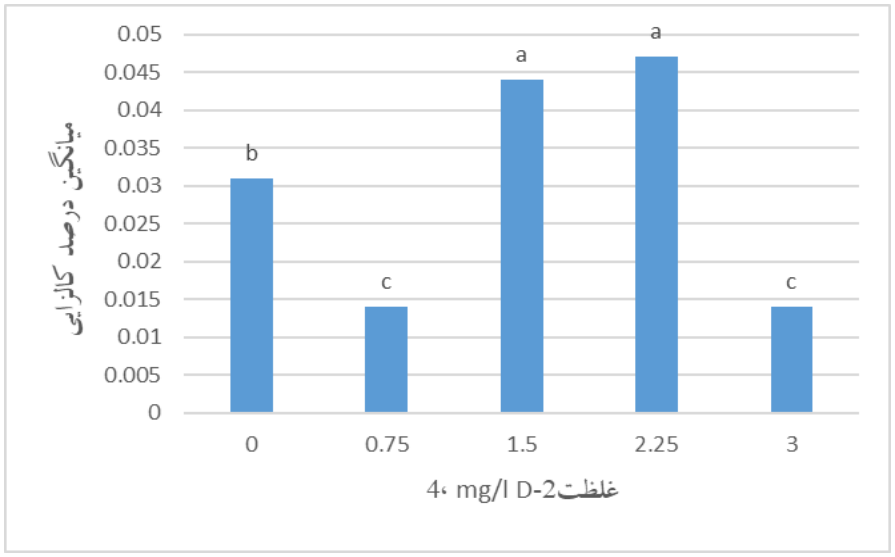
منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربّعات	میانگین مربّعات	Sig
تیمار	۶	۰/۰۶۱	۰/۰۱۰	**
خطای آزمایشی	۱۴	۰/۰۳	۰/۰۰۲	
کل	۲۰	۰/۰۳۱		

نتایج نشان داد تفاوت معنی‌داری بین درصد کالزایی گیاه خارمریم تیمار حاوی غلظت ۰/۷۵ با هریک از غلظت‌های ۱/۵ , ۲/۲۵ این هورمون وجود دارد.



نمودار۱:تأثیر غلظت های مختلف هورمون Kin در محیط کشت MS بر درصد کالزایی گیاه خارمریم

میانگین هایی که دارای حرف مشترکی می باشند، اختلاف معنی داری ندارند. نتایج نشان داد بین درصد کالزایی گیاه خارمریم تیمار حاوی غلظت۰/۷۵ با هریک از غلظت های ۱/۵ و ۲/۲۵ این هورمون تفاوت معنی داری وجود دارد.



نمودار۲: تأثیر غلظت های مختلف هورمون 2،4_D در محیط کشت MS بر درصد کالزایی گیاه خارمریم

میانگین هایی که دارای حرف مشترکی می باشند، اختلاف معنی داری ندارند. نتایج نشان داد تفاوت معنی داری بین درصد کالزایی گیاه خارمریم تیمار حاوی غلظت .۲/۲۵ با غلظت ۱/۵ وجود ندارد ولی بین تیمار حاوی غلظت ۲/۲۵ با دیگر تیمارها تفاوت معنی داری وجود دارد.

٤. بحث و نتیجه گیری

اکسین ها و سیتوکینین ها تنظیم کننده های رشد گیاهی هستند که در محیط های کشت مورد استفاده قرار می گیرند ولی غلظت بهینه آن ها از یک گونه به گونه ی دیگر متفاوت است (Seraj *et al.*, 1997). در بررسی‌ها بر روی گیاهان مختلف مشخّص شده که ترکیبات فنلی جز متابولیت‌های مهمّ تولیدی در گیاهان محسوب می شوند. نوع و غلظت هورمون‌ها بر فرآیندهای متابولیسمی و تغییر سطح متابولیت‌های ثانوی موجود در کالوس موثر است (Serrano *et al.*, 2007). در این پژوهش تأثیر هورمون ها بر میزان وزن خشک کالوس ارزیابی شد و نتایج نشان داد که بهترین شرایط هورمونی در جهت افزایش وزن خشک کالوس غلظت (۰/۷۵ میلی گرم در لیتر) هورمون kin است.

در این راستا نتایج (Arekhi *et al.*, 2012) نشان داد تأثیر هورمون‌های 2،4_D ، Kin بر تشکیل کالوس در ریزنمونه‌های ریشه، برگ و اندام هوایی، بیشترین درصد کالوس‌زایی (۹۸ درصد) در ریزنمونه‌های ریشه در غلظت‌های (۱ و۱/۵ میلی گرم در لیتر) از هورمون‌های 2،4_D و Kin مشاهده شد. در ادامه پژوهش فیروزی و همکاران (۱۳۸۸) نشان داد ریزنمونه های ریشه و محور زیر لپّه در محیط کشت B5 با غلظت هورمونی (۲ میلی گرم در لیتر) 2،4_D و Kin، کالوس های درشت و شفّافی تولید کردند. هم چنین مطالعات الهاک و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد بهترین محیط کشت با بیشترین رشد کالوس شامل (۲۵ میلی گرم در لیتر) 2،4_D با (۵۰ میلی گرم در لیتر) آسپاراژین، (۰/۵ میلی گرم در لیتر) BAP و (۵۰ میلی گرم درلیتر) اینوزیتول بود. مطالعات بخیت و همکاران (۲۰۱۳)، بیشترین فراوانی القای کالوس بر روی ریزنمونه های برگ کشت شده در محیط MS با (۵ میلی گرم در لیتر) Kin و (۰/۵ میلی گرم در لیتر) IAA بود. پارامترهای رشد کالوس نشان داد محیط کشت حاوی (۵ میلی گرم درلیتر) Kin، (۰/۰۵ میلی گرم در لیتر) IAA و (۰/۱ میلی گرم) GA3 بالاترین وزن تر و ارزش رشد را نشان داد. مطالعات ایری و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد بیشترین درصد کالوس در ریزنمونه ریشه (۱۴/۴ درصد) با (۰/۵ میلی گرم) 2،4_D و (۱ میلی گرم) Kin مشاهده شد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بابت تأمین هزینه‌های پژوهش حاضر از محل اعتبارات متمرکز این معاونت سپاسگزاری می کنند.

منابع

بیرامیزاده، ا.، آرمینیان، ع.، فاضلی، آ.۱۳۹۸. موسسه تحقیقات علوم باغبانی ،گروه زراعت و اصلاح نباتات، شماره ۳،صفحه ۲۳۲_۲۲۱

فیروزی،آ.، محمدی، سیدابوالقاسم.، خسروشاهلی،م .،موافقی، ع. ،۱۳۸۸. ششمین کنگره علوم باغبانی ایران،رشت.

Abdali Mashhadi, A.R., and Fathi, G.H. 2002. Investigation of different levels of density on seed yield andoil in Silybum marianum in Ahvaz conditions. Journal of Pajouhesh and Sazandegi. 15: 28-33.

Arekhi, s., Aghdasi, M., and Khalafi, M. 2012. Optimization of Silybum marianum tissue culture for production of medicinal flavonolignan. Journal of Plant Production.19: 69-88.

Bekheet, S,A., Taha, H.S., and Ahmed, M.M. Gabr. 2013. Protocol for *in vitro* morphogenesis and hairy root cultures of *silybum marianum* L.860_866.

C.Gopi,T.M.vatsala,Afr.j.Biotechnol.5.2006.1215-1219-

Darvishi-Harzevili ,F. 2014 Biotechnological applications of the yeast Yarrowia lipolytica. Springer Briefs in Microbiology 17-74.

Eari, S., Aghdasi, M., Ahmadzadeh, E., and Mianabadi, M. 2017. Influence of Plant Growth Regulators on Callus Induction, Silymarin Production and Antioxidant Activity in *Silybum marianum* L. Gaertn. under Tissue Culture Medium.59_69.

Elhaak, M., Zayed, M., Mattar, M.,Gad, D., and Dietz, K.j. 2016. Optimization of *Silybum marianum* L. callus production and magnifying callus silymarin accumulation by elicitors or precursors. 2277_4688.

Ghafor, y., Mohammad, N. N., and Salh, D. M. 2014. Extraction and Determination of Chemical Ingredients -.from Stems of Silybum Marianum. Journal of Chemistry and Materials Research. 6: 26- 32

Luper S. 1998. A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1. Alternative Medicine Review. .3: 410-421

Rahimi Ashtiani, S., Hasanloo, T., and Bihamta, M. R. 2010. Enhanced production of silymarin by Ag+ elicitor in cell suspension cultures of Silybum marianum. Journal of Pharmaceutical Biology. 48: 708-715

Seraj, Z I, A, Islam, M,O, Faruque, T, Devi and S, Ahmad. 1997; Identification of the regeneration potential of embryo derived calli from various indica rice varieties), Plant Cell, Tiss, Org, Cult, 4(8), 9-13

Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F. 2007. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. Food Research International. 40(1): 15-21

Investigating the effect of plant growth regulators on the calogenesis rate of *Silybum marianum*

Abstract

St. John's wort (*Silybum marianum* L. Gaernt) is a dicotyledonous plant belonging to the Asteraceae family and is an important medicinal plant in the treatment of many liver diseases, hepatitis, and diabetes. It has been used in traditional medicine for more than a thousand years. Sea buckthorn seeds have medicinal properties and are a rich source of micronutrients and vitamins. This research was conducted with the aim of evaluating the effect of plant hormones Kin and 2,4-D on sea buckthorn calogenesis. The leaf explant was cultivated in MS culture medium containing different concentrations of growth regulating substances (0, 0.75, 1.5, 2.25, 3 mg/liter). The results showed that the highest percentage of calligenesis was in the treated calli. was related to the concentration of 0.75 mg/L Kin. The proposed concentration of Kin can be introduced as a powerful stimulus in the induction of callus formation in thistle.

Key words: plant hormones, tissue culture, silybum marianum, silymarin

.

بررسی تأثیر رویشگاه و مراحل مختلف رشد بر تغییرات بازده اسانس و ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه بابونه آناتولی

Anthemis wiedemanniana (Fisch. & C.A. Mey.) Holub

فاطمه نژاد حبیب وش*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

کمیت و کیفیت اسانس گیاهان دارویی به طور بارزی تحت تأثیر فاکتورهای زیستی و اکولوژیک قرار می‌گیرند. هدف از تحقیق حاضر، بررسی تغییرات بازده اسانس و ترکیبات فیتوشیمیایی گونه بابونه آناتولی *Anthemis wiedemanniana* (Fisch. Holub & C.A. Mey.) در رویشگاه‌های مختلف آن در استان آذربایجان غربی در مراحل مختلف رشد بود. پس از برداشت سرشاخه‌های هوایی این گیاه در هر رویشگاه، اسانس گیری با استفاده از دستگاه کلونجر انجام گرفت و تجزیه مواد مؤثره اسانس با استفاده از دستگاه‌های GC و GC/MS انجام شد. داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار تجزیه آماری شدند. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد، بیشترین بازده اسانس سرشاخه‌های گیاهان در سه مرحله رشد رویشی، گلدهی و میوه‌دهی از رویشگاه قیزقلعه میاندوآب با اقلیم نیمه خشک به دست آمد که به ترتیب، ۰/۷۰، ۰/۸۸ و ۰/۷۵ درصد بود. گروه‌بندی جمعیت‌ها توسط تجزیه خوشه‌ای نشان داد که تنوع ژنتیکی و منشأ جغرافیایی می‌تواند دلیل گروه‌بندی جمعیت جنوب استان (قیزقلعه میاندوآب) در گروهی جدا از جمعیت‌های شمال استان (اشنویه، انهر، قوشچی و راژان) باشد. بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، جهت حصول مقدار بیشتر ماده مؤثره اسانس، رویشگاه میاندواب، رویشگاه برتر بود و جهت دستیابی به ترکیبات اسانس با خواص دارویی با ارزش، از قبیل کاریوفیلن اکسید، ادسمول و ایزوآرومادندرن نمونه‌برداری از رویشگاه‌های اشنویه، قوشچی و انهر در مرحله رشد رویشی؛ مقدار بالای فارنزن، رویشگاه میاندوب در مرحله رشد رویشی و مقدار بالای ترکیبات تی- کادینول و بتا سزکوئی فلاندرن، رویشگاه‌های راژان و میاندواب در مرحله میوه دهی توصیه می‌شوند.

واژگان کلیدی: آلفا- فارنزن، ایزوآرومادندرون، جرماکرن دی، سرشاخه هوایی

* e-mail: f.nejadhabibvash@urmia.ac.ir

۱. مقدمه

بابونه آناتولی *Anthemis wiedemanniana* (Fisch. & C.A. Mey.) Holub گونه‌ای علفی، یک‌ساله و کوتاه است، ایستاده با کرک‌های کوتاه و نرم بوده، ساقه کوتاه به ارتفاع ۲۰-۵ سانتی‌متر، سبز، منشعب با شاخه‌های کوتاه می‌باشد. برگ‌ها تقریباً پهن دراز به طول ۳-۱/۵ سانتی‌متر، منقسم و شانه‌ای، ساده و یا دارای دندانه هستند. گل‌ها، مجتمع در کپه‌های شعاعی، با گلچه‌های لوله‌ای تخم‌مرغی- پهن دراز و زرد رنگ هستند. گلچه‌های سفید، دارای نهنج مخروطی و براکته‌های تخم‌مرغی می‌باشند، فندقه‌ها متمایل به قهوه‌ای، بدون کرک و صاف می‌باشند (Ghahreman,1979-1992). گونه‌های جنس *Anthemis* به طور گسترده‌ای در داروسازی و تهیه لوازم آرایشی و بهداشتی به دلیل داشتن ترکیبات اسانس و فلاونوئیدها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Uzel et al., 2004). گونه بابونه آناتولی *Anthemis wiedemanniana* ضد اسپاسم، آرام‌بخش بوده و برای درمان التهاب مجاری ادراری مورد استفاده قرار می‌گیرد (Gönenç et al., 2014). سسکوئی‌ترپن‌ها از ترکیبات اصلی متابولیت‌های ثانویه جنس *Anthemis* هستند. سه نوع سسکوئی‌ترپن در گونه‌های بابونه یافت می‌شوند: لاکتون‌ها، گایانولیدها، جرماکرانولیدها و ادسمانولیدها. ترکیبات اسانس گونه‌های مختلف بابونه در طی چندین مطالعه گزارش شده است. عوامل محیطی می‌توانند شامل عوامل مختلف اکولوژیکی، جغرافیایی، اقلیمی، خاکی و ارتفاع باشند (Kazemizadeh et al., 2010).

در تحقیقی بر روی گیاه مریم نخودی (*Teucrium polium* L.)، ترکیب شیمیایی اسانس این گیاه در ۹ رویشگاه مختلف در استان مازندران مورد بررسی قرار گرفت (Bakhshi Khaniki and Hosseinzadegan, 2014). این محققین به این نتیجه رسیدند که بازده اسانس و ترکیبات اسانس مریم نخودی در رویشگاه‌های مختلف با هم تفاوت دارند. Taviana و همکاران (۲۰۰۲) تنوع ۱۳ توده بابونه آلمانی در مرکز و شمال ایتالیا را برای بررسی خصوصیات اسانس مورد بررسی قرار دادند و بر اساس آن‌ها اکوتیپ‌های مختلف را مقایسه کردند (Taviana et al., 2002). محققین، ترکیبات شیمیایی اسانس جمعیت‌های وحشی *Thymus algeriensis* که بومی شمال آفریقا بودند، مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که مکان رویشی هر جمعیت و مراحل مختلف رشد بر مقدار و ترکیبات اسانس مؤثر است (Zouari et al., 2012). مقدار و ترکیب شیمیایی اسانس جمعیت‌های *Origanum vulgare* L. در منطقه Liguria (ایتالیای شمالی) مورد بررسی قرار گرفته است (D'Antuono et al., 2000). بر اساس مطالعات ما، تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر تأثیر رویشگاه و مراحل مختلف رشد روی بازده اسانس و تنوع ترکیب شیمیایی آن در گیاه بابونه آناتولی *Anthemis wiedemanniana* در ایران و سطح جهان انجام نگرفته است، بنابراین هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر مراحل مختلف رشد و رویشگاه‌های مختلف بر بازده اسانس و ترکیب شیمیایی آن در گیاه بابونه آناتولی می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

تشریح منطقه

این تحقیق در رویشگاه‌های مرتعی (قیزقلعه میاندوآب)، اشنویه، قوشچی، انهر (ارومیه) و راژان در استان آذربایجان غربی انجام گرفت. آمار آب و هواشناسی از نزدیک‌ترین ایستگاه هواشناسی به رویشگاه‌های مورد بررسی با اولویت ایستگاه‌های

سینوپتیک تهیه شد و پارامتر ارتفاع از سطح دریا با استفاده از GPS ثبت گردید. مناطق مورد مطالعه بر اساس روش دومارتن (De Martonne, 1928) دارای اقلیم نیمه خشک، نیمه خشک فراسرد، نیمه خشک سرد و مرطوب فراسرد است. در بین مناطق مورد مطالعه، حداقل ارتفاع منطقه ۱۴۲۰ متر و حداکثر آن ۳۲۱۵ متر می‌باشد.

روش نمونه‌برداری

در این تحقیق، به منظور بررسی کمیت و کیفیت اسانس گونه *Anthemis wiedemanniana* به رویشگاه‌های اصلی در استان آذربایجان غربی (میاندوآب، راژان، اشنویه، قوشچی و انهر) مراجعه و نمونه‌برداری از سرشاخه‌های هوایی گیاهان در طول سه مرحله رشد، شامل مرحله رشد رویشی (آخر اردیبهشت تا اواسط خرداد ماه)، گلدهی (اواخر خرداد تا ده تیر ماه) و میوه‌دهی (اواخر تیر ماه) با ۴ تکرار در سال ۱۳۹۷ انجام گرفت. در هر منطقه معرف، در هر نقطه معرف با توجه به ابعاد، پراکنش و ضریب تغییرات تاج پوشش گونه بابونه آناتولی، تعداد ۱۵ پلات به طور تصادفی مستقر گردید. در هر توده معرف در ۵ پلات اقدام به برداشت نمونه‌های سالم گردید. پس از نمونه‌برداری، گیاهان در شرایط دور از نور خورشید و در دمای محیط خشک شدند.

اسانس‌گیری

اندام‌های مورد بررسی در مرحله رشد رویشی (شامل برگ‌ها)، مرحله گلدهی (برگ‌ها و سرشاخه‌های گل‌دار) و میوه‌دهی (برگ‌ها و سرشاخه‌ها در مرحله میوه‌دهی)، از ۵ رویشگاه مختلف، در مجاورت هوای آزاد و در سایه خشک و آنگاه نمونه‌های به دست آمده پودر شدند. سپس به روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر ساخت آلمان به مدت سه ساعت اسانس گیری شدند. مقدار مورد نیاز برای انجام عملیات استخراج اسانس ۱۰۰ گرم بود. اسانس‌های حاصل پس از جدا سازی از سطح آب توسط سدیم سولفات بدون آب، رطوبت‌زدایی گردیده و آنگاه توزین و سپس بازده تولید اسانس با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

(رابطه ۱) ۱۰۰× وزن خشک سرشاخه هوایی اولیه (g) / وزن اسانس (g) = (بازده اسانس) درصد اسانس (Jaimand and Rezaee, 2004). اسانس‌ها پس از آبگیری تا زمان تزریق به دستگاه گاز کروماتوگرافی و گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال در ظروف شیشه‌ای دربسته نگهداری شدند.

شناسایی ترکیبات موجود در اسانس

پس از تزریق اسانس‌ها به دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC) و یافتن مناسب‌ترین برنامه‌ریزی ستون، جهت دستیابی به بهترین جداسازی، اسانس‌های به دست آمده با دی کلرومتان رقیق شده و به دستگاه کروماتوگراف متصل شده به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) تزریق گردید. کروماتوگرام‌های حاصل و طیف‌های جرمی ترکیب‌های مختلف موجود در اسانس با استفاده از زمان بازداری، شاخص بازداری کواتس، مقایسه با ترکیب‌های استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در نرم افزار Saturn مورد شناسایی کمی و کیفی قرار گرفتند (Adams, 2007).

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گرفت. تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه و مقایسات میانگین به ترتیب با استفاده از آزمون ANOVA و آزمون دانکن انجام گرفت. تجزیه خوشه‌ای به وسیله آنالیز کلاستر و با روش Ward ترسیم شد.

۳. نتایج

تجزیه واریانس بازده اسانس سرشاخه‌های بابونه آناتولی نشان داد که این صفت در بین رویشگاه‌های مختلف مورد بررسی، در سطح احتمال ۵ درصد از نظر آماری تفاوت داشت (جدول ۱). مقایسه میانگین بازده اسانس سرشاخه‌های بابونه آناتولی در هر سه مرحله رشد (رویشی، گلدهی و میوه دهی) نشان داد که در بین رویشگاه‌های میاندوآب، قوشچی و اشنویه از نظر آماری تفاوت معنی‌دار وجود داشت اما بین مناطق انهر و راژان از نظر آماری تفاوت معنی‌دار وجود نداشت (جدول ۲).

همچنین، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بالاترین بازده اسانس در سه مرحله رشد رویشی، گلدهی و میوه‌دهی، متعلق به رویشگاه با اقلیم نیمه خشک (قیزقلعه میاندوآب) به ترتیب، ۰/۷۰، ۰/۸۸ و ۰/۷۵ درصد بود. کمترین بازده اسانس از نمونه اسانس رویشگاه دارای اقلیم مرطوب فراسرد (راژان) به ترتیب، ۰/۴۳، ۰/۵۵ و ۰/۵۰ درصد به دست آمد (جدول ۲).

مقایسه میانگین ترکیبات اصلی اسانس بابونه آناتولی در رویشگاه‌های مختلف نشان داد که در مرحله گلدهی، ترکیبات دی ایزواکتیل فتالات، میرتنیل استات،۴- هیدروکسی-۴- متیل -۴-هیدروکسی نفتالن-۱- وان،۲- متیل ۱- نیترونفتالن، تی- کادینول و ایکوزان در تمام رویشگاه‌های مورد مطالعه با هم تفاوت معنی‌دار داشتند، ولی ترکیبات جرماکرن دی بین رویشگاه‌های قوشچی و اشنویه تفاوت معنی‌دار نداشت و مقدار اسپاتولنول بین رویشگاه‌های راژان انهر و میاندوآب با هم تفاوت معنی‌دار نداشتند و همچنین مقدار این ترکیب در بین رویشگاه‌های قوشچی و اشنویه تفاوت معنی‌دار نشان نداد. مقایسه میانگین ترکیبات اصلی اسانس سرشاخه‌های بابونه آناتولی در مرحله میوه‌دهی بین همه رویشگاه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌دار آماری نشان داد. همچنین، مقایسه میانگین ترکیبات اصلی اسانس سرشاخه‌های بابونه آناتولی در مرحله رویشی بین همه رویشگاه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌دار آماری نشان داد.

تجزیه خوشه‌ای به وسیله آنالیز کلاستر روی ترکیبات اصلی اسانس ژنوتیپ‌های بابونه در طول سه مرحله رشد (شکل ۱)، رویشگاه‌های مورد بررسی را در دو گروه اصلی جای داد: گروه اول شامل رویشگاه قیزقلعه میاندوآب (شماره ۱) بود و گروه دوم شامل رویشگاه‌های قوشچی، انهر، اشنویه و راژان به ترتیب، شماره‌های ۳، ۴، ۲ و ۵ بودند. گروه‌بندی جمعیت‌ها توسط تجزیه کلاستر نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی و منشأ جغرافیایی می‌تواند دلیل گروه‌بندی جمعیت جنوب استان (قیز قلعه میاندوآب) در گروهی جدا از جمعیت‌های شمال استان (اشنویه، انهر، قوشچی و راژان) باشد.

جدول ۱. تجزیه واریانس بازده اسانس در مراحل مختلف رشد در رویشگاه‌های مورد مطالعه

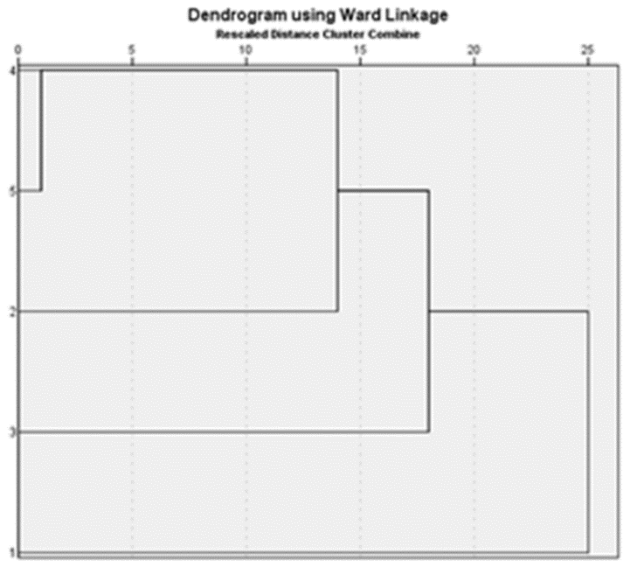
مراحل رشد	منبع تغییرات	مجموع مربعات	df	میانگین مربعات	F
	بین رویشگاه	۰/۱۶	۴	۰/۴۱	۶۰۷۷/۵۰*
مرحله رویشی	خطا	۰/۰	۱۰	۰/۰	
	کل	۰/۱۶	۱۴		
	بین رویشگاه	۰/۲۲	۴	۰/۰۵	۸۳۲۷/۵۰*
مرحله گلدهی	خطا	۰/۰	۱۰	۰/۰	
	کل	۰/۲۲	۱۴		
	بین رویشگاه	۰/۱۱	۴	۰/۰۲	۱۰۹۶/۶۲*
مرحله میوه دهی	خطا	۰/۰	۱۰	۰/۰	
	کل	۰/۱۱	۱۴	۰/۰۲	

*: معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد

جدول۲. مقایسه میانگین بازده اسانس سرشاخه‌های بابونه آناتولی در رویشگاه‌های مختلف و مراحل مختلف رشدی

رویشگاه / مراحل رشد	میاندوآب	اشنویه	قوشچی	انهر	راژان
رویشی	۰/۶۹^{a}	۰/۴۶^{d}	۰/۶۵^{b}	۰/۵۸^{c}	۰/۴۳^{e}
گلدهی	۰/۸۸^{a}	۰/۶۰^{d}	۰/۸۰^{b}	۰/۷۰^{c}	۰/۵۵^{e}
میوه‌دهی	۰/۷۴^{a}	۰/۵۸^{d}	۰/۷۰^{b}	۰/۶۷^{c}	۰/۵^{e}

حروف لاتین نشان‌دهنده نتایج مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد. میانگین‌ها در هر ستون که دارای حداقل یک حروف مشترک می‌باشند، بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.



شکل ۱. دندروگرام به دست آمده به وسیله آنالیز کلاستر به روش Ward. شماره های ۱، ۲، ۳، ٤ و ٥ به ترتیب، شامل جمعیت‌های قیزقلعه میاندوآب، اشنویه، قوشچی، انهر و راژان بودند.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

طبق مطالعات Masotti و همکاران (۲۰۰۳)، فصول مختلف و مراحل مختلف رشد، بیوسنتز ترکیبات اسانس را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Masotti et al., 2003). Adeli و همکاران (۲۰۱۳) جمعیت‌های بابونه زاگرسی کوه‌دشت و کرمانشاه را نسبت به جمعیت‌های ایلام و سقز از نظر مقدار اسانس برتر اعلام کردند (Adeli et al., 2013). نتایج مطالعه حاضر همسو با یافته‌های این محققین بود، ولی با نتایج Kohanum و همکاران (۲۰۱۳) مبنی بر عدم وجود تفاوت معنی‌دار در بازده اسانس اکوتیپ‌ها متفاوت بوده (Kohanmou et al., 2013) که این اختلاف را می‌توان به شرایط تحقیق و اثر نقش محیط بر ژنوتیپ‌ها نسبت داد. بررسی نتایج کمی اسانس‌ها (بازده نسبت به وزن خشک) نشان داد که برای دستیابی به بالاترین میزان اسانس بهتر است در مرحله گلدهی از گیاه *Anthemis wiedemanniana* (Fisch. & C.A. Mey.) Holub برداشت، صورت بگیرد. نتایج این تحقیق با نتایج Sefidkon و همکاران (۲۰۰۷) در مورد گیاه *Satureja rechingeri*، Sefidkon و Akbarnia (۲۰۰۹) در مورد گیاه *Satureja sahendica* و Mirza و همکاران (۲۰۱۱) در مورد *Salvia officinalis* (Mirza et al., 2011) مطابقت دارد. در مورد این گونه‌ها نیز مرحله اوایل گلدهی بالاترین بازده اسانس را تولید کرده بود.

بر طبق مطالعات Voirin و همکاران (۱۹۹۰) بازده اسانس با افزایش دما، کمبود آب و تابش بالای تابستان افزایش می‌یابد (Voirin et al., 1990). جمعیت‌های مورد بررسی به ۴ بیوکلیما تعلق دارند. رویشگاه قیز قلعه میاندوآب، دارای آب و هوای نیمه خشک می‌باشد و با برخورداری از تشعشعات بالای نور در بهار و تابستان، بالاترین مقدار اسانس را در هر سه مرحله رشد (اردیبهشت ماه: مرحله رویشی، خرداد ماه: مرحله گلدهی و تیرماه: مرحله میوه دهی) در بین جمعیت‌های مورد بررسی دارا بود. رویشگاه راژان متعلق به اقلیم مرطوب فراسرد می‌باشد و در طول دوره رشد بابونه آب و هوای سردی داشته است، بنابراین، در بین جمعیت‌های مورد بررسی کمترین درصد اسانس را به خود اختصاص داده است.

منابع

Adams, R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry .Vol. 456. Carol Stream: Allured Publishing Corporation. pp. 544-545.

Adeli, N., Alizadeh, M.A., Mohammadi, A., Jafari, A.A. 2013. Phenological and morphological assessment of a number of populations of *Anthemis haussknechtii*. The First Nation Conference on Policies toward Sustainable Development in Agriculture, Natural Resources and the Environment, Tehran. 10 March: 8.

Bakhshi Khaniki, G., Hosseinzadegan, R. 2014. Investigation of chemical composition of essential oil of *Teucrium polium* L. in different habitats of Mazandaran Province**.** Molecular and Cellular Biology. 3(12):47-55.

D'Antuono, L.F., Galletti, G.C., Bochini, P. 2000. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a North Mediterranean area (Liguria Region, Northern Italy). Annals of Botany. 86: 471-478.

De Martonne, E. 1928. Areisme t Indice Artidite. Comptes Rendus de L'Academic of Science, Paris, 182:1395-1398.

Ghahreman, A. 1979-1992. Colorful flora of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran. (in Persian).

Gönenç, T.M., Akkol, E.K., Süntar, I., Erdoğan, T.F., Kıvçak, B. 2014. Fatty acid composition and preclinical researches on *Anthemis wiedemanniana* (Fisch & Mey): Discovery of a new anti-inflammatory agent. Pharmacognosy Magazine. 10(37): 53–60.

Kazemizadeh, Z., Habibi, Z, Yousefzadi, M., Ashabi, M.A., Heydari Rikan, M. 2010. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Salvia mavrochlamys* Boiss & Kotschy, from west Azerbayjan Province. Journal of Medicinal Plants. 9(33): 75- 82.

Kohanmou, M.A., Alikhani, M., Rejalie, F. 2013. Autumn cultivation and comparative study of *Matricaria chamomilla* ecotypes of west and centeral regions in Bushehr. First National Conference on Medicinal Plants and Sustainable Agriculture. 10 October: 9.

Jaimand, K.., Rezaee, M.B. 2004. Chemical composition essence shoots (*Achillea millefolium* subsp. *millefolium*) distillation methods. Iran Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 20(2):181-190.

Mirza, M., Ghoraishi, F., Bahadori, A. 2011. Effect of harvesting time on essential oils content and composition of *Salvia officinalis* L. and *Mentha piperita* L. in Khuzestan Province. Iranian Journal of Medicinal Aromatic Plants. 26(4): 531-543.

Sefidkon, F., Abbasi, K.H., Jamzad, Z. Ahmadi, S.H. 2007. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. Food Chemistry. 100: 1054-1058.

Sefidkon, F., Akbarnia, A. 2009. Essential oil content and composition of *Satureja sahendica* Bornm in different stage of plant growth. Journal of Essential Oil Research. 21(2): 112-114.

Taviana, P., Rosellini, D., Veronesi, F. 2002. Variation for agronomic and essential oil traits among wild populations of *Chamomilla recutita* (L.) Rausch. from Central Italy. Journal of Herbs Spices and Medical Plants. 9(4): 1049- 6475.

Uzel, A., Guvensen, A., Cetin, E. 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Anthemis xylopoda* O. Schwarz, from Turkey. Journal of Ethnopharmacology. 95(2): 151.

Voirin, B., Brun, N., Bayet, C. 1990. Effect of day length on the monoterpene composition of leaves of *Mentha piperita*. Phytochemistry. 29: 749–755.

Zouari, N., Ayadi, I., Fakhfakh, N., Rebai, A., Zouari, S. 2012. Variation of chemical composition of essential oils in wild populations of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut., a North African endemic species. Lipids in Health and Disease. 11(1): 1-12.

Investigation of the effect of habitat and different growth times on changes in essential oil yield and phytochemical composition of *Anthemis wiedemanniana* Holub (Fisch. & C.A. Mey.)

***Fatemeh Nejadhabibvash**

Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

Abstract

Quality and quantity of medicinal plants essential oils is significantly influenced under biological and ecological factors. The aim of the present study was to investigate the changes in the active ingredient of *Anthemis wiedemanniana* Holub (Fisch. & C.A. Mey.) After harvesting the aerial branches of this plant in each habitat, essential oil extraction was done using a Clevenger device, and the analysis of the effective ingredients of the essential oil was done using GC and GC/MS devices. Data were statistically analyzed in a completely randomized design with four replications. The highest amount of essential oil of apical shoots was obtained at the three stages of vegetative, flowering and fruit stage from Qiz Ghaleh of Miandoab, which was 0.70, 0.88 and 0.75%, respectively. Cluster analysis divided the studied habitats into two groups. Grouping of populations by cluster analysis showed that genetic diversity and geographical origin can be the reason for grouping the population of the south of the province (Qiz Galeh of Miandoab) in a separate group from the population of the north of the province (Oshnavieh , Anhar, Qushchi and Rajan). According to the results of this study, in order to obtain more active ingredient of essential oil, Miandoab habitat was the superior habitat and in order to obtain essential oil compounds with valuable medicinal properties, such as caryophyllene oxide, eudsemol and isoaromodendron, sampling of Oshnavieh, Qushchi and Anhar habitats in the vegetative growth stage; High levels of farnesene, Miandoob habitat in vegetative growth stage and high amount of T-cadinol and beta-Sesqui Phellandrene compounds, Rajan and Miandoab habitats in fruiting stage are recommended.

Keywords: alpha- Farnesene, aerial parts, Germacrene-D, iso-Aromadendrene

* e-mail: f.nejadhabibvash@urmia.ac.ir

بررسی ترکیبات اسانس درمنه معطر و درمنه برنجاسف جمع‌آوری‌شده از شمال‌غرب ایران

سعید ملائی*[۱]، سید محمد مولای[۱]، مصطفی عبادی[۲]

[۱] گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز
[۲] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز

چکیده

Artemisia یکی از بزرگ‌ترین و گسترده‌ترین سرده‌های تیره چتریان می‌باشد. این سرده دارای بیش از ۵۰۰ گونه متنوع است که به طور عمده در اروپا ، آسیا و آمریکای شمالی گسترش یافته‌اند. این گونه‌ها گیاهان علفی و بوته‌ای یک‌ساله، دوساله یا چندساله هستند که فعالیت‌های بیولوژیکی آن‌ها متفاوت از یکدیگر می‌باشد. در این کار پژوهشی، دو گونه از درمنه به نام‌های درمنه معطر (*A. fragrans*) و برنجاسف (*A. vulgaris*) از شمال‌غرب ایران جمع‌آوری شدند. هدف از این کار تحقیقاتی بررسی ترکیب‌های موجود در اسانس این دو گونه گیاهی بود. با استفاده از دستگاه کلونجر عمل اسانس گیری انجام گرفت و ترکیبات موجود در آن‌ها با استفاده از GC و GC-MS جداسازی و شناسایی شدند. همچنین، فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد نمونه‌ها با استفاده از روش DPPH ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده اسانس گونه‌های مورد مطالعه ۱و۸-سینئول و کافور بود. همچنین، اسانس درمنه برنجاسف در مقایسه با درمنه معطر توانایی بیشتری در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH داشتند. بنابراین، نتایج این مطالعه می‌تواند به عنوان یک راهنما برای انتخاب جنس درمنه با بیشترین مقدار متابولیت مطلوب و مفید در صنایع غذایی و دارویی و همچنین منافع اقتصادی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: اسانس، درمنه برنجاسف، درمنه معطر، گیاه داروئی

* e-mail: s.mollaei@azaruniv.ac.ir

۱. مقدمه

درمنه با نام علمی *Artemisia* شامل گیاهان مقاوم و بوته‌هایی است که به خاطر روغن‌های فرار آن‌ها شناخته شده‌اند. اکثر گونه‌ها دارای عطرهای قوی و طعم‌های تلخ به واسطه وجود ترپنوئیدها به عنوان ترکیبات طبیعی به ویژه سزکویی‌ترپن‌لاکتون‌ها هستند. درمنه متعلق به تیره کاسنیان است و شامل بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی می‌باشد که عمدتاً در آسیا، اروپا و آمریکای شمالی یافت می‌شوند. جنس درمنه همیشه از گیاهان فراوان و برخوردار از خواص دارویی بوده و در داروهای سنتی برای درمان انواع بیماری‌ها مفید بوده است.

درمنه معطر با نام علمی *Artemisia fragrans* گیاهی است چندساله که در ارمنستان، ایران، روسیه و در دامنه‌های همسایگی آن‌ها یافت می‌شود. گونه مورد نظر دارای برگ‌های متناوب و ساده و یا پهنک کم و بیش بریده هستند. گل‌آذین به صورت کپه‌ای است و پرچم‌ها پنج عدد و به هم پیوسته‌اند و لوله‌ای را در اطراف خامه به وجود می‌آورند. میوه عموماً به صورت فندقه‌ای است. این گیاه در مناطق سرد به ندرت گل و میوه می‌دهد. Movafeghi و همکاران (۲۰۱۰)، از برگ‌ها و گل‌های درمنه معطر، اجزای شیمیایی ترکیبات فرّار را مورد بررسی قرار دادند. از ۳۴ ترکیب شناسایی شده، برخی ترکیبات همچون ۱و۸-سینئول، آلفا-ترپینولن، گاما-ترپینن و کارواکرول ترکیبات عمده در اسانس گل و برگ این گیاه بودند. Farghadan و همکاران (۲۰۱۶) ۳۲ ترکیب شیمیایی را در درمنه معطر شناسایی کردند که ۹۳٫۵ درصد از کل روغن را تشکیل می‌داد. اسانس حاوی اجزای مونوترپنوئیدها و سزکوئی‌ترپنوئیدها بوده و ترکیبات عمده اسانس، کافور (۳۱٫۸۴ درصد) و ۸٫۱-سینئول (۲۹٫۰۱ درصد) بود. طبق این نتایج مشخص شد که اسانس درمنه معطر سرشار از مونوترپنوئیدها است.

درمنه برنجاسف با نام علمی *Artemisia vulgaris* در مناطق معتدل اروپا، آسیا، شمال آفریقا و آمریکای شمالی رویش دارد. برنجاسف گیاهی چندساله، معطر و کمی تلخ است که تا ۱٫۲ متر رشد می‌کند. سرگل‌ها تخم‌مرغی شکل، به طول ۴-۳ میلی‌متر و به عرض ۲ میلی‌متر است. گل‌ها مایل به زرد یا قهوه‌ای قرمز و تقریباً بدون کرک می‌باشند. برگ‌ها به طول ۱۰-۵ سانتی‌متر، صاف و لبه‌های آن‌ها اغلب پیچیده به پشت هستند. سطح فوقانی معمولاً به رنگ سبز تیره و بدون کرک و سطح زیرین کرک‌دار است. برگ‌های اصلی، برگچه کوتاه و ضخیم با یک برش انتهایی و یک یا دو جفت کاسبرگ کناری کوچک می‌باشند. بقیه برگ‌ها بی‌ساقه یا تقریباً بی‌ساقه با یک بنیان انفرادی‌اند. شاخه‌ها اغلب کمی قرمز رنگ هستند و بوی نامطبوع دارند. در مطالعه‌ای که بر روی اسانس قسمت‌های هوایی خشک‌شده برنجاسف انجام گردید، مشخص شد از ۸۱ ترکیب شناسایی‌شده که ۹٫۸۱-۸٫۹۶ درصد از کل محتوای روغن اسانس را تشکیل می‌داد، مونوترپن‌های اکسیژن‌دار، ۴۸٫۷-۱۷٫۱ درصد و سزکوئی‌ترپن‌ها، ۴۴٫۱-۱۷٫۱ درصد از روغن‌ها را شامل می‌شدند. اجزای عمده شامل سابینن، بتا-پینن، ۱و۸-سینئول، کتون-آرتمزیا، سیس و ترانس توژون، کریسانتنیل‌استات، ژرماکرن D و کاریوفیلن بودند (Judžentienė and Buzelytė, 2006).

هدف از این مطالعه، بررسی ترکیبات اسانس موجود در دو گونه درمنه (درمنه معطر و برنجاسف) جمع‌آوری‌شده از شمال غرب ایران و ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی آن‌ها می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. جمع‌آوری گونه‌های درمنه

درمنه معطر و برنجاسف از حوالی شهرستان تبریز جمع‌آوری شدند و در دانشکده علوم پایه دانشگاه شهید مدنی آذربایجان مورد شناسایی قرار گرفتند. گیاه جمع‌آوری‌شده خشک گردید و سپس به صورت دستی پودر شده و برای اسانس گیری آماده شد.

۲.۲. استخراج اسانس از گیاه

۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به ۳۰ گرم از اندام هوایی گیاه اضافه شد و با کمک کلونجر به مدت سه ساعت اسانس گیری شد. بعد از جمع‌آوری اسانس، توزین شد و به منظور شناسایی ترکیبات موجود در آن، در دمای زیر صفر نگهداری شد.

۳.۲. آنالیز ترکیبات توسط کروماتوگرافی GC-MS

از دستگاه GC-MS مدل (Shimadzu GCMS QP 5050A) با ستون DB-1، طول ۶۰ متر، قطر ۰٫۲۵ میلی‌متر، ضخامت لایه نازک ۰٫۲۵ میکرومتر برای آنالیز اسانس استفاده شد. دمای آون به مدت ۳ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد، و نیز به مدت ۵ دقیقه پس از افزایش دما در دمای ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد ثابت ماند. گاز نیتروژن با سرعت ۱٫۳ میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده شد. با استفاده از شاخص (KI) و کتابخانه Wiley و NIST 11 ترکیبات موجود شناسایی شدند.

۳.۲. بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی با روش DPPH

۱۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH (۱ میلی مولار) به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شدند؛ سپس جذب آن‌ها در ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری گردید.

۳. نتایج

بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین بازده اسانس مربوط به گیاه درمنه معطر با بازده ۰/۲۴ درصد و کمترین بازده اسانس (۰/۰۳ درصد) مربوط به گیاه برنجاسف می‌باشد.

جدول ۱ ترکیبات شناسایی شده در اسانس گونه‌های درمنه مورد مطالعه به همراه درصد آن‌ها را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج به دست آمده، به ترتیب ۹۱/۵۳ و ۹۵/۴۵ درصد از ترکیبات اسانس گیاهان درمنه درمنه معطر و برنجاسف با استفاده از دستگاه GC-MS مورد شناسایی قرار گرفتند.

از بین ترکیبات شناسایی شده، ترکیبات ۱و۸- سینئول و کافور، ترکیبات کریسانتنیل استات، کاریوفیلن، ترانس-کاریوفیلن و ژرماکرن به ترتیب با درصدهای ۱۴/۶۲، ۷/۶۱، ۲۳/۴۱ و ۸/۸۱ عمده ترکیبات اسانس گیاه برنجاسف بودند ولی در میان این ترکیبات، ترانس-کاریوفیلن در اسانس درمنه معطر دارای مقادیر کم بود و ترکیب کریسانتنیل استات هم در درمنه معطر یافت نشد. کامفن با مقدار ۸/۲۱ درصد نیز در گیاه درمنه معطر دارای درصد بیشتری نسبت به گیاه برنجاسف بود.

ترکیبات شناسایی‌شده بر اساس واحدهای ترپنی به سه گروه (مونوترپن‌ها، مونوترپن‌های اکسیژن‌دار، سزکوئی‌ترپن‌ها) تقسیم شدند. بر اساس نتایج، مونوترپن‌های اکسیژن‌دار در همه اسانس‌های حاصل از گونه‌های درمنه، بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده‌اند. درصد سزکوئی ترپن‌ها نیز در میان گروه‌های ترکیبات شناسایی شده در اسانس گونه برنجاسف از گونه درمنه معطر بیشتر است.

برای به دست آوردن خاصیت آنتی اکسیدانی اسانس‌ها، ابتدا غلظت‌های مختلف از اسانس‌ها تهیه گردید و درصد مهارکنندگی آن‌ها محاسبه شد. در ادامه نمودار آن‌ها رسم گردید و بر اساس نمودار و رابطه به دست آمده از نمودار، مقدار دقیق

IC_{50}، محاسبه گردید. بر اساس نتایج مقدار IC_{50} اسانس درمنه معطر و برنجاسف به ترتیب ۱۶۲/۲۳ و ۹۲/۴۲ میکروگرم بر ایلی لیتر بود که این نتایج نشان می‌دهد که درمنه برنجاسف در مقایسه با درمنه معطر دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بهتری است.

جدول ۱. ترکیبات شناسایی‌شده از اسانس اندام‌های هوایی گونه‌های درمنه

شماره	ترکیب	RI	درمنه معطر	برنجاسف
۱	آلفا-توجن	۹۲۲	۰/۲۵	–
۲	آلفا-پینن	۹۲۵	۱/۰۴	۱/۴۲
۳	کامفن	۹۴۲	۸/۲۱	۰/۵۲
۴	سابینن	۹۶۹	۰/۵۶	۳/۶۳
۵	بتا-پینن	۹۸۱	۰/۳۵	۳/۲۷
۶	۱و۸-سینئول	۱۰۲۰	۲۹/۲۳	۱۸/۱۲
۷	گاما-ترپینن	۱۰۵۱	۰/۲۹	۰/۲۱
۸	ترانس- سابینن هیدرات	۱۰۹۵	–	۱/۵۲
۹	کافور	۱۱۴۶	۳۷/۹۲	۹/۳
۱۰	کریسانتنون	۱۱۵۳	۳/۶	–
۱۱	پینوکارون	۱۱۶۲	۱/۳	۲/۱
۱۲	برنئول	۱۱۶۳	۴/۲۱	۰/۹۱
۱۳	ترپین-۴- اُل	۱۱۷۱	۱/۰۹	–
۱۴	کریسانتنیل استات	۱۲۶۷	–	۱۴/۶۲
۱۵	برنیل استات	۱۲۹۱	۱/۰۶	–
۱۶	کاریوفیلن	۱۴۱۶	–	۷/۶۱
۱۷	ترانس- کاریوفیلن	۱۴۸۰	۰/۳۲	۲۳/۴۱
۱۸	ژرماکرن	۱۴۷۸	۲/۱	۸/۸۱

٤. بحث و نتیجه‌گیری

گیاه درمنه معطر و برنجاسف از گیاهان دارویی مهم هستند که اسانس آن‌ها کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف دارد. تا به حال برخی مطالعات بر روی اسانس ترکیبات آن‌ها انجام گرفته است. در بررسی اسانس اندام‌های هوایی درمنه معطر توسط Farghadan و همکاران (۲۰۱۶)، ترکیبات عمده اسانس شامل کافور (۳۱/۸۴ درصد) و ۱و۸- سینئول (۲۹/۰۱ درصد) بودند. در مطالعه دیگر روی این گونه گیاهی، Morteza-Semnani و همکاران (۲۰۰۵)، نیز از ۲۷ ترکیب شناسایی‌شده توسط سیستم‌های GC و GC-MS، کافور، ۱و۸- سینئول و کامفن را به عنوان ترکیبات عمده در اسانس بخش‌های هوایی درمنه معطر گزارش نمودند؛ اسانس حاوی ۹۷/۵ درصد از مونوترپنوئیدها و ۲/۵ درصد از سزکوئی‌ترپنوئیدها بود. Barazandeh (۲۰۰۳) نیز در مطالعه خود بر روی اسانس درمنه معطر، ۲۸ ترکیب را شناسایی کرد که از میان آن‌ها ترکیبات ۱و۸- سینئول با ۵۲/۱ درصد و آلفا-

توژون با ۳۴٫۸ درصد بیشترین درصدها را به خود اختصاص داده بودند. در مطالعه روی ترکیبات اسانس برنجاسف، از ۲۸ ترکیب شناسایی‌شده، داوانون‌ها، ژرماکرن D، ۱و۸- سینئول، کافور، ترانس-توجن و سیس-کریسانتنیل‌استات، بیشترین مقادیر را در بین ترکیبات داشتند (Judzentiene and Garjonyte, 2016). در بررسی Lohani و همکاران (۲۰۱۶)، بر روی اسانس بخش‌های هوایی برنجاسف، نتایج نشان داد ترکیبات عمده شامل آلفا-توژون، آرتمزیا کتون، ترانس-کاریوفیلن، ۱و۸- سینئول، پی-سیمن و یوموگی الکل می‌باشد. در مطالعه بعدی توسط Malik و همکاران (۲۰۱۹)، بر روی اسانس حاصل از برگ‌های برنجاسف در برزیل، در کل ۱۸ ترکیب شناسایی شد که ترکیبات عمده در این اسانس شامل کاریوفیلن (۳۷٫۴۵ درصد)، ژرماکرن D (۱۶٫۱۷ درصد) و هومولن (۱۳٫۶۶ درصد) بودند.

بر اساس مطالعات قبلی و نتایج به دست آمده از آنالیز اسانس گونه‌های مورد مطالعه می‌توان به این نتیجه رسید که ترکیبات شناسایی‌شده مشابه هم هستند و تفاوت در درصد آن‌ها می‌تواند در ارتباط با عوامل محیطی، جغرافیایی، ژنتیکی و ... باشد.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه شهید مدنی آذربایجان به خاطر حمایت مالی کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

Barazandeh, M.M. 2003. Essential oil composition of *Artemisia fragrans* Willd. from iran. Journal of Essential Oil Research. 15: 414-415.

Farghadan, M., Ghafoori, H., Vakhshiteh, F., Shahzadeh Fazeli, S.A.H., Farzaneh, P., Kokhaei, P. 2016. The effect of *Artemisia fragrans* Willd: Essential oil on inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophage cell line. Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology. 15: 515-524.

Judžentienė, A., Buzelytė, J. 2006. Chemical composition of essential oils of *Artemisia vulgaris* L. (mugwort) from north lithuania," Chemija. 17: 12–15.

Judzentiene, A., Garjonyte, R. 2016. Compositional variability and toxic activity of mugwort (*Artemisia vulgaris*) essential oils. Natural Product Communications. 11: 1353-1356.

Lohani, H., Gwari, G., Bhandari, U., Haider, S.Z. 2016. Variability in the essential oils from aerial parts of *Artemisia vulgaris* L. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 19: 103-107.

Malik, S., de Mesquita, L.S.S., Silva, C.R. 2019. Chemical profile and biological activities of essential oil from *Artemisia vulgaris* L. cultivated in brazil. Pharmaceuticals. 12: 1-10.

Morteza-Semnani, K. Akbarzadeh, M. Moshiri, K. 2005. Essential oil composition of *Artemisia fragrans* Willd. from Iran. Flavour and Fragrance Journal. 20: 330–331.

Movafeghi, A., Djozan, D.J., Torbati, S. 2010. Solid-phase microextraction of volatile organic compounds released from leaves and flowers of *Artemisia fragrans*, followed by GC and GC/MS analysis. Natural Product Research. 24: 1235-1242.

Investigation of the essential oils constituents of *Artemisia fragrans* and *A. vulgaris* collected from northwest of Iran

, Seyyed Mohammad Mowlaye[1], Mostafa Ebadi[2*]Saeed Mollaei[1]

[1] Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

Abstract

Artemisia is one of the largest and most widely distributed genera of the family Astraceae (Compositae). It consist over 500 diverse species distributed mainly in Europe, Asia and North America. These species are annual, biennial or perennial herbaceous plants and shrubs, whose biological activities are different from each other. In this work, two species of *Artemisia* namely *A. fragrans* and *A. vulgaris* were collected from northwest of Iran. The aim of this study was to evaluate the essential oils profile of these plant species. The extraction of essential oil was done using Clevenger apparatus, and essential oils analyses were done using GC and GC-MS. Also, free radical-scavenging activity of the samples was evaluated using DPPH assay. The results showed that the main constituents of the essential oils in studied plants were 1,8-Cineole and camphor. Also, the essential oil of *A. vulgaris* had a greater ability to inhibit DPPH free radicals compared to *A. fragrans*. So, the results of this study can be used as a guideline to select the genus Artemisia with the highest amount of desirable metabolites and beneficial in the food and pharmaceutical industries as well as economic benefits.

Keywords: *Artemisia fragrans*, *Artemisia vulgaris*, Essential oil, Medicinal plant

* e-mail: s.mollaei@azaruniv.ac.ir

بررسی توان اسیدگالیک در مقابله با اثر اکسیداتیو دی ۲-اتیل هگزیل فتالات (DEHP) در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت

ماهرخ پرواز*[۱] ، محمدحسین آبنوسی[۲]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک

[۲]دانشیار بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک

چکیده

بافت مغزاستخوان یکی از منابع سلول‌های بنیادی مزانشیم مغزاستخوان BMSCs با قابلیت تقسیم‌وتمایز است. BMSCs به‌عنوان پیش‌ساز استئوبلاست در آسیب بافتی تولید ماتریکس استخوان را به‌عهده‌دارند. انسان از طریق غذا، آب، هوا و تماس با محصولات مصرفی و پزشکی در معرض مواد شیمیایی DEHP قرار گرفته و با القاء استرس‌اکسیداتیو باعث اختلال در عملکرد BMSCs می‌شود، درنتیجه جمعیت سلول‌های استئوبلاست را کاهش می‌دهد. اسیدگالیک (GA) دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است، لذا هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر GA به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان، در کاهش اثرات نامطلوب DEHP بر تکثیر BMSCs بود. روش‌کار: پس از کشت BMSCs، تیمار باغلظت‌های منتخب۱۰۰ و۵۰۰ میکرومولار DEHP و ۰/۲۵میکرومولار GA به‌مدت ۹۶ ساعت، توانایی زیستی و خودنوزایی سلول‌ها، میزان پروتئین سلول‌ها، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (CAT و SOD)، میزان پراکسیداسیون لیپید و توانایی‌آنتی‌اکسیدان‌کل اندازه‌گیری شد. نتایج: داده‌ها نشان‌داد DEHP باعث کاهش توانایی‌زیستی و تکثیری BMSCs و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود. این آلاینده زیست‌محیطی باعث افزایش اکسیداسیون لیپید و کاهش میزان آنتی‌اکسیدان‌کل سلول شد. غلظت‌های کم GA هیچ‌گونه اثر نامطلوبی بر توان‌زیستی سلول‌ها نداشته، بلکه غلظت ۰/۲۵ میکرومولار GA بیشترین اثر معنی‌دار افزایشی بر توان تکثیری را نشان داد. همچنین GA فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و توان آنتی‌اکسیدانی‌کل سلول‌ها را افزایش داد. در تیمار هم‌زمان، GA توانست اثر سمی DEHP را مرتفع نماید ولی نتوانست اثر نامطلوب DEHP را کاملاً در مقایسه با گروه کنترل بهبود بخشد. نتیجه گیری: تیمار ۹۶ ساعته GA نتوانست اثر سمی DEHP را کاملاً برطرف نماید پیشنهاد می‌شود تیمار طولانی مدت با GA درنظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان، دی-۲-اتیل هگزیل فتالات، اسیدگالیک، استرس اکسیداتیو.

* Mahrokhm129@gmail.com

۱. مقدمه

مغز استخوان مرکز اصلی تولید سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان (BMMSCs)[1] است (Arutyunyan, Elchaninov et al. 2016, Lee, Jeong et al. 2019). این سلول‌های چند توان بالغ هستند که انواع سلول‌ها شامل استئوبلاست، کندروسیت و آدیپوسیت را تولید می‌کنند (Ghiasi, Qomi et al. 2015, Sheykhhasan, Qomi et al. 2015, Ghiasi, Kalhor et al. 2016). سلول‌های بنیادی مزانشیم به دلیل توانایی منحصربه‌فردشان درزمینه پزشکی، بازساختی و درمان سرطان نیز بسیار موردتوجه هستند (Murphy, Moncivais et al. 2013). در مغز استخوان BMSCs با تمایز به سلول‌های استئوبلاست در سلامت بافت استخوان نقش بسزایی را داشته و باعث جایگزینی ماتریکس استخوان شده و از پوکی استخوان جلوگیری می‌کند (Dey and Rangarajan 2007, Ringden and Le Blanc 2011).

فتالات ها (که دی استرهای اسید فتالیک نیز نامیده می‌شوند) گروهی از مواد شیمیایی آلی به هم مرتبط هستند که معمولاً در صنعت پلاستیک‌سازی به‌عنوان مواد نرم‌کننده مورداستفاده قرار می‌گیرند (Staples, Peterson et al. 1997, Latini 2005). این مواد نرم‌کننده معمولاً به مواد دیگر، به‌ویژه PVC و پلیمرهای دیگر نظیر لاستیک و استیرن، اضافه می‌شوند تا آن‌ها را انعطاف‌پذیر و کشسان کنند (Sheikh and Beg 2019). ۲۵ ترکیب شیمیائی در خانواده فتالات ها حضور دارند. شش فتالاتی که بیشترین کاربرد را در صنعت پلاستیک دارند عبارت‌اند از دی ـ۲ـ اتیل هگزیل فتالات (DEHP)[2]،دی بوتیل فتالات (DBP)[3]، دی ـ اتیل فتالات (DEP)[4]، دی اکتیل فتالات (DnOP)[5]، دی متیل فتالات (DMP)[6] و بوتیل بنزیل فتالات (BBP)[7] است (Latini 2005, He, Gielen et al. 2015, Sheikh and Beg 2019). که از بین این فتالات ها DEHP در مقام نخست استفاده است (Sheikh and Beg 2019, Ebenau-Jehle, Soon et al. 2020). به دلیل پیوند ضعیف بین فتالات‌ها و ترکیبات پلاستیکی، این ترکیبات به‌آسانی به محیط‌زیست واردشده به صورتی که امروزه به‌عنوان آلاینده‌های زیست‌محیطی و فراگیر در نظر گرفته می‌شوند (Shariati, Pourbabaei et al. 2021).

فتالات‌ها از راه‌آب، خاک، هوا وارد زنجیره غذایی شده و امنیت غذایی انسان را کاهش می‌دهند (Tan, Zhang et al. 2016, Larsson, Lindh et al. 2017, Lee, Lee et al. 2019). از طرفی با توجه به اینکه DEHP ازنظر شیمیایی به پلیمر متصل نمی‌شود درزمان تولید و استفاده از پلیمر جداشده و می‌تواند از طریق آب، غذا و حتی در صورت استفاده از وسایل پزشکی باعث آلودگی انسان شود (Elsisi, Carter et al. 1985, Bornehag, Sundell et al. 2004). کیسه‌های ذخیره‌سازی خون و فراورده‌های خونی، وسایل تزریق و همودیالیز ولوله‌های تراشه، حاوی مقادیر زیادی DEHP هستند. مقادیر زیادی از DEHP در خون و بافت های بیمارانی که به‌دفعات زیاد انتقال خون انجام می‌دهند،

[1] Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells
[2] Di Ethyl Hexyl Phthalate
[3] Di Buthyl Phthalate
[4] Di Ethyl Phthalate
[5] Di Octyl Phthalate
[6] Di Methyl phthalate
[7] Buthyl Benzyl phthalate

یافت می‌شود (Ishihara, Itoh et al. 2000). غلظت DEHP در خون و محصولات خونی که در کیسه‌های پلاستیکی نگهداری ۵۲/۶ تا ۵۵/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر است که این غلظت وابسته به زمان نگهداری هست. میانگین DEHP موجود در خون پس از نگهداری در کیسه‌های پلاستیکی به مدت دو هفته ۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بعد از سه هفته ۴۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش‌شده است. میزان مصرف قابل‌تحمل روزانه برای DEPH، ۰/۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن است. آژانس حفاظت از محیط‌زیست آمریکا یک دوز مرجع خوراکی ۰/۰۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن را برای DEPH تعیین کرده است (Gilbo and Coles 1975, Sasakawa and Mitomi 1978).

آبنوسی و علی‌یاری تأثیر DEHP بر روی توانائی زیستی سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت را مطالعه کردند. آن‌ها نشان دادند که غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP طی ۴۸ ساعت هیچ تغییری در زنده ماندن سلول‌ها نداشته است. این در حالی است که افزایش زمان تیمار باعث شد این ترکیب شیمیائی باعث کاهش توانائی تکثیر و کلونی زایی این سلول‌ها شود. همچنین آن‌ها نشان دادند که DEHP با القاء استرس اکسیداتیو باعث کاهش توانائی تکثیر این سلول‌ها شده است. لذا DEHP با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در کوتاه‌مدت بر توانائی زیستی و تکثیر بی‌تأثیر هست ولی در طولانی‌مدت این ترکیب شیمیائی اثر سمی دارد (Abnosi and Aliyari Babolghani 2022). در مطالعه دیگری آبنوسی و همکاران در سال ۲۰۲۳ نشان دادند که DEHP در درازمدت باعث اختلال در سیکل سلولی و توقف آن در مرحله G1 شده و از طرفی آپوپتوزیس وابسته با کاسپاز را در سلول‌های BMSCs به دنبال دارد (Hussein, Javad et al. 2023).

سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان ممکن است از طریق خون محیطی به DEHP آلوده و مسموم شوند که اگر خود نوزائی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم تحت تأثیر DEHP قرار گیرد، جمعیت سلول‌های استئوبلاست کاهش می‌یابد و فرد ممکن است دچار پوکی استخوان[1] که یک مشکل بالینی روبه رشد است و بروز آن در جهان در حال افزایش است، شود (Abnosi and Babolghani 2020, Abnosi and Aliyari Babolghani 2022).

فنول‌ها و ترکیبات فنولیک جز متابولیت‌های ثانویه گیاهان می‌باشند و به‌صورت گسترده در بعضی گیاهان یافت می‌شوند (Alam, Kaur et al. 2007). خواص آنتی‌اکسیدانی گیاهان در درجه‌ی اول به دلیل ترکیبات فنولی موجود در آن‌هاست که ممکن است در تمام قسمت‌های گیاهان مثل میوه‌ها، دانه‌ها و برگ‌ها وجود داشته باشد (Shah, Bosco et al. 2014). در میان ترکیبات فنولی مختلف، ۳،۴،۵-تری هیدروکسی بنزوئیک اسید معروف به اسیدگالیک، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، به سلول‌های بدن در محافظت از صدمات اکسیداتیو کمک می کند (Badhani, Sharma et al. 2015). اسیدگالیک و مشتقات آن در گیاهان مختلف حضورداشته و خانواده بزرگی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و متابولیت های ثانویه را تشکیل می‌دهند. اسیدگالیک با از بین بردن رادیکال آزاد استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد (Verma, Singh et al. 2013).

[1] Osteoprosis

مطالعه آبنوسی و یاری در سال ۲۰۱۸ نشان داد که اسیدگالیک در سلول‌های BMSCs دارای اثر آنتی‌اکسیدانی بوده و باعث افزایش توان آنتی‌اکسیدانی این سلول‌ها می‌شود. لذا اسیدگالیک به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان از سلول‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت کرده و ROS را از بین می‌برد، بنابراین از این طریق در کاهش استرس اکسیداتیو نقش دارد (Abnosi and Yari 2018).

با توجه به اهمیت BMSCs در سلامت استخوان، در مطالعه حاضر توان محافظتی اسیدگالیک در جبران اثر اکسیداتیو DEHP بر این سلول‌ها موردبررسی قرار گرفت است. در این مطالعه توان‌زیستی، توان تکثیری و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در حضور DEHP بررسی و از طرفی توان اسیدگالیک در افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌کل سلول و افزایش توان سلول در مقابله با استرس اکسیداتیو ناشی از DEHP مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

برای مطالعات و بررسی‌ها در این پژوهش از رت های نر نژاد ویستار دوماهه که تحت شرایط استاندارد دما، تغذیه و نور مناسب نگهداری شدند استفاده‌شده است.

۱.۲. کشت سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان:

برای جداسازی و کشت سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان ابتدا در شرایط استریل استخوان ران و ساق جدا گردید. بعد از جدا کردن بافت های پیوندی استخوان‌ها به فالکون حاوی محیط‌کشت کامل (DMEM+penicillin and streptomycin+15%FBS[1]) با حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. در اتاق کشت، زیر هود لامینار با قیچی استریل دو سر استخوان‌ها قطع و به‌وسیله محیط‌کشت کامل با عمل شست‌وشو مغز استخوان را خارج و به ۳ میلی‌لیتر محیط‌کشت کامل انتقال داده شد. پس از پیپتاژ کردن محیط‌کشت حاوی مغز استخوان فالکون به مدت ۵ دقیقه در سانترفیوژ با دور ۶۹۰ (g) قرار گرفت. مایع رویی را خارج کرده و به رسوب حاصل ۱میلی‌لیتر محیط‌کشت DEMEM حاوی ۱۰٪ FBS و پنی‌سیلین و استرپتومایسین اضافه و در فلاسک T25 مخصوص کشت سلول به انکوباتور با شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، 5% CO2 و دارای رطوبت منتقل شد.

بعدازاینکه سلول‌ها کف فلاسک را پر کردند، عمل پاساژ انجام شد. برای عمل پاساژ سلول‌های چسبیده به کف فلاسک را با تریپسین EDTA[2] جدا و به فلاسک های جدید منتقل شدند. طی پاساژ سلول‌ها به خلوص ۹۲٪ (با توجه به بررسی‌های فلوسایتومتری) رسید و برای انجام آزمون‌ها استفاده شد.

۲.۲. انتخاب دوز مؤثر:

با توجه به مطالعات آبنوسی و علی‌یاری در سال ۲۰۲۲ از غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP برای بررسی تأثیر این آلاینده بر توانائی خود نوزائی به مدت ۴ روز استفاده شد. از طرفی با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از توانائی زیستی

[1] Fetal Bovine Serum
[2] Ethylene Diamine Tetra Acetic acid

غلظت ۰/۲۵ میکرومولار اسیدگالیک (GA) که بیشترین توانایی تکثیر سلولی را داشت برای بررسی اثر مهارکنندگی DEHP استفاده شد. گروه‌های آزمایشی با سه تکرار برای هر آزمون به ترتیب زیر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

گروه اول (Control): سلول‌ها تنها با محیط کشت کامل بدون حضور DEHP یا GA تیمار شدند.

گروه دوم (DEHP): سلول‌ها با محیط کشت کامل در حضور DEHP تیمار داده شدند.

گروه سوم (GA): سلول‌ها با محیط کشت کامل در حضور اسیدگالیک تیمار داده شدند.

گروه چهارم تیمار هم‌زمان (DEHP+GA): سلول‌ها به‌صورت هم‌زمان با محیط کشت کامل و غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP به همراه ۰/۲۵ میکرومولار اسیدگالیک تیمار داده شدند.

۳.۲. اندازه‌گیری زنده‌مانی سلول‌ها بر اساس آزمون تریپان بلو:

در هر چاهک پلیت ۱۲ خانه تعداد ۵۰۰۰۰ سلول به مدت ۲۴ ساعت برای چسبیدن سلول به کف پلیت کشت داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت محیط رویی سلول‌ها خارج و محیط کشت کامل جدید حاوی غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰۰ میکرومولار DEHP و غلظت ۰/۲۵ میکرومولار اسیدگالیک به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از ۴ روز محیط رویی خارج و سلول‌ها با PBS شستشو شدند، سپس چاهک‌ها را تریپسینه کرده و با محیط‌کشت کامل خنثی شدند. به ۱۰میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی به نسبت ۱:۱ رنگ تریپان بلو ۰/۴ درصد اضافه گردید. پلیت ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سلول‌ها به‌وسیله لام نئوبار شمارش و تعداد سلول‌های مرده (آبی‌رنگ) و سلول‌های زنده (بی‌رنگ) مشخص گردید. درصد زنده‌مانی سلول‌ها در هر غلظت با استفاده از فرمول زیر و با توجه به ضریب رقت (2X) محاسبه گردید.

$$\text{درصد توانایی زیستی} = \frac{\text{تعداد سلول زنده}}{\text{تعداد کل سلول}} \times 100$$

۴.۲. بررسی توان تکثیری سلول‌ها بر اساس دو برابر شدگی جمعیت (PDN)[1]:

دو برابر شدگی جمعیت به‌صورت عددی میانگین کل جمعیت را بیان کرده و نشان‌دهنده سرعت‌های مختلف تقسیم است. ۵۰۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی سلول‌ها تخلیه و محیط‌کشت کامل همراه غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP، ۰/۲۵ میکرومولار اسیدگالیک، و مخلوط غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP و ۰/۲۵ میکرومولار اسیدگالیک به سلول‌ها اضافه شد. هر سه روز یک‌بار به مدت ۹۶ ساعت محیط‌کشت تعویض گردید. سلول‌ها تریپسینه و شمارش شدند. با استفاده از فرمول زیر دو برابر شدگی جمعیت اندازه‌گیری شد. در فرمول زیر N تعداد سلول‌ها بعد از شمارش و .N تعداد سلول‌های اولیه است.

$$PDN=(\log N/N. \times 3.32)$$

[1] Population Doublling Number

۵.۲. تیمار و استخراج عصاره سلولی:

سلول‌های پاساژ سه در فلاسک T25 کشت و پس از ۹۶ ساعت تیمار، دو بار با بافر Tris-HCl-NaCl شستشو، سپس تریپسینه و به اپندورف منتقل شد. برای لیز کردن سلول‌ها از روش انجماد و ذوب استفاده و با دور ۱۰۲۰۰(g)، ۱۰ دقیقه سانترفیوژ و برای بررسی‌های بعدی از محلول رویی حاوی عصاره سلولی استفاده شد.

۶.۲. اندازه‌گیری میزان پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش لاوری:

با استفاده از روش لاوری میزان پروتئین نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. ازسرم آلبومین گاوی[1](BSA) به‌عنوان استاندارد لاوری استفاده شد.

برای ساخت محلول لاوری در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر، ۰/۴ گرم سود و ۲ گرم سدیم کربنات حل شد. در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر ۰/۱ گرم سولفات مس حل گردید. در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر ۰/۲ گرم سدیم پتاسیم تارتارات حل شد. برای تهیه محلول کمپلکس لاوری به ۹۸ میلی‌لیتر از محلول مرحله اول، ۱ میلی‌لیتر از محلول مرحله دوم و ۱ میلی‌لیتر از محلول مرحله سوم اضافه شد.

در لوله‌آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره سلولی معرف فولین سیکالتیوی و ۵ میلی‌لیتر از محلول واکنش اضافه شد و لوله‌ها ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شدند. جذب هر نمونه را با دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۵۰ نانومتر خوانده و پس از رسم نمودار استاندارد از فرمول خطی Y=0/0015X + 0/0224 با R^2=0/9984 برای محاسبه غلظت پروتئین در نمونه‌ها استفاده شد. مقداری از نمونه‌ها که حاوی غلظت مساوی پروتئین بود برای آنالیزهای بعدی استفاده شد.

۷.۲. اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD):

SOD آنزیمی است که واکنش تجزیه رادیکال سوپر اکسید و تولید پراکسید هیدروژن را تسهیل می‌کند. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم مطابق روش Giannopolitis انجام شد.

برای ساخت محلول واکنش ابتدا حاوی ۱/۹ میلی‌گرم متیونین، ۷/۹ میلی‌گرم ریبوفلاوین ، ۶/۱ میلی‌گرم نیتروبلوتترازولیوم و ۳/۳ میلی‌گرم EDTA هرکدام به‌صورت جداگانه در حداقل بافر فسفات پتاسیم حل شدند درنهایت محلول‌ها باهم ترکیب‌شده و حجم نهایی محلول به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. عصاره سلولی به همراه ۱میلی‌لیتر از محلول واکنش در لوله‌آزمایش ترکیب شد. کنترل و شاهد این آزمون محلول فاقد عصاره بود. نمونه شاهد در تاریکی و سایر نمونه‌ها به مدت ده دقیقه در اتاقک نور قرار داده شدند. جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز برحسب یک واحد در دقیقه به ازای یک میلی‌گرم از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{فعالیت سوپراکسیددیسموتاز} = \frac{\text{OD کنترل} - OD \text{ نمونه}}{OD \text{ کنترل}}$$

فعالیت یک واحد آنزیم برابر با مقدار آنزیمی که از احیای ۵۰٪ نیتروتترازولیوم جلوگیری می‌کند در نظر گرفته شد.

[1] Bovine serum albumin

۸.۲. اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT):

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از این نظر حائز اهمیت است که هیدروژن پراکسید توسط آنزیم کاتالاز تجزیه می‌شود. جذب H2O2 در بافر PBS در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر در ۰/۴ تنظیم و نقطه شروع اندازه‌گیری سرعت واکنش در نظر گرفته شد. به لوله‌آزمایش ۵۰ میکرولیتر از عصاره سلولی، ۲۰۰ میکرولیتر بافر PBS و ۳۰۰ میکرولیتر H2O2 اضافه شد. با اضافه کردن نمونه‌ها پس از گذشت ۲ دقیقه سرعت حذف H2O2 اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس سرعت مصرف پراکسید هیدروژن در دقیقه و با استفاده از فرمول زیر و ضریب خاموشی $mM^{-1}\ cm^{-1}$ ۳۹/۴ محاسبه شد.

$$\text{فعالیت کاتالاز} = \frac{\text{اختلاف جذب}}{39/4}$$

۹.۲. اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA):

به عصاره سلولی ۱ میلی‌لیتر محلول‌تری کلرو استیک اسید ۲۰٪ حاوی تیوباربیتوریک اسید ۵٪ اضافه شد. ترکیب حاصل در حمام آبگرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. لوله‌های آزمایش حاوی نمونه را از حمام آبگرم خارج کرده و سریعاً ده دقیقه در یخ قرار داده شدند. نمونه‌ها ده دقیقه با دور ۶۹۰ (g) سانترفیوژ شدند. در طول‌موج ۵۲۳ نانومتر جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. این جذب بر اساس تشکیل کمپلکس تیوباربیتوریک-مالون دی آلدئید است. غلظت کمپلکس تیوباربیتوریک اسید-مالون دی آلدئید از فرمول $A = \varepsilon bc$ و ضریب خاموشی $\varepsilon = ۱۵۵\ mmol^{-1}\ cm^{-1}$ برحسب میکرومولار محاسبه گردید.

۱۰.۲. اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) بر اساس روش FRAP:

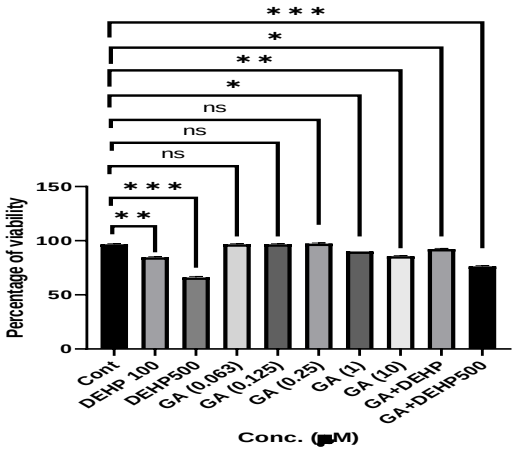
میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل با استفاده از روش Benzie and Strain اندازه‌گیری شد. در لوله‌آزمایش ۱۵۰ میکرولیتر عصاره سلولی، ۸۵۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر و ۱۷۰۰ میکرولیتر محلول واکنش FRAP ریخته شد. برای ساخت محلول واکنش ابتدا سه محلول زیر به‌صورت جداگانه تهیه و با نسبت ۱:۱:۱ یکدیگر مخلوط شدند: محلول اول (بافر استات سدیم ۳۰۰ میلی مولار): ۰/۷۳ گرم استات سدیم در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر حل‌شده و pH روی ۳/۶ تنظیم شد. محلول دوم (TPTZ): در محلول ۴۰ میلی مولار اسیدکلریدریک (در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر ۰/۰۳۲ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک حل شد)، ۰/۰۰۳۱ گرم TPTZ حل شد. محلول سوم (محلول کلرید آهن ۲۰ میلی مولار): ۰/۰۰۵۴گرم کلرید آهن در ۱ میلی‌لیتر آب حل شد.

لوله‌ها ۱۰ دقیقه در تاریکی قرارگرفته سپس جذب نمونه‌ها در۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از رقت‌های مختلف سولفات آهن پس از رسم منحنی استاندارد با استفاده از فرمول خطی Y=0/0059X + 0/0552 با R^2=0/9982 میزان آنتی‌اکسیدان کل نمونه‌های تیماری برحسب میکرومول آهن/ میلی‌گرم پروتئین اندازه‌گیری شد.

۳. نتایج

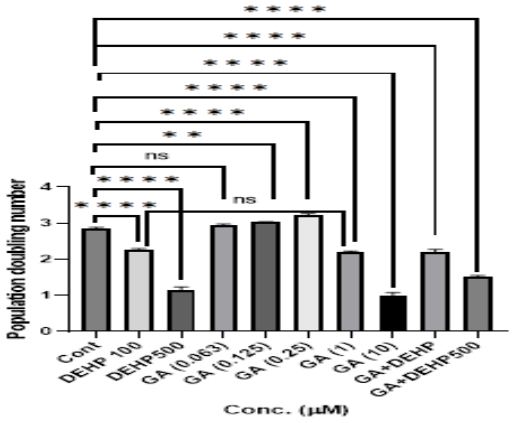
۱.۳. تاثیر اسیدگالیک و DEHP بر زنده‌مانی و توانائی تکثیر سلول‌ها:

همان‌طور که در نمودار۱ مشاهده می‌شود نتایج حاصل از آزمون تریپان بلو نشان داد تیمار با DEHP در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌ها شده که این کاهش معنی دار ($p<0.05$) وابسته به دوز می باشد. از طرفی تیمار با اسیدگالیک در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که غلظت‌های ۰/۰۶۳، ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ هیچ‌گونه تأثیر معنی‌داری ($p>0.05$) بر توانائی زیستی BMSCs نداشته است، این در حالی است که غلظت‌های ۱و ۱۰ میکرومولار باعث کاهش معنی‌دار توانائی زیست سلول‌ها شد. تیمار سلول‌های با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار اسیدگالیک و ۱۰۰ میکرومولار DEHP توانست تا اثر سمی این آلاینده را کاهش دهد. این در حالی است که در تیمار هم‌زمان غلظت ۰/۲۵ میکرومولار اسیدگالیک و ۵۰۰ میکرومولار DEHP اثر جبرانی مشاهده نشد.



نمودار ۱. نتایج حاصل از آزمون تریپان بلو.

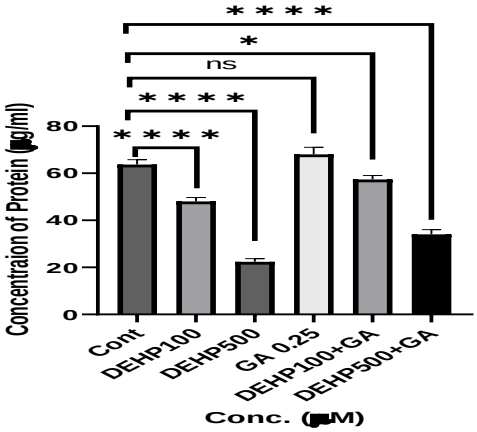
از طرفی آزمون دو برابر شدگی جمعیت (نمودار۲) نشان داد بالاترین میزان توانایی‌زیستی سلول در تیمار با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار از اسیدگالیک بوده است. لذا با توجه به نتایج حاصل از آزمون تریپان بلو و PDN، غلظت ۰/۲۵ میکرو مولار از اسیدگالیک برای بررسی توان این متابولیت ثانونه در کاهش اثر اکسیداتیو غلظت های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار انتخاب گردید.



نمودار۲. نتایج حاصل از آزمون PDN.

۲.۳. اندازه‌گیری میزان پروتئین:

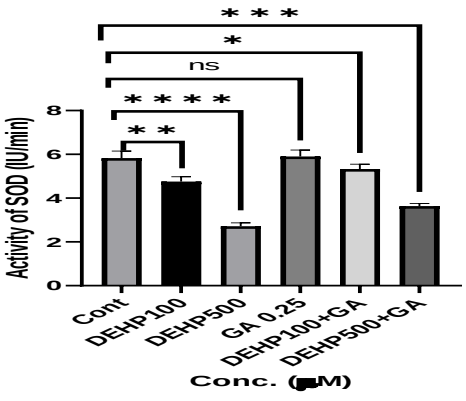
تیمار سلول ها با غلظت‌های مختلف DEHP در مقایسه با کنترل باعث کاهش معنی‌داری ($p<0.05$) میزان پروتئین سلولی به‌صورت وابسته به دوز شد. از طرفی گروه تیمار شده با اسیدگالیک در مقایسه با گروه تیمار شده با DEHP باعث افزایش میزان پروتئین سلول‌ها گردید این درحالی است که در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی‌داری ($p>0.05$) مشاهده نشد. تیمار سلول ها با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار اسیدگالیک و ۱۰۰ میکرومولار DEHP بصورت هم‌زمان باعث کاهش اثر این آلاینده زیست محیطی در مقایسه با گروه های تیماری با DEHP شد ولی نتوانست در مقایسه با گروه کنترل اثر سمی DEHP را مرتفع سازد (نمودار۳).



نمودار۳. اندازه‌گیری میزان پروتئین سلولی به روش لاوری.

۳.۳. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز:

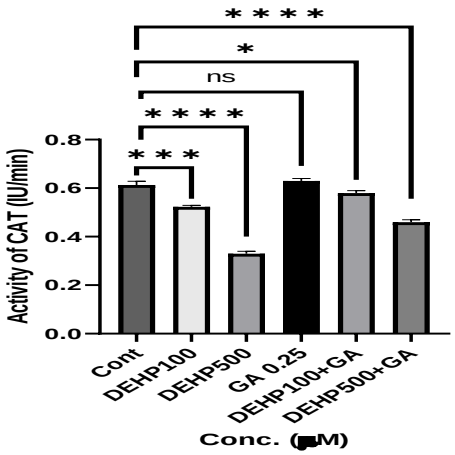
همان‌طور که در نمودار ۴ مشاهده می شود گروه تیمار شده با غلظت های مختلف DEHP در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش معنی‌دار ($p<0.05$) فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز گردید. از طرفی، اگر چه تیمار با اسیدگالیک در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی‌داری نداشته است ولی این آنتی‌اکسیدان طبیعی در تیمار هم‌زمان با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار DEHP توانست اثر این آلاینده زیست‌محیطی را مرتفع سازد، به صورتی که تغییر آن در مقایسه با گروه تیمار شده با ۱۰۰ میکرومولار DEHP معنی‌دار ($p<0.05$) میباشد.از طرفی آنالیز داده‌ها نشان داد اسیدگالیک نتوانسته است اثر غلظت ۵۰۰ میکرومولار DEHP را مرتفع سازد.



نمودار۴. فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز.

٤.٣. اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز:

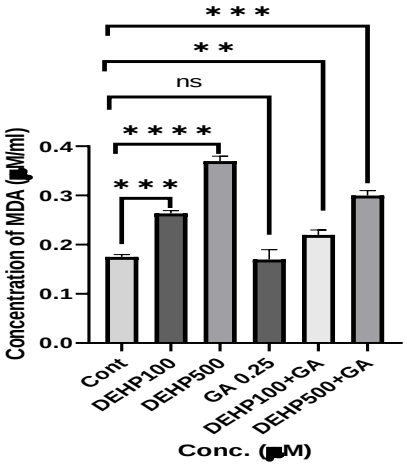
همان‌طور که در نمودار۵ می‌بینید گروه تیمار شده با DEHP در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش معنی‌دار ($p<0.05$) فعالیت آنزیم کاتالاز گردید. این در حالی است که نتایج حاصل از تیمار سلول ها با اسیدگالیک و DEHP مشابه نتایج آن در بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز است. غلظت ۰/۲۵ میکرومولار اسیدگالیک توانست اثر غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP را جبران نماید ولی در جبران اثر ۵۰۰ میکرومولار موفق نبود.



نمودار۵. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز.

٥.٣. بررسی پراکسیداسیون لیپید:

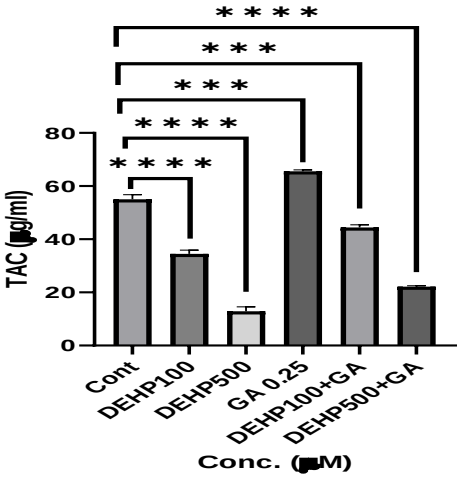
MDA به عنوانی شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء اندازه‌گیری شد، در گروه تیمار شده با DEHP در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار ($p<0.05$) میزان MDA دیده شد. از طرفی در گروه تیماری با اسیدگالیک در مقایسه با گروه تیماری با DEHP کاهش معنی‌دار ($p<0.05$) MDA دیده شد. اگر چه در مقایسه با گروه کنترل،اسید گالیک نتوانست اثر سمی DEHP را برطرف کند (نمودار۶).



نمودار۶. اندازه‌گیری میزان پر اکسیداسیون لیپید.

٦.٣. اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل:

همان طور که در نمودار۷ مشاهده می شود، اسیدگالیک در مقایسه با گروه کنترل باعث افزایش معنی‌دار ($P<0.05$) آنتی‌اکسیدان‌کل سلول‌ها شده است. اگر چه در تیمار هم‌زمان اسیدگالیک و DEHP با توجه به حضور این آلاینده میزان آنتی‌اکسیدان‌کل سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌دار ($P<0.05$) داشته است.



نمودار۷. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌کل سلول.

٤. بحث و نتیجه‌گیری:

نتایج این بررسی‌ها نشان داد، غلظت کم (۰/۰۶۳ تا ۰/۲۵ میکرومولار) اسیدگالیک دارای اثر سمی بر سلول‌های BMSCs نیست، از طرفی غلظت ۰/۲۵ میکرومولار باعث افزایش توانائی تکثیر این سلول‌ها گردید. اگر چه با توجه به اثر آنتی‌اکسیدانی اسیدگالیک این محصول طبیعی گیاهی توانست اثر اکسیداتیو غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP را مرتفع سازد ولی در مقایسه با گروه کنترل این جبران غیر معنی‌دار نبود. لذا دلایل مختلفی ممکن است باعث عدم موفقیت کامل اسیدگالیک شده باشد، که مهم‌ترین آن کوتاه بودن زمان تیمار است که پیشنهاد می‌شود تیمار با این محصول گیاهی در زمان‌های بیشتر از ۴ روز بررسی شود.

اگر چه مطالعات متعددی در خصوص اثر آنتی‌اکسیدانی اسیدگالیک وجود دارد ولی نیاز به بررسی‌های بیشتر در خصوص این متابولیت‌ثانویه گیاهی دیده می‌شود (Kahkeshani, Farzaei et al. 2019). اگرچه Aruoma و همکاران معتقد هستند که اسیدگالیک به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان دارای توان کافی نیست (Aruoma, Murcia et al. 1993)، ولی Sohi و همکاران معتقد هستند که اسیدگالیک توانسته است اثر اکسیداتیو را در لنفوسیت تیمار شده از بین برده و از آپوپتوزیس این سلول‌ها در شرایط‌طبیعی جلوگیری کند (Sohi, Mittal et al. 2003). بر اساس بررسی های فارموکینتیک انجام شده، مشخص شده است که جذب و دفع اسید گالیک بصورت خوراکی بسیار سریع است، لذا پیشنهاد شده است

که با افزایش زمان تیمار و بهینه‌سازی غلظت امکان افزایش اثر بیولوژیک اسیدگالیک وجود دارد (Bai, Zhang et al. 2021).

به‌عنوان نتیجه‌گیری با توجه به مطالعات فوق الذکر، احتمالا افزایش زمان تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان می‌تواند به بهبود نتایج حاصل از مطالعه حاضر کمک کند.

منابع

Abnosi, M. H. and Z. Aliyari Babolghani (2022). "Diethylhexyl phthalate induced oxidative stress and caused metabolic imbalance in bone marrow mesenchymal stem cells." Physiology and Pharmacology **26**(1): 88-100.

Abnosi, M. H. and Z. A. Babolghani (2020). "The inhibitory role of Di-2-ethylhexyl phthalate on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via down-regulation of RUNX2 and membrane function impairment." International Journal of Medical Toxicology and Forensic Medicine **10**(2): 26673-26673.

Abnosi, M. H. and S. Yari (2018). "The toxic effect of gallic acid on biochemical factors, viability and proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells was compensated by boric acid." Journal of Trace Elements in Medicine and Biology **48**: 246-253.

Alam, M. S., G. Kaur, Z. Jabbar, K. Javed and M. Athar (2007). "Eruca sativa seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity." Food and chemical toxicology **45**(6): 910-920.

Aruoma, O. I., A. Murcia, J. Butler and B. Halliwell (1993). "Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives." Journal of Agricultural and Food Chemistry **41**(11): 1880-1885.

Arutyunyan, I., A. Elchaninov, A. Makarov and T. Fatkhudinov (2016). "Umbilical cord as prospective source for mesenchymal stem cell-based therapy." Stem cells international **2016**.

Badhani, B., N. Sharma and R. Kakkar (2015). "Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications." Rsc Advances **5**(35): 27540-27557.

Bai, J., Y. Zhang, C. Tang, Y. Hou, X. Ai, X. Chen, Y. Zhang, X. Wang and X. Meng (2021). "Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases." Biomedicine & pharmacotherapy **133**: 110985.

Bornehag, C.-G., J. Sundell, C. J. Weschler, T. Sigsgaard, B. Lundgren, M. Hasselgren and L. Hägerhed-Engman (2004). "The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case–control study." Environmental health perspectives **112**(14): 1393-1397.

Dey, D. and A. Rangarajan (2007). "Stem cells: A dormant volcano within our body?" Resonance **12**: 27-34.

Ebenau-Jehle, C., C. I. Soon, J. Fuchs, R. Geiger and M. Boll (2020). "An aerobic hybrid phthalate degradation pathway via phthaloyl-coenzyme A in denitrifying bacteria." Applied and Environmental Microbiology **86**(11): e00498-00420.

Elsisi, A., D. Carter and I. Sipes (1985). "Dermal absorption and tissue distribution of phthalate esters." Toxicologist **5**: 246-247.

Ghiasi, M., N. Kalhor, R. Tabatabaei Qomi and M. Sheykhhasan (2016). "The effects of synthetic and natural scaffolds on viability and proliferation of adipose-derived stem cells." Frontiers in Life Science **9**(1): 32-43.

Ghiasi, M., R. T. Qomi, M. Nikbakht and M. Sheykhhasan (2015). "Expression of collagen type I and II, aggrecan and SOX9 genes in mesenchymal stem cells on different bioscaffolds." Tehran University Medical Journal **73**(3).

Gilbo, C. and N. Coles (1975). "Di (2-ethylbexyl) phthalate Content of Plasma Fractions Prepared by Low Temperature Ethanol (Cohn) Fractionation." Vox Sanguinis **29**(4): 242-247.

He, L., G. Gielen, N. S. Bolan, X. Zhang, H. Qin, H. Huang and H. Wang (2015). "Contamination and remediation of phthalic acid esters in agricultural soils in China: a review." Agronomy for Sustainable Development **35**: 519-534.

Hussein, A. M., S. Javad and S. Zahra (2023). "Induction of Caspase-dependent Apoptosis in Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells due to Di-2-Ethylhexyl Phthalate Toxicity was found to arrest the Cell Cycle at the G1 stage." Curr Stem Cell Res Ther.

Ishihara, M., M. Itoh, K. Miyamoto, S. Suna, Y. Takeuchi, I. Takenaka and F. Jitsunari (2000). "Spermatogenic disturbance induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate is significantly prevented by treatment with antioxidant vitamins in the rat." International journal of andrology **23**(2): 85-94.

Kahkeshani, N., F. Farzaei, M. Fotouhi, S. S. Alavi, R. Bahramsoltani, R. Naseri, S. Momtaz, Z. Abbasabadi, R. Rahimi and M. H. Farzaei (2019). "Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic review." Iranian journal of basic medical sciences **22**(3): 225.

Larsson, K., C. H. Lindh, B. A. Jönsson, G. Giovanoulis, M. Bibi, M. Bottai, A. Bergström and M. Berglund (2017). "Phthalates, non-phthalate plasticizers and bisphenols in Swedish preschool dust in relation to children's exposure." Environment international **102**: 114-124.

Latini, G. (2005). "Monitoring phthalate exposure in humans." Clinica Chimica Acta **361**(1-2): 20-29.

Lee, G.-Y., S.-Y. Jeong, H.-R. Lee and I.-H. Oh (2019). "Age-related differences in the bone marrow stem cell niche generate specialized microenvironments for the distinct regulation of normal hematopoietic and leukemia stem cells." Scientific Reports **9**(1): 1007.

Lee, Y.-S., S. Lee, J.-E. Lim and H.-B. Moon (2019). "Occurrence and emission of phthalates and non-phthalate plasticizers in sludge from wastewater treatment plants in Korea." Science of the Total Environment **692**: 354-360.

Murphy, M. B., K. Moncivais and A. I. Caplan (2013). "Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine." Experimental & molecular medicine **45**(11): e54-e54.

Ringden, O. and K. Le Blanc (2011). "Mesenchymal stem cells for treatment of acute and chronic graft-versus-host disease, tissue toxicity and hemorrhages." Best practice & research Clinical haematology **24**(1): 65-72.

Sasakawa, S. and Y. Mitomi (1978). "Di-2–ethylhexylphthalate (DEHP) Content of Blood or Blood Components Stored in Plastic Bags." Vox Sanguinis **34**(2): 81-86.

Shah, M. A., S. J. D. Bosco and S. A. Mir (2014). "Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products." Meat science **98**(1): 21-33.

Shariati, S., A. A. Pourbabaei, H. A. Alikhani, K. A. Rezaei and F. Shariati (2021). "Phthalic Acid Esters as Pervasive Emerging Pollutants in the Environment and Their Role in Threatening Food Security and Human Health: A Review." Iranian Journal of Soil and Water Research **52**(8): 2253-2277.

Sheikh, I. A. and M. A. Beg (2019). "Structural characterization of potential endocrine disrupting activity of alternate plasticizers di-(2-ethylhexyl) adipate (DEHA), acetyl tributyl citrate (ATBC) and 2, 2, 4-trimethyl 1, 3-pentanediol diisobutyrate (TPIB) with human sex hormone-binding globulin." Reproductive Toxicology **83**: 46-53.

Sheykhhasan, M., R. T. Qomi, N. Kalhor, M. Mehdizadeh and M. Ghiasi (2015). "Evaluation of the ability of natural and synthetic scaffolds in providing an appropriate environment for growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells." Indian journal of orthopaedics **49**: 561-568.

Sohi, K. K., N. Mittal, M. K. Hundal and K. L. Khanduja (2003). "Gallic acid, an antioxidant, exhibits antiapoptotic potential in normal human lymphocytes: A Bcl-2 independent mechanism." Journal of nutritional science and vitaminology **49**(4): 221-227.

Staples, C. A., D. R. Peterson, T. F. Parkerton and W. J. Adams (1997). "The environmental fate of phthalate esters: a literature review." Chemosphere **35**(4): 667-749.

Tan, W., Y. Zhang, X. He, B. Xi, R. Gao, X. Mao, C. Huang, H. Zhang, D. Li and Q. Liang (2016). "Distribution patterns of phthalic acid esters in soil particle-size fractions determine biouptake in soil-cereal crop systems." Scientific Reports **6**(1): 31987.

Verma, S., A. Singh and A. Mishra (2013). "Gallic acid: molecular rival of cancer." Environmental toxicology and pharmacology **35**(3): 473-485.

Ivestigating the Gallic acid potential to compensate the oxidaive effect of D-2-ethylhexylphthalate (DEHP) on rat bone mesenchaymal stem cells

Mahrokh Parvaz[1]*, Mohammad Hussein Abnosi[2]

[1] MSc student in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak.
[2] Associated professor in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak.

Abstract:

Bone marrow is a sources of bone marrow mesehchymal stem cell (BMSCs) which these cells are able to proliferate and differentiate. Human through food, air and consumable medica product is exposed to D-2-ethylhexylphthalate (DEHP) that induces oxidative stress which causes impairment in BMSCs function to reduce its population. Gallic acid (GA) has antioxidant property, therefore the aim of the this study was to investigate the effect of GA as an antioxidant in reducing the drustic effect of DEHP on BMSCs proliferation. Methods: following BMSCs cultivation, treatment with 100 and 500 µM of DEHP and 0.25 µM of GA as selected concentraions was carried out for 96 hours. Then viability and proliferation, cells protein concentaration, antioxidant enzymes (CAT and SOD) activity, lipid peroxidation level and total antioxidant capacity (TAC), was measured. Results: data showed, DEHP causes reduction of viability and proliferation of BMSCs as well as reduced activity of antioxidatn enzymes. This environmental pollution caused increase in lipid proxidation and TAC of the cells. Not only,low concentration of GA showed no unwante results on cell viability, but also the 0.25 µM concentration showed highest significant proliferative effect. In addition, GA caused elevation of antioxidant enzymes activity and cells TCA. In co-treatment, GA reduce the toxic effect of DEHP, but was not able to compensate its derustic effec when compared with control one. Conclusion:it was revealed, 96 hours treatment with GA could not completely reconcile the toxic effect of DEHP, therefore, we suggest to carry out longer treatment of GA.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells, D-2-ethylhexylphthalate, gallic acid, oxidative stress

*Mahrokhm129@gmail.com

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدرواتانولی رزماری (*Salvia rosmarinus* L.) و کاربرد آن در دوغ پاستوریزه

زهرا ایزدی[1*]

[1] گروه علوم و مهندسی باغبانی، مجتمع آموزش عالی نهاوند، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

چکیده

دوغ، فرآورده لبنی است که به آلودگی توسط میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و فسادزا حساس است. یکی از راه‌های کنترل رشد این باکتری‌ها، استفاده از نگهدارنده‌ها و ترکیبات ضدمیکروبی است. با توجه به نگرانی‌های عمومی در خصوص عوارض نگهدارنده‌های شیمیایی، تمایل به مصرف محصولاتی است که از نگهدارنده طبیعی استفاده شده است. محصولات طبیعی فرصت‌های نامحدودی برای مواد افزودنی جدید و مناسب فراهم می‌کند. هدف اصلی تحقیق حاضر بررسی خاصیت آنتی-اکسیدانی عصاره هیدرواتانولی رزماری در سه غلظت ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد حجمی- حجمی بر ماندگاری دوغ بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف عصاره با آزمون مهار رادیکال‌های آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل مورد بررسی قرار گرفت و با آنتی‌اکسیدان سنتزی بوتیل هیدروکسی آنیزول مقایسه شد. مقدار فنل اندازه‌گیری شده عصاره این گیاه برابر ۰/۳۵±۹۶/۴۷ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره بود. تیمار دوغ با غلظت ۰/۵ درصد، ضمن داشتن خصوصیات حسی قابل قبول، به‌طور معنی‌داری جمعیت میکروبی پایین‌تر و زمان ماندگاری طولانی‌تری در مقایسه با نمونه شاهد داشت. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان از عصاره رزماری در صنایع غذایی و دارویی به عنوان یک ماده‌ی طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: رزماری، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل، عصاره هیدرواتانولی

E-mail: z.izadi@basu.ac.ir

۱. مقدمه

فرآورده‌های لبنی در طی مراحل تولید، عرضه و نگهداری تا انقضای مصرف در اثر عدم رعایت اصول بهداشتی توسط میکروارگانیسم‌ها آلوده می‌شوند. در صورت نگهداری طولانی مدت لبنیات اهمیت بررسی فساد میکروبی بیشتر آشکار می‌شود (Guler and Seker, 2009). از آنجایی که دوغ مایع بسیار فسادپذیری است، نیاز به تیمار برای ماندگاری بیشتری دارد (Guler and Seker, 2009). استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به دلیل کنترل رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از عمل اکسیداسیون (فساد شیمیایی) نقش بسزایی در افزایش پایداری و ماندگاری محصولات غذایی دارد. از سویی دیگر استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول[1]، بوتیل هیدروکسی تولوئن[2] و تری بوتیل هیدروکینون[3] در صنایع داروسازی، پزشکی و غذایی بسیار رواج یافته است (Moradi et al., 2015). با این حال اثرات نامطلوب تغذیه‌ای و سمیت این آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است. به همین دلیل یافتن ترکیبات دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدمیکروبی با منشا طبیعی (اسانس و عصاره گیاهی) شدیدا مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (Cheraghali et al., 2016). با توجه به این که تاکنون در مورد خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری در رویشگاه نهاوند و کاربرد آن در دوغ گزارشی ارائه نشده است و از طرفی به دلیل سهل الوصول و ارزان بودن این گیاه، این تحقیق می‌تواند مقدمه‌ای جهت استفاده عملی از عصاره این گیاه در صنایع دارویی و غذایی باشد. از این‌رو هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدرواتانولی گیاه رزماری رشد یافته در منطقه نهاوند و تاثیر عصاره این گیاه به عنوان نگهدارنده طبیعی بر ماندگاری دوغ بود.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. منطقه مورد مطالعه

برای انجام آزمایشات، از نمونه‌های گیاهی رزماری از مزرعه تحقیقاتی مجتمع آموزش عالی نهاوند برداشت شده بود، استفاده گردید. این منطقه در ارتفاع ۱۶۶۷/۵ متر از سطح دریا، طول جغرافیایی ۴۸ درجه و ۳۶ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۴ درجه و ۱۸ دقیقه شمالی قرار دارد.

۲.۲. روش تحقیق

برگ‌های گیاه رزماری بعد از انتقال به آزمایشگاه جهت رفع گرد و غبار با آب سرد به صورت سطحی شسته شد و سپس به مدت ۴ روز در سایه خشک گردید. برگ‌های خشک شده این گیاه توسط آسیاب آزمایشگاهی پودر گردید. پودر درون بشر شیشه‌ای ریخته شد و به آن به میزان ۸۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد و ۱۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت بر دستگاه شیکر در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتیگراد) نگهداری شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. میزان

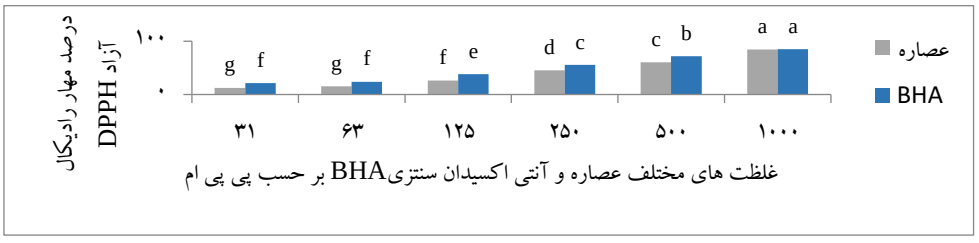
[1]. Butylated hydroxy anisole
[2]. Butylated hydroxy toluene
[3]. Tert-butylhydroquinone

کل ترکیبات فنل با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد (Maisuthisakul et al., 2007). اندازه‌گیری توانایی عصاره رزماری در مهار رادیکال‌های آزاد ۲ و ۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) با استفاده از روش Nakajima و همکاران (۲۰۰۴) انجام گردید. از آنتی اکسیدان سنتزی بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA) نیز جهت مقایسه استفاده گردید.

به منظور ارزیابی اثر نگهدارندگی عصاره هیدرواتانولی رزماری بر ماندگاری دوغ، ابتدا عصاره این گیاه با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ درصد حجمی/حجمی به دوغ پاستوریزه افزوده شد. همچنین یک نمونه دوغ فاقد عصاره به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. شمارش کلی باکتری نمونه‌های دوغ در بازه‌های زمانی صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انجام پذیرفت و نتایج بر اساس لگاریتم تعداد کلنی بر میلی‌لیتر گزارش شد (Abid et al., 2009). ویژگی‌های حسی نمونه‌های دوغ با استفاده از یک گروه ارزیاب ۱۲ نفره مورد ارزیابی قرار گرفت. به این صورت که آن‌ها از سیستم نمره‌دهی هدونیک ۵ نقطه‌ای ۵ (عالی)، ۴ (خوب)، ۳ (نه خوب نه بد)، ۲ (بد) و ۱ (بسیار بد) استفاده کردند (Abid et al., 2009). تمامی آزمایش‌های ذکر شده سه بار تکرار شد و داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون آماری دانکن انجام شد و میانگین آن‌ها به عنوان مقدار مورد نظر اعلام گردید. همچنین جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

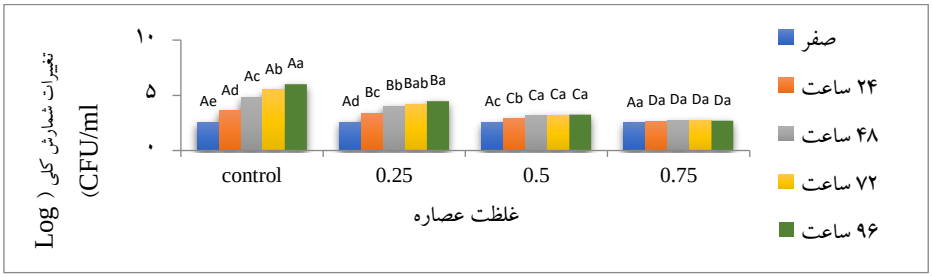
۳. نتایج

محتوی فنل اندازه‌گیری شده عصاره هیدرواتانولی رزماری ۰/۳۵±۹۶/۴۷ میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره بود. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت عصاره رزماری همانند افزایش غلظت BHA میزان مهار رادیکال‌های آزاد نیز افزایش یافت و تفاوت آن (به غیر از غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام عصاره) با BHA معنی‌دار بود ($p<0/05$).



شکل ۱. مقایسه میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدرواتانولی رزماری و آنتی‌اکسیدان BHA در غلظت‌های مختلف. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشند.

نتایج آنالیز میکروبی در نمونه‌های دوغ تیمار شده با عصاره هیدرواتانولی رزماری به همراه نمونه شاهد در شکل ۲ نشان داده شده است. مشخص شد که غلظت‌های به کار رفته عصاره هیدرواتانولی رزماری نیز با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند، به طوری که کم‌ترین شمارش میکروبی نیز در تیمار ۰/۷۵ درصد از عصاره این گیاه مشاهده شد ($p<0/05$). در تیمارهای شاهد و ۰/۲۵ درصد با گذشت زمان شمارش کلی به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد، اما غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد توانستند جلوی رشد میکروب‌ها را بگیرند.



شکل۲. تغییرات در شمارش کلی نمونه‌های دوغ حاوی غلظت‌های مختلف عصاره هیدرواتانولی رزماری طی مدت ۹۶ ساعت

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف کوچک مشترک بین ساعت‌های مختلف هر تیمار بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد فاقد تفاوت معنی‌دار هستند. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف بزرگ مشترک بین ساعت‌های یکسان تیمارهای مختلف بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد فاقد تفاوت معنی‌دار هستند

در مورد ویژگی‌های مزه و بو بیش‌ترین و کم‌ترین امتیاز به ترتیب مربوط به نمونه‌های شاهد و حاوی ۰/۷۵ درصد عصاره بود (جدول ۱). در مورد رنگ نیز کم‌ترین امتیاز مربوط به نمونه حاوی ۰/۷۵ درصد بود و بین نمونه‌های شاهد و ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). در کل از نظر مطلوبیت کلی، افراد ارزیاب به نمونه‌های حاوی ۰/۷۵ درصد عصاره هیدرواتانولی رزماری کم‌ترین امتیاز را داده ولی بین نمونه‌های حاوی ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد عصاره با نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری قائل نشدند ($p>۰/۰۵$).

جدول ۱. نتایج آزمون حسی نمونه‌های دوغ حاوی غلظت‌های مختلف عصاره هیدرواتانولی رزماری

غلظت عصاره	ویژگی‌های حسی			
(درصد)	مزه	بو	رنگ	مطلوبیت کلی
۰/۲۵	۳/۷^{b}	۳/۵^{b}	۴/۵^{a}	۴/۱^{a}
۰/۵	۳/۵^{b}	۳/۴^{b}	۴/۲^{a}	۴^{a}
۰/۷۵	۲/۴^{c}	۲/۳^{c}	۳^{b}	۳/۲^{b}
شاهد	۴/۵^{a}	۴/۷^{a}	۴/۹^{a}	۴/۷^{a}

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند

٤. بحث و نتیجه‌گیری

وجود خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدعفونی کنندگی علاوه بر اثرهای درمانی از عوامل توجه طب سنتی به گیاهان دارویی در سال‌های اخیر بوده است. ترکیبات فنلی موجود در بخش‌های مختلف گیاه دارای اثرات مفیدی در سلامت انسان بوده و در بهبود پایداری مواد غذایی نقش دارند (Afonso et al., 2013). در پژوهشی مشخص گردید محتوای فنلی عصاره رزماری را ۷۰/۵۲ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره گزارش نمودند (Afonso et al., 2013)، که به مراتب از عصاره هیدرواتانولی این گیاه کمتر بود. نوع نمونه، نوع حلال و دمای به کار گرفته شده برای استخراج در میزان ترکیبات فنلی نقش دارند. آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در جلوگیری از تغییرات عطر و طعمی و کیفیت مواد غذایی ایفا می‌کنند و همچنین قادرند خطرات ناشی از بیماری-

هایی مانند سرطان و دیابت را کاهش دهند (Cheraghali et al., 2016). غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام عصاره این گیاه با آنتی‌اکسیدان BHA تفاوت معنی‌داری نداشت. ترکیبات فیتوشیمیایی مانند ترکیبات فنلی که در گیاهان یافت می‌شود، نقش مهمی در ایجاد خاصیت آنتی‌اکسیدانی و سلامتی بخشی ایجاد می‌کنند (Noshad et al., 2020). از این رو، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره هیدرواتانولی رزماری را می‌توان به مقادیر بالای فنل آن نسبت داد (Noshad et al., 2020). کلیه غلظت‌های مورد استفاده عصاره هیدرواتانولی رزماری با نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند و بیشترین اختلاف مربوط به نمونه حاوی غلظت ۰/۷۵ درصد از عصاره این گیاه بود. این نتایج نشان می‌دهد که ماده مؤثره عصاره هیدرواتانولی رزماری حتی در غلظت پائین قادر به تأثیرگذاری بر طیف وسیعی از میکروب‌هایی است که در دوغ وجود دارد. در پژوهشی نیز اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی پوست پرتقال بر ماندگاری شیر طعم‌دار را بررسی کردند (Razmjoo et al., 2016). نتایج آن‌ها نشان داد شیر حاوی عصاره نسبت به شیر بدون عصاره دارای اختلاف معنی‌داری بود و از نظر حسی مورد قبول واقع نشد (Razmjoo et al., 2016). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره هیدرواتانولی گیاه رزماری ظرفیت مهارکنندگی رادیکال آزاد آن قابل توجه بود و غلظت ۰/۷۵ درصد عصاره هیدرواتانولی رزماری بیشترین اثر ضدمیکروبی را از خود نشان داد اما از آنجایی که در غلظت مذکور ظاهر، رنگ و طعم دوغ مطلوب نبود، غلظت ۰/۵ درصد به عنوان بهترین تیمار پیشنهاد می‌گردد.

منابع

Abid, H., Ali, J., Waqas, M., Anwar, Y,, Ullah, J. 2009. Microbial quality assessment study of branded and unbranded milk sold in Peshawar City, Pakistan. Pakistan Journal of Nutrition. 8(5): 704-709.

Afonso, M., De O Silva, A.M., Carvalho, E.B.T., Rivelli, D.P., Barros, S.B.M., Rogero, M.M., Rogero, M.M., Lottenberg, A.M., Torres, R.P., Mancini-Filho, J. 2013. Phenolic compounds from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. Nutrition and Metabolism. 10: 1-9.

Cheraghali, F., Mirmoghtadaie, L., ShojaeeAliabadi, S., Hosseini, S.M. 2016. A comprative study of antimicrobial and antioxidant properties of Walnut Green Husk aqueous extract before and after microencapsulation. Iranian Journal of Nutrition Scinces and Food Technology. 11(2): 113-124.

Guler, S., Seker., M. 2009. The effect of cinnamon and guar gum on bacillus cereus population in milk. Journal of Food Processing and Preservation. 33: 415–426.

Maisuthisakul, P., Suttajit, M., Pongsawatmanit, R. 2007. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. Food Chemistry. 100(4): 1409-1418.

Moradi, M., Hassani, A., Sefidkon, F., Maroofi, H. 2015. Chemical composition of leaves and flowers essential oil of *Origanum vulgare* ssp. gracile growing wild in Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 18(1): 242-247.

Nakajima, J.I., Tanaka, I., Seo, S., Yamazaki, M., Saito, K. 2004. LC/PDA/ESI- MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. Journal Biomedical Biotechnology. 5: 241–247.

Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., Dehghani, S. 2020. Improving oxidative and microbial stability of beef by using a bioactive edible coating obtained from Barhang-eSagheerseed mucilage and loaded with Avishan-e-Baghi. Food Science and Technology. 17(4): 1-13.

Razmjoo, M., Khaki, P., Faghih Nasiri, M., Rezaei, K. 2016. Possibility study of multilayer encapsulation by external gelation procedure on the survival of probiotic bacteria undergoing orange juice pasteurization. Iran Journal of Nutrition Scicene Food Technolology. 11 (1): 59-66.

Antioxidant properties of hydro-ethanolic extract of rosemary (*Salvia rosmarinus* L.) and its application in pasteurized buttermilk

Zahra Izadi[1*]

[1] Department of Horticultural Sciences and Engineering, Nahavand Higher Education Complex, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Abstract

Buttermilk is a dairy product that is susceptible to contamination by pathogenic and spoilage microorganisms. One way to control the growth of pathogenic bacteria is to use preservatives and antimicrobial compounds. Due to the general concerns about the side effects of chemical preservatives, there is a tendency to consume products that use natural preservatives. Natural products provide unlimited opportunities for novel and suitable additives. The main objective of this study was to evaluate the antioxidant activitiy of hydro-ethanolic extract of rosemary (*Salvia rosmarinus* L.) at 0.25, 0.5 and 0.75% (w/w) concentrations on the shelf life of pasteurized buttermilk. Antioxidant activity of different concentration of extract were assessed by diphenyl picrylhydrazyl radical-scavenging activity and compared with synthetic antioxidant butylated hydroxyl anisole (BHA). The phenolic content of hydro-ethanolic extract weas 96.47±0.35 mg galic acid/g extract. The treatments of pasteurized buttermilk with 0.5%, acceptable sensory properties had a significantly lower total microbial count and longer shelf life compared to the control sample. Therefore, according to the results, rosemary extract can be used in the food and pharmaceutical industries as a natural antimicrobial and antioxidant agent.

Keywords: Rosemary, Antioxidant activity, Phenol, Hydro-ethanolic extract

[*] E-mail: z.izadi@basu.ac.ir

بررسی درصد روغن و محتوای اسیدهای چرب بذر گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.)

حسینعلی اسدی قارنه*، سحر ایرانی، سیما اعتباریان

گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

چکیده

گیاه دارویی سرخارگل با نام علمی *Echinacea purpurea* L. متعلق به تیره کاسنی است و یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی مورد استفاده در صنایع دارویی می‌باشد. امروزه شناسایی گیاهان دارویی با اسیدهای چرب ضروری، گامی مهم در جهت تامین این ترکیبات برای انسان می‌باشد، چون‌که برخی از اسیدهای چرب در بدن انسان ساخته نمی‌شود و باید از طریق غذاهای مصرفی تامین شود. بنابراین در این پژوهش به بررسی درصد چربی و ترکیبات اسیدهای چرب موجود در این گیاه دارویی پرداخته شد. بدین منظور ۳۸۰ دانهال از این گیاه در شرایط مزرعه کشت و درصد چربی و محتوای اسیدهای چرب آن با استفاده از دستگاه کارماتوگراف گازی بررسی شد. نتایج این مطالعه بیانگر این مطلب بود که ۱۴ اسید چرب اشباع و غیراشباع در بذر این گیاه وجود دارد. بیشترین و کم‌ترین میزان اسید چرب اشباع موجود در این گیاه به ترتیب شامل اسیدلینولئیک (۶۹/۹۴٪) و اسید ترانس اولئیک(۰/۰۵٪) بودند. همچنین بیشترین و کم‌ترین میزان اسید چرب غیراشباع موجود در بذر این گیاه به ترتیب متعلق به اسیدپالمتیک(۸/۳۷٪) و اسید مارگاریک(۰/۰۸٪) بود. مجموع درصد اسیدهای چرب غیراشباع به دست آمده از این گیاه ۷۸/۴۳ ٪ بود. در کل با توجه به میزان نسبتاً بالای اسید لینولئیک در این گیاه می‌توان از آن به‌عنوان منبع ارزشمندی جهت تامین امگا-۶ مورد نیاز انسان بهره برد.

واژگان کلیدی: سرخارگل، درصد روغن، اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع

* h.asadi@khuisf.ac.ir

۱. مقدمه

گیاه دارویی سرخارگل با نام علمی *Echinacea purpurea* L.، علفی و چند ساله متعلق به تیره کاسنی(Asteraceae)، راسته آسترال‌ها[1] و زیرخانواده آستروییده[2] می‌باشد. تیره کاسنی مهم‌ترین تیره گیاهان دانه‌دار بوده و دارای بیش از ۲۰۰۰۰ گونه می‌باشد. گیاه سرخارگل بومی آمریکای شمالی است. ولی امروزه در اکثر نقاط اروپا و آسیا کشت می‌شود. اخیراً این گیاه به‌طور گسترده در ایران کشت می‌گردد و کشت آن در حال گسترش است (امیدبیگی، ۲۰۱۰).

ارتفاع این گیاه متفاوت است و بستگی به شرایط اقلیمی محل رویش دارد، به طوریکه ارتفاع آن به ۸۰ تا ۱۵۰سانتی‌متر می‌رسد. از ریزوم کوتاه این گیاه ریشه‌های بسیاری منشعب می‌شود. ریشه آن مستقیم و کم و بیش منشعب بوده و رنگ آن از قهوه‌ای تیره تا سفید مات متغییر است. ساقه آن استوانه‌ای شکل و رنگ آن به علت وجود آنتوسیانین سبز روشن، آبی و یا حتی قرمز رنگ می‌باشد. ساقه از انشعابات فراوانی برخوردار است و پوشیده از کرک‌های ریز می‌باشد. پای ساقه چوبی، ضخیم، صاف و بدون کرک است (لی[3]،۱۹۹۸). برگ‌های این گیاه پهن، نیزه‌ای یا بیضوی شکل است که دو طرف برگ‌ها پوشیده از کرک‌های زیر و خشن می‌باشد. گلچه‌های زبانه‌ای ارغوانی رنگ، به صورت چرخه‌ای در پیرامون گل مشاهده می‌شوند. طول گلچه‌های زبانه‌ای ۶-۴ و پهنای آن ۰/۶-۰/۴ سانتی‌متر می‌باشد (امیدبیگی، ۱۳۸۱). وزن هزار دانه این گیاه ۳/۸ تا ۴/۵ گرم است (مک گرگور[4]، ۱۹۶۸).

این گیاه در اماکن پرنور، مرطوب و در خاک‌هایی با بافت متوسط، حاصل‌خیز و غنی از ترکیبات هوموسی می‌روید. گیاه سرخارگل سرمای زمستان را تا دمای ۱۰°C- به خوبی تحمل می‌کند (امیدبیگی، ۱۳۸۱).

سرخارگل از جمله گیاهان دارویی مهمی است که کاربرد وسیعی در صنایع دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی دارد(گلادیشوا[5]، ۱۹۹۵). تمام پیکر این گیاه حاوی مواد مؤثره ارزشمندی از قبیل ترکیبات پلی‌ساکاریدی، آلکلیل آمیدی و نیز اسانس می‌باشد (وو و همکاران[6]، ۲۰۰۴، بائر و ریمیجر[7]، ۱۹۸۹). در گذشته از این گیاه برای درمان مارگزیدگی، سرماخوردگی، سرفه، گلودرد و بیماری‌های لثه و دهان استفاده می‌کردند. اما در سال‌های اخیر، توجه محققین به این گیاه بیشتر شده است و تحقیقات انجام گرفته نشان داده‌اند که، این گیاه اثرات بسیار خوبی روی سیستم ایمنی دارد. به طوری که باعث تقویت آن شده و مقاومت بدن را در برابر بیماری‌ها افزایش می‌دهد (بائر و واگنر[8]، ۱۹۹۱). گزارش‌های کمسیون اروپا بیانگر این مطلب بود که فرمولاسیون حاصله از گیاه سرخارگل که به صورت خوراکی یا تزریقی تجویز شده‌اند، منجر به افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون و سلول‌های طحال شده و توانایی فاگوسیتوز توسط گرانولوسیت‌ها را زیاد می‌کنند(استوتزم و همکاران[9]، ۱۹۹۲؛ ملچارت و همکاران[10]، ۱۹۹۴).

---

[1] . Asterales
[2] . Asteroideae
[3] . Li
[4] . McGregor
[5] . Gladisheva
[6] . Wu *et al.*
[7] . Bauer and Remiger
[8] . Bauer and Wagner
[9] . Stotzem *et al.*
[10] . Melchart *et al.*

با توجه به اهمیت اسیدهای چرب در سلامت انسان، صنایع غذایی، بهداشتی و داروسازی روش‌های تهیه و تامین آن از منابع طبیعی و سنتزی دارای اهمیت است. تاکنون بیش از هفتاد اسیدچرب از نسوج مختلف جدا شده که همگی دارای زنجیره هیدروکربنی طولانی با یک عامل کربوکسیل اضافی هستند. بعضی از آنها دارای یک، دو، سه پیوند دوگانه هستند و برخی اشباع شده و گروهی در زنجیر خود دارای شاخه‌های جانبی نیز می‌باشند. فرمول کلی اسیدهای چرب از $CH_3-(CH_2)_n-COOH$ است که n از صفر تا ۴۰ -۳۰ تغییر می‌کند. اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه، برای انسان ضروری می‌باشد و چون بدن انسان قادر به ساختن آن‌ها نیست، بایستی از چربی‌های موجود در غذا آن‌ها را تامین کنند (سیلسکا[1]، ۲۰۱۷).

روغن‌های استحصال شده از گیاهان با تولید کالری بیش از دو برابر در واحد وزن نقش مهمی در تغذیه انسان ایفا می‌نمایند(اورتیز و همکاران[2]، ۲۰۲۰)، این روغن‌ها، اسیدهای چربی به‌همراه دارند که سیستم متابولیسمی انسان قادر به بیوسنتز آنها نبوده و از این نظر جزء اسیدهای چرب ضروری می‌باشند از طرف دیگر با داشتن گروهی از ویتامین‌ها(K, B, E و A)، جذب سایر عناصر حیاتی را امکان‌پذیر می‌نماید (سینگ و همکاران[3]، ۲۰۲۰). همچنین محتوی ترکیبات و اجزای فعال زیستی شامل لیگنان‌ها، اسید لینولنیک و دیگر ترکیبات ضروری سبب کاهش سرعت تشکیل کلون‌های سرطانی می‌شوند (چائوخان و همکاران[4]، ۲۰۲۰). از طرفی کمبود امگا-۳ در بدن عوارضی از قبیل لاغری، خشکی پوست و آسیب به بینایی را به‌همراه دارد(اسدی و همکاران، ۱۳۹۲).

ازجمله روش‌های دستیابی به اسیدچرب، منابع گیاهی می‌باشد که به علت فقدان اطلاعات لازم و کافی درمورد ترکیبات و ساختار شیمیایی آن‌ها کمتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. اسیدهای چرب ترکیبات ساختاری دیواره سلولی هستند که نقش بحرانی در انتقال ژن، علامت‌دهی و متابولیسم ایفا می‌کنند (فولچ و لیز[5]، ۱۹۵۷). سازمان بین المللی استاندارد در سال ۱۹۹۷ چربی‌ها و روغن‌های حیوانی را به وسیله کروماتوگرافی گازی[6] متیل استرهای اسیدچرب تجزیه نمودند. امروزه تخمین و تشخیص اسیدهای چرب به وسیله روش‌های کروماتوگرافی انجام می‌شود، برای این منظور اسیدهای چرب را به وسیله عمل هیدرولیز از ترکیب لیپیدی جدا کرده، سپس آن را به صورت متیل استر درآورده، با عبور دادن گازی بی اثر مثل نیتروژن و حرارت دادن تدریجی ستون استرهای متیله، اسیدهای چرب که به صورت بخار درآمده یکی بعد از دیگری از ستون خارج می‌شوند و با سرعت متناسب ضریب انتشار آن‌ها در بین فاز گازی و فاز مایع خارج می‌شود (بخشی خانیکی، ۱۳۸۸).

هدف از انجام این تحقیق استخراج و تعیین میزان اسیدهای چرب بذر گیاه سرخارگل می‌باشد. چون طی تحقیقات به عمل آمده تاکنون پژوهشی درباره اسیدهای چرب بذر گیاه سرخارگل گزارش نشده است.

[1] . Silska
[2] . Ortiz *et al.*
[3] . Singh *et al.*
[4] . Chao-Khun *et al.*
[5] . Folch and Lees
[6] . Gas Chromatography

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. منطقه مورد مطالعه

این پژوهش در سال ۱۴۰۱ در شهرستان نجف‌آباد استان اصفهان با مختصات جغرافیایی ۳۲ درجه و ۳۸ دقیقه شمالی و ۵۱ درجه و ۲۱ دقیقه شرقی با ۱۶۰۰ متر ارتفاع از سطح دریا انجام شد. قبل از کشت دانهال‌های سرخارگل، ابتدا نمونه‌گیری از آب و خاک مزرعه صورت گرفت و به آزمایشگاه اصفهان فاریاب جهت آنالیز منتقل گردید که نتایج آن در جداول ۱ و ۲ گزارش شده است.

جدول ۱. آنالیز آب مورد استفاده برای آبیاری گیاهان سرخارگل

SAR	TSS	TDS	B	SO_4	CL	HCO_3	K	Na	Mg	Ca	PH	Ec
	ppm	ppm	ppm	Meq/l	Meq/l	Meq/l	Meq/l	Meq/l	Meq/l	Meq/l		ds/m
۷/۱۷	۰/۰۲۵	۱۳۴۴	۰/۸۲	۳/۷	۱۲/۵	۴/۸	۰/۲	۱۳/۷	۲/۸	۴/۵	۷/۶	۲/۱

جدول۲. آنالیز خاک محل انجام پژوهش

Texture	Sand	Silt	Clay	K(ava)	P(ava)	N	OC	$CaSO_4$	TNV	SP	PH	Ec
	%	%	%	ppm	ppm	%	%	%	%	%		ds/m
Clay Loam	۴۲	۲۷	۳۱	۲۱۰	۲۵	۰/۰۷	۰/۷۱	۰/۰۶	۴۶	۴۸	۷/۹	۲/۸

۲.۲. روش تحقیق

عملیات آماده‌سازی زمین قبل از کاشت دانهال‌های گیاه سرخارگل شامل، شخم و افزودن کود دامی کاملا پوسیده (۱۰۰ گرم کود به ازای هر بوته) و مخلوط کردن آن با خاک مزرعه بود و در نهایت زمین تسطیح شد. سپس ۳۸۰ دانهال از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی استان اصفهان تهیه گردید و در فروردین ماه در زمینی به مساحت ۱۰۰ متر مربع با فواصل ۵۰×۵۰ سانتی‌متراز یکدیگر کشت شدند. آبیاری بوته‌ها به صورت قطره‌ای و هفتگی انجام گرفت و نهایتا گل‌ها اواسط تابستان ظاهر شدند. عملیات بذرگیری به صورت دستی و زمانی انجام گرفت که کاپیتول‌ها کاملا خشک شده بودند. سپس به منظور تعیین درصد روغن بذر و اسیدهای چرب موجود در آن، ۱۰۰ گرم بذر به صورت تصادفی از مزرعه جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه گروه علوم باغبانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) منتقل گردید.

جهت اندازه‌گیری و استخراج روغن ابتدا بذور جمع‌آوری شده آسیاب شدند. سپس پودر بذور با استفاده از روش سوکسله (دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و حلال هگزان) روغن‌گیری شد. حلال موجود در روغن استخراج شده با استفاده از آون (متعلق به

شرکت ممرت[1] آلمان) تحت شرایط خلا در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد جداسازی نموده و از این طریق درصد روغن بذور به‌دست آمد(جکسوی و همکاران[2]، ۲۰۰۴).

برای آنالیز پروفایل اسیدهای چرب، مقدار یک میکرولیتر از نمونه متیل‌استر شده توسط سرنگ میکرولیتری به دستگاه گاز کروماتوگرافی GC/FID[3] تزریق شد. دستگاه گاز کروماتوگرافی (مدل Unicam ۴۶۰۰) ساخت کشور انگلستان مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله هیدروژن(FID) و ستون موئینه ستون موئینه(Australia، SGE Melbourn، Bpx 70) از جنس سیلیکای ذوب شده(طول ستون ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۲ میلی‌متر و ضخامت فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر) بود. از گاز هلیوم با درصد خلوص ۹۹/۹۹۹ به‌عنوان گاز حامل استفاده شد. پس از تبدیل اسیدهای چرب به مشتق متیل‌استر، نمونه‌ها به دستگاه تزریق شدند. گاز هلیوم با سرعت جریان ۴ میلی‌لیتر بر دقیقه، برنامه دمای ستون شامل ۱۴۰ درجه به‌مدت ۵ دقیقه، سپس با سرعت ۲۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه تا زمانی‌که دما به ۱۸۰ درجه رسید، ۹ دقیقه در این دما باقی ماند و سپس با سرعت ۲۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به ۲۱۰ درجه افزایش یافت و تا پایان، در همین دما نگه داشته شد. دمای محل تزریق ۲۵۰، دمای آشکارساز ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و مقدار تزریق نمونه ۱/۲ میکرولیتر بود(بدوی و همکاران، ۱۳۹۷). پژوهش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی انجام پذیرفت.

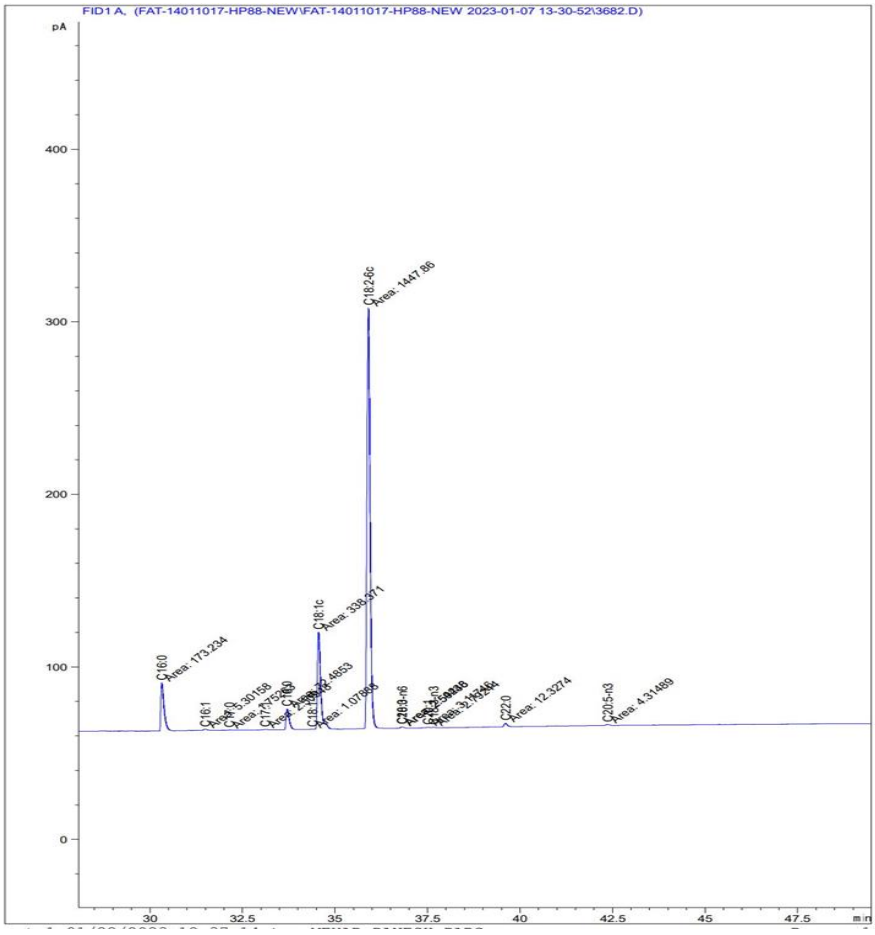
۳. نتایج

میزان درصد چربی کل روغن استخراج شده از نمونه گیاه سرخارگل معادل ۱۷/۳ درصد به‌دست آمد. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه اسیدهای چرب توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی، پنج اسید چرب اشباع در بذر گیاه سرخارگل مشاهده شد و میزان هر یک از آن‌ها تعیین گردید.

عمده‌ترین اسید چرب اشباع به‌دست آمده در این پژوهش پالمتیک اسید(C16:0) به میزان(۸/۳۷٪) می‌باشد. پالمتیک اسید می‌تواند به کاهش پیری سطح پوست کمک کند و همچنین به عنوان یک سورفاکتانت در صابون و مواد پاک‌کننده بکار برده می‌شود. بنابراین می‌توان از آن در محصولات آرایشی و بهداشتی استفاده کرد. از دیگر فواید این اسید چرب اشباع می‌توان به خواص ضد آترواسکلروزی و آنتی‌اکسیدانی خفیف آن اشاره نمود (بنویت و همکاران[4]، ۲۰۰۹). سایر اسیدهای چرب اشباع شناسایی‌شده عبارتند از: مارگاریک اسید(C17:0)، استئاریک اسید(C18:0)، آراشیدیک اسید(C20:0) و بهینیک اسید(C22:0)، که استئاریک اسید برای تولید مکمل‌های غذایی استفاده می‌شود. در مطالعات صورت گرفته مشخص گردید که این اسید چرب اشباع میزان کلسترول LDL را کاهش می‌دهد (تبرسا و همکاران[5]، ۲۰۱۲).

[1] . Memmert
[2] . Goksoy *et al.*
[3] . First Imput Delay
[4] . Benoit *et al.*
[5] . Tabarsa *et al.*

بیشترین اسید چرب غیر اشباع مشاهده شده در این پژوهش مربوط به لینولئیک اسید (C18:2) به میزان(۶۹/۹۴٪) می‌باشد. حداقل میزان مورد نیاز اسید لینولنیک (امگا- ۳) و اسید لینولئیک(امگا- ۶) که به‌طور روزانه از طریق رژیم غذایی باید برای انسان تامین شود، میزان ۱/۵ گرم از هر کدام است (وینتراب و همکاران[1]، ۱۹۹۸). سایر اسیدهای چرب غیراشباع مشاهده شده در بذر گیاه سرخارگل شامل اولئیک اسید(C16:1)، (C18:1 n-9)، (C18:3 n-3)، (C18:3 n-6)، (Trans-C18:1 n-9)، (C17:1 n-7)، (C20:1 n-9) و (C20:5 n-3) بود. که در شکل ۱، کارماتوگرام مربوط به اسیدهای چرب موجود در بذر این گیاه آورده شده است. اسیدهای چرب در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. به‌طور نمونه در محصولات آرایشی از اولئیک اسید به‌عنوان یک مرطوب‌کننده بسیار موثر استفاده می‌شود. علاوه بر آن غذاهای حاوی این اولئیک اسید منجر به کاهش فشار خون و سوزاندن چربی شده و همچنین منجر به کاهش دیابت نوع دوم می‌شود (تریس و همکاران[2]، ۲۰۰۸).



شکل ۱. کارماتوگرام مربوط به اسیدهای چرب موجود در بذر گیاه دارویی سرخارگل

[1] . Weintraub *et al.*
[2] . Terés *et al.*

نتایج حاصل از آنالیز اسیدهای چرب حاکی از آن بود که مجموع درصد اسیدهای چرب اشباع گیاه سرخارگل نسبت به اسیدهای چرب غیراشباع بسیار کمتر است به‌طوری که مجموع درصد اسیدهای چرب غیراشباع به‌دست آمده از این گیاه ۷۸/۴۳٪ می‌باشد. بنابراین می‌توان از این گیاه در رژیم غذایی انسان استفاده کرد.

نتایج به دست آمده نشان داد میزان اسید لینولئیک اختلاف زیادی با سایر اسیدهای چرب موجود در بذر سرخارگل دارد. علاوه بر آن، میزان لینولنیک اسید(۰/۱۳٪) و سیتولئیک اسید(۰/۱۳٪) در بذر این گیاه یکسان می‌باشد. همچنین تفاوتی در میزان هپتادکونیک اسید(۰/۱۲٪) و آراشیدیک اسید(۰/۱۲٪) مشاهده نشد. با مقایسه نتایج بدست آمده از آنالیز اسیدهای چرب گیاه سرخارگل و پژوهش منظمی و همکاران (۱۳۷۶) بر روی تعدادی از گیاهان این تیره به ترتیب بیشترین میزان اسید لینولئیک متعلق به گلرنگ وحشی، سرخارگل و کنگر معمولی می‌باشد. همچنین مشاهده شد، اسیدچرب غالب درکنگر فرنگی وحشی و کنگر صحرایی، اسید اولئیک می‌باشد که میزان آن به ترتیب ۴۷/۷٪ و ۳۷/۵۵٪ به‌دست آمد. اسید آراشیدیک و اسید پالمیتولئیک در گیاهان کنگر فرنگی وحشی، کنگر معمولی و گلرنگ وحشی مشاهده نشد. علاوه بر آن بیشترین میزان درصد چربی مشاهده شده متعلق به کنگر فرنگی وحشی و کم‌ترین آن مربوط به گلرنگ وحشی می‌باشد.

جدول۳. درصد چربی و ترکیبات اسیدهای چرب در چند گیاه مختلف

ترکیب	سرخارگل	کنگر فرنگی وحشی	کنگر معمولی	کنگر صحرایی	گلرنگ وحشی
چربی	۱۷/۳	۴۳/۵	۴۱/۳۵	۴۲/۶	۱۶/۳۰
اسید لینولئیک (٪)	۶۹/۹۴	۲۲/۶	۶۰/۱۵	۲۱/۶	۷۴/۰۳
اسید اولئیک (٪)	۱۶/۳۴	۴۷/۷	۲۸/۳۵	۳۷/۵۵	۱۸/۰۵
اسید استئاریک (٪)	۳/۵	۴/۶۳	۲/۲۳	۹/۹۵	۱/۲۵
اسید پالمتیک (٪)	۸/۳۷	۲۵/۰۸	۹/۲۸	۲۸/۳۵	۴/۶۸
اسید آراشیدیک (٪)	۰/۱۲	–	–	۰/۹۷	–
اسید پالمیتولئیک (٪)	۰/۲۶	–	–	۱/۵۸	–
رفرنس		(منظمی وهمکاران ، ۱۳۷۶)	(منظمی و همکاران، ۱۳۷۶)	(منظمی و همکاران، ۱۳۷۶)	(منظمی وهمکاران ، ۱۳۷۶)

٤. بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تحقیق (دینی ترکمانی و کارپتیان، ۱۳۸۶) بر روی ده رقم کنجد نشان داد که میانگین کل روغن دانه به‌دست آمده بر مبنای وزن خشک به روش سوکسله برابر ۵۱/۱۶ درصد می‌باشد و میانگین ترکیب پنج اسید چرب مهم آن شامل پالمیتیک اسید، استئاریک اسید، اولئیک اسید، لینولئیک اسید و لینولنیک اسید به‌ترتیب ۸/۹۹، ۵/۹۸، ۴۴/۴۷، ۳۹/۶۹ و ۰/۸۷ اندازه‌گیری شد. ناظری و همکاران(۱۳۹۵) بیان کردند که پالمتیک اسید(۶/۵٪-۵/۵٪)، استئاریک اسید(۵/۱٪-۰/۵٪)، اولئیک اسید(۲۸/۱٪-۲۱/۹٪)، لینولئیک اسید(۶۶/۸٪-۱۵/۴٪)، و لینولنیک اسید(۴۵/۷٪-۲٪) اجزای اصلی اسید چرب موجود در بذر کتان و کتان سفید است. رنجزاد و همکاران(۲۰۰۹) طی پژوهشی نشان دادند که میزان اسیدهای چرب ضروری امگا- ۳ و امگا- ۶ در اغلب گونه‌های وحشی و زراعی مورد مطالعه جنس کتان بسیار بیشتر از مقدار این اسیدهای چرب حیاتی در دانه‌های روغنی رایج کشت شده مانند آفتابگردان و کلزا بود.

در روغن استخراج شده از بذر گیاه سرخارگل ۱۴ اسید چرب شناسایی شد که از بین آنها اسید لینولئیک، اسید اولئیک، اسید پالمتیک و اسید استئاریک بیشترین میزان را نسبت به سایر اسیدها به خود اختصاص داده بودند. همچنین بیشترین میزان اسید چرب اشباع و غیراشباع مشاهده شده به‌ترتیب متعلق به پالمتیک اسید(۸/۳۷٪) و لینولئیک اسید(۶۹/۹۴٪) بود و کم‌ترین میزان اسید چرب اشباع و غیراشباع به‌دست آمده به‌ترتیب مختص به مارگاریک اسید(۰/۰۸٪) و ترانس اولئیک اسید(۰/۰۵٪) می‌باشد. نتایج حاصل حاکی از آن بود که مجموع درصد اسیدهای چرب غیراشباع از اسیدهای چرب اشباع بیشتر است. امروزه نقش اسیدهای چرب اشباع در گسترش بیماری‌های قلبی- عروقی به اثبات رسیده است، در حالی‌که اسیدهای چرب غیراشباع به عنوان بازدارنده بیماری شناخته می‌شود. بنابراین بذر گیاه سرخارگل به واسطه‌ی داشتن مقادیر کم‌تر اسیدهای چرب اشباع، منبع مناسبی برای استفاده در رژیم غذایی می‌باشد.

اسید چرب امگا- ۶ اسید چرب غیراشباع است که در بدن انسان سنتز نمی‌شود و با رعایت رژیم غذایی می‌توان در اختیار قرار گیرد. لینولئیک اسید دارای اثرات ضدسرطانی است. از علائم کمبود اسید چرب ضروری امگا-۶ می‌توان به بیماری پوستی، ریزش مو، تحلیل کبد و کندی رشد اشاره کرد. بنابراین می‌توان با مصرف اسید چرب ضروری امگا- ۶ به درمان آن‌ها کمک کرد (اسدی و همکاران ۱۳۹۱).

مقایسه درصد لینولئیک اسید گیاهان روغنی کنجد و کتان با نتایج حاصل از پژوهش حاضر بیانگر این مطلب می‌باشد که گیاه سرخارگل نسبت به این گیاهان روغنی میزان بالاتری امگا ۶ دارد و درنتیجه منبع مهمی از این اسید چرب می‌باشد. بنابراین می‌توان از بذر گیاه دارویی سرخارگل به‌عنوان منبع مناسبی جهت تامین امگا-۶ مورد نیاز انسان بهره برد.

منابع

اسدی، ط.، بارگاهی، ا.، محبی، غ.م.، برمک، ع.ر.، نبی‌پور، ا.، مهاجری برازجانی، س.، خلدبرین، ب.۱۳۹۲. تعیین غلظت روغن و اسیدهای چرب موجود در بذر گیاه ساحلی شوره زیست *Sueada aegyptica*. فصلنامه طب جنوب. ۱۶(۱)، ۹-۱۶.

امیدبیگی، ر. ۱۳۸۱. بررسی کشت و سازگاری سرخارگل(*Echinaceae purpurea*) در شمال تهران. علوم وفنون کشاورزی و منابع طبیعی. ۶(۲): ۲۳۱- ۲۴۰.

بخشی‌خانیکی، غ.ر.۱۳۸۸. بررسی اسیدهای چرب غیراشباع در دانه ریحان(*Ocimum basilicum* L.). فصلنامه داروهای گیاهی. ۱، ۴۱-۴۵.

بدوی، م.، محمودی سورستانی، م.، ذوالفقاری، م.و، اشرف جعفری، ع. ۱۳۹۷. مقایسه عملکرد دانه، کمیت و کیفیت روغن ارقام و توده‌های مختلف کتان روغنی(*Linum ustatissimum* L.). علوم باغبانی ایران. ۴۹(۴): ۹۹۳- ۱۰۰۲.

دینی‌ترکمانی، م.ر.، کاراپتیان، ژ. ۱۳۸۶. بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مهم دانه در ده رقم کنجد(*Sesamum indicum* L.). مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۰(۴): ۳۲۷- ۳۳۳.

منظمی، چ.، صیامی، ع، حیدری، ر. ۱۳۷۶. بررسی سیستماتیکی و بیوشیمیایی چند گیاه از تیره کاسنی *Compositae Asteraceae*. وزارت علوم، تحقیقات و فناوری.دانشگاه ارومیه.

ناظری، ن.، کیانی، ر.، رضایی، ک.ا.، کلوندی، ر. ۱۳۹۶. بررسی تنوع اکولوژیک، مورفولوژیک و ترکیب‌های اسید چرب گیاه کتان سفید(*Linum album* Ky. Ex Boiss.). دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران.۳۳(۱): ۱۶۸-۱۸۴.

Bauer, R., Wagner, H. 1991. Echinacea species as potential immunostimulatory drugs. In: Wagner, H., Farnsworth, N.R(Ed.). Economic and Medicinal Plants Research. Academic Press. London. pp. 253 - 321.

Bauer, R., Remiger, P. 1989. TLC and HPLC analysis of alkylamides in Echinaceae druge. Plant Medica. 55: 367-371.

Folch, j., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. The journal of biological chemistry. 226: 497-509.

Gladisheva, O.N. 1995. Experimental studies on production and processing technology and establishment of raw material uses and seed plantation of *E. Purpurea* under samara region, Russian Academy of Agricultural Science.

Goksoy, A.T.A.O., Demir, Z.M.T., Dagustu, N. 2004. Responses of sunflower to full and limited irrigation at different growth stage. Field crops Research. 87: 167-178.

Li, T.S.C. 1998. Echinaceae: Cultivation and medicinalvalue. Hor Technol. 8(2):122-129.

Mc Gregor, R.L. 1968. The taxonomy of the genus Echinaceae (Compositae). Univ. Sci. Bul. 48: 113-142.

Melchart, D., Linde, K., Worku, F., Bauer, R., Wagner, H. 1994. Immunomodulation with Echinacea a systematic review of controlled clinical trials. Phytomed. 1: 245 - 254.

Omidbaigi, R. 2010. Production and Processing of Medicinal Plants. Astane Ghodse Razavi Press, Mashhad, Mashhad, Iran.

Ortiz, R., Geleta, M., Gustafsson, C., Lager, I., Hofvander, P., Lofsted, C., Cahoon, E., Minina, E., Bozhkov, P., Stymne, S. 2020. Oil crops for the future. Current Opinion in Plant Biology. 56 (2): 181-189.

Ranjzad, M., Khayyami, M., Asadi, A. 2009. Measuring and investigation of omega 3 and 6 fatty acids in species of Linum ssp. Journal of Medicinal Plants. 8(32): 25-32.

Silska, G. 2017. Genetic resources of flax (*Linum usitatissimum* L.) as very rich source of α-linolenic acid. Herba Polonica, 63 (4): 26-33.

Teres, S., Barcelo-Coblijn, G., Benet, M., Alvarez, R., Bressani, R., Halver, J.E., Escriba, P.V. 2008. Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. *Proc.* Natl. Acad. Sci. USA.*105*: 13811–13816.

Tabarsa, M., Rezaei, M., Ramezanpour, Z., Waaland, J.R., Rabiei, R. 2012. Fatty acids, amino acids, mineral contents and proximate composition of some brown seaweed. Journal of Phycologe. 48(2): 285 -292.

Weintraub, M.S., Zechner, R., Brown, A. 1998. Dietary polyunsaturated fat of the omega -6 and omega -3 series reduces postprandial lipoprotein levels. J Clin Invest. 82: 188 -193.

Wu, L., Bea, J., Kraus, G., Wurtele, E. S. 2004. Diacetylenic isobutylamides of Echinacea synthesis and natural distribution. Phytochemistry. 65: 2477-2484.

Investigation of oil percent and fatty acid content in Seeds of purple coneflower (*Echinacea purpurea L.*) medicinal plant

, Sahar Irani, Sima Etebarian[*]Hossein Ali Asadi-Gharneh

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Abstract

The scientific name of purple coneflower is *Echinacea purpurea L.* and belongs to the chicory family and is one of the most important medicinal plants used in the pharmaceutical industry. Today, identification of medicinal plants with essential fatty acids is an important step in the direction of supplying these acids to humans because some fatty acids cannot be produced in the human body and must be supplied through consumed foods. Therefore, in this research, the percentage of fat and the composition of fatty acids in this plant were investigated. For this purpose, 380 seedlings of this plant were grown and fat percentage and fatty acid content were measured using gas chromatograph. The results of this research showed that there are 14 saturated and unsaturated fatty acids in the seeds of this plant. The highest and lowest amount of unsaturated fatty acids in seeds of this plant include linoleic acid (69.94%) and trans-oleic acid (0.05%), respectively. Also, the highest and lowest amount of unsaturated fatty acid in this plant belonged to palmitic acid (8.37%) and margaric acid (0.08%), respectively. The total percentage of unsaturated fatty acids obtained from this plant is 78.43%. In general, due to the relatively high amount of linoleic acid in this plant, it can be used as a suitable source for supplying omega-6 needed by humans.

Keywords: Purple coneflower, oil percentage, Saturated and Unsaturated fatty acids

[*] e-mail for the corresponding author: h.asadi@khuisf.ac.ir

بررسی رشد گیاه بادرنجبویه تحت تأثیر متابولیت‌های باکتری *Pseudomonas chlororaphis* در کشت درون شیشه‌ای

معظمه حسینی عباس‌آبادی[۱]، مریم دهجی‌پور حیدرآبادی[۲*]، روح‌اله صابری ریسه[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان
[۲] استادیار گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان
[۳]استادگروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان

چکیده

استفاده از باکتری‌های محرک رشد در کشاورزی، به‌عنوان یک روش نوین زیستی و دوستدار محیط زیست، نقش مهمی در بهبود عملکرد و افزایش رشد در گیاهان ایفا می‌کند. در این پژوهش تأثیر غلظت‌های مختلف متابولیت‌های باکتری *Pseudomonas chlororaphis* بر پارامترهای رشدی مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور آزمایشی با استفاده از متابولیت‌های باکتری با غلظت‌های ۰، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ درصد (V/V) در کشت درون شیشه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. نتایج این پژوهش نشان داد که متابولیت‌های باکتری در غلظت ۰/۳ درصد تعداد برگ و تعداد گره را نسبت به شاهد کاهش داد. هم‌چنین تأثیر غلظت‌های مختلف متابولیت‌های باکتری بر افزایش طول بلندترین و کوتاهترین میانگره در گیاهچه‌ها نسبت به شاهد معنی‌دار بود. براساس نتایج این پژوهش، استفاده از متابولیتهای باکتری، جهت بهبود رشد گیاهان دارویی در شرایط کنترل شده پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: بادرنجبویه، کشت درون شیشه‌ای، متابولیت‌های باکتری، محرک رشد گیاهی

[*] ایمیل نویسنده مسئول: m.dahaji@vru.ac.ir

۱. مقدمه

در دهه‌های اخیر با به‌کارگیری کودها و آفت‌کش‌های معدنی علی‌رغم دستیابی به افزایش باردهی محصولات کشاورزی، مشکلات زیست محیطی و ظهور مقاومت به بیمارگرها نیز افزایش یافته است. بنابراین، نیاز برای استفاده از تکنولوژی‌های میکروبی دوستدار محیط زیست مانند استفاده از باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه (PGPR)[1] رواج یافته است. باکتری‌های محرک رشد گیاهی به‌عنوان یکی از راه‌های بهبود رشد گیاه محسوب می‌شوند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به باکتری‌های جنس سودوموناس[2]، باسیلوس[3]، آزوسپریلیوم[4]، بوخلدریا[5]، آرتروباکتر[6] و اروینیا[7] اشاره نمود. این باکتری‌ها نقش مهمی در نگهداری محصولات و سلامت خاک از طریق مکانیسم‌هایی شامل جذب مواد غذایی، جلوگیری از بیمارگرهای گیاهی، القای مقاومت در گیاه میزبان و تحریک رشد گیاه ایفا می‌کنند (Tennakoon et al., 2019). استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه به‌عنوان محرک‌های زیستی[8] برای بهبود رشد و عملکرد گیاه، به‌عنوان یک استراتژی پاک و کارآمد، تحت شرایط عادی و هم‌چنین شرایط نامطلوب شناخته شده است (Thakur et al., 2019). باکتری *P. chlororaphis* یکی از مؤثرترین باکتری‌ها در این گروه است که با تولید سیدروفورها و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، از طریق افزایش جذب فسفر توسط گیاه، تثبیت نیتروژن و سنتز آنزیم‌های تنظیم‌کننده مقدار اتیلن در گیاه، رشد، نمو و عملکرد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Hol et al., 2013). تلقیح گیاه نعناع فلفلی توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه، افزایش تولید اسانس‌های بتاپینن، پولگون و منوترپن‌ها را موجب شد. هم‌چنین افزایش متابولیت‌های ثانویه در حضور باکتری‌های محرک رشد گیاه به افزایش تولید ماده‌ی خشک ارتباط داده شده است (Rizvi et al., 2022). استفاده از باکتری محرک رشد سودوموناس فلورسنس در گیاه دارویی بذرالبنج افزایش رشد و تولید هیوسیامین را به دنبال داشت (Ghorbanpour and Hatami, 2014). گیاه دارویی بادرنجبویه *Melissa officinalis* L. از خانواده Lamiaceae، منبعی غنی از متابولیت‌های ثانویه مختلف، اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، ترپن‌ها، روغن‌های فرار و تانن‌ها است (Shakeri et al., 2016). در اکثر پژوهش‌های انجام شده باکتری‌های محرک رشد به‌طور مستقیم استفاده شده است. در این پژوهش برای اولین بار اثر غلظت‌های مختلف متابولیت‌های باکتری *P. chlororaphis* درکشت درون شیشه‌ای گیاه بادرنجبویه مورد بررسی قرار گرفته است.

[1] Plant Growth-Promoting Rhizobacteria
[2] Pseudomonas
[3] Bacillus
[4] Azospirillum
[5] Burkholderia
[6] Arthrobacter
[7] Erwinia
[8] Bio-elicitors

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیه متابولیت‌های باکتری

کشت جامد باکتری *P. chlororaphis* در محیط کشت KB[1] و سپس محیط کشت مایع با استفاده از شیکر جهت رشد باکتری و تولید متابولیت انجام شد. جداسازی متابولیت‌ها (حذف سلول‌های باکتری) با صاف نمودن محیط کشت مایع باکتری با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرون صورت گرفت.

۲.۲. تهیه مواد گیاهی و تیمارها

این آزمایش در شرایط کنترل شده در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان اجرا شد. جوانه زنی بذرها بعد از ضدعفونی نمودن سطحی آن‌ها، با محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه و سپس اتانول ۷۰٪ به مدت یک دقیقه و بعد از هر مرحله سه بار آبکشی با آب مقطر استریل، در تاریکی و دمای ۲۲°C در محیط کشت حاوی آب و آگار انجام شد. پس از ظهور برگ‌های لپه‌ای گیاهچه‌های یکنواخت انتخاب و به محیط MS دارای متابولیت‌های باکتری با غلظت‌های ۰، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ درصد (V/V) با اسیدیته معادل ۵/۷ منتقل شدند. سپس به مدت ۵۰ روز در اتاقک‌های رشد با شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲۵°C قرار داده شدند. بعد از گذشت ۵۰ روز بخش هوایی گیاهان برداشت و صفات تعداد برگ در گیاه، تعداد گره در گیاه، طول بلندترین میانگره و طول کوتاه‌ترین میانگره در گیاه با خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد.

۳. نتایج

گیاهان انتقال یافته به محیط شاهد و محیط‌های دارای غلظت‌های مختلف متابولیت باکتری با گذشت زمان رشد مناسبی را از خود نشان دادند (شکل ۱).



(الف) (ب) (ج) (د)

شکل ۱. رشد گیاهچه‌های بادرنجبویه در محیط حاوی غلظت‌های مختلف متابولیت باکتری. الف) شاهد، ب) ۰/۳ درصد، ج) ۰/٤ درصد و د) ۰/۵ درصد.

[1] King's B

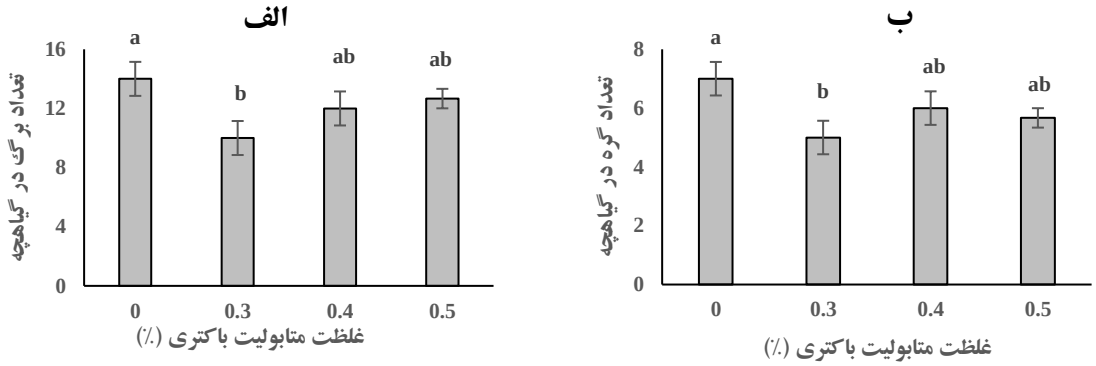
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف متابولیت باکتری *P. chlororaphis* بر تعدادبرگ، تعداد گره در گیاهچه‌های بادرنجبویه از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. در حالی‌که اثر غلظت‌های مختلف متابولیت باکتری بر طول بلندترین میانگره و طول کوتاه‌ترین میانگره در گیاهچه‌های بادرنجبویه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۱).

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف متابولیت باکتری *P. chlororaphis* بر تعدادبرگ، تعداد گره، طول بلندترین میانگره و طول کوتاه‌ترین میانگره در کشت درون شیشه‌ای بادرنجبویه

		میانگین مربعات			
منابع تغییر	درجه آزادی	تعدادبرگ	تعداد گره	طول بلندترین میانگره	طول کوتاه‌ترین میانگره
تیمار	۳	۸/۳۳ ns	۲/۰۸ ns	۰/۹۳۹ **	۰/۹۷۹ **
خطا	۸	۳/۳۳	۰/۸۳	۰/۰۷	۰/۰۱
درصد ضریب تغییرات		۱۴/۹۹	۱۵/۱۸	۹/۰۶	۸

**** و ns به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۱ درصد و عدم تفاوت معنی‌دار**

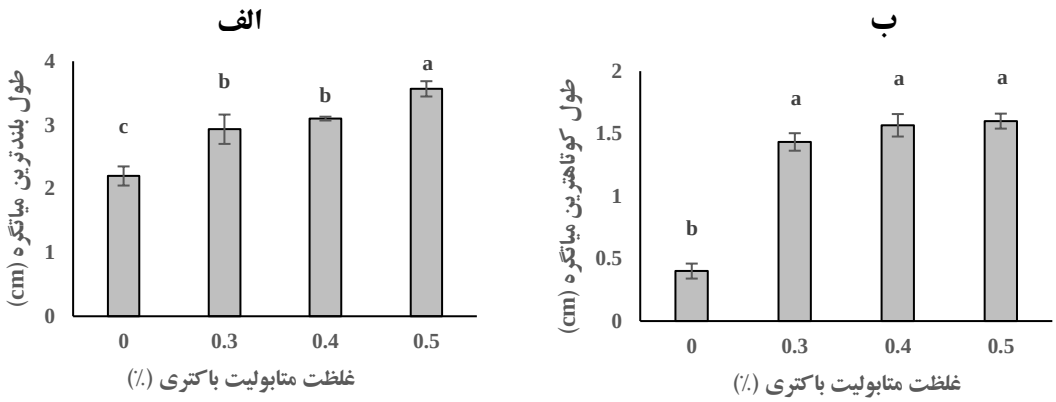
چنان‌چه در شکل ۲ نشان داده شده است تعداد برگ و تعداد گره در غلظت ۰/۳٪ متابولیت باکتری نسبت به شاهد کاهش یافت. درحالی‌که کاهش تعداد برگ و تعداد گره در غلظت‌های ۰/۴٪ و ۰/۵٪ نسبت به شاهد معنی‌دار نبود.



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف متابولیت‌های باکتری *P. chlororaphis* بر تعداد برگ (الف) و تعداد گره (ب) در گیاهچه‌های بادرنجبویه. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال $p \leq ۰/۰۵$ اختلاف معنی‌داری ندارند.

براساس نتایج ارائه شده در شکل ۳، با افزایش غلظت متابولیت‌های باکتری *P. chlororaphis*، طول بلندترین میانگره نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد. بیشترین افزایش در غلظت ۰/۵٪ مشاهده شد که نسبت به شاهد ۱/۶ برابر افزایش نشان داد. افزایش طول میانگره در غلظت‌های ۰/۳٪ و ۰/۴٪ به ترتیب ۱/۳ و ۱/۴ برابر بود (شکل ۳). طول کوتاهترین

میانگره نیز در گیاهان رشد یافته در حضور تمام غلظت‌های متابولیت‌های باکتری نسبت به شاهد ۴-۳/۵ برابر افزایش نشان داد. اگرچه تأثیر متابولیت‌های باکتری بر طول میانگره در غلظت‌های مختلف از لحاظ آماری ($p \leq ۰/۰۵$) تفاوت معنی‌داری نبود (شکل ۳).



شکل ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف متابولیت‌های باکتری *P. chlororaphis* بر طول بلندترین میانگره (الف) و طول کوتاهترین میانگره (ب) در گیاهچه‌های بادرنجبویه. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال $p \leq ۰/۰۵$ اختلاف معنی‌داری ندارند.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

باکتری‌های محرک رشد با تأثیر بر مقدار و جابجایی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، می‌توانند تحریک رشد و مقاومت به تنش را در گیاهان مختلف موجب شوند. اکسین و اسید جیبرلیک از اصلی‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی موجود در متابولیت باکتری‌های محرک رشد، که توسط ۸۰٪ این باکتری‌ها ترشح می‌شوند، فرایندهای فیزیولوژیکی مختلفی مانند رشد، تقسیم و تمایز، تنظیم ژن و پاسخ به تغییرات محیطی را کنترل می‌کنند (Carey and Krogan, 2017؛ Rizvi et al., 2022). نتایج مطالعات نشان داده است که گونه‌های مختلف جنس سودوموناس از طریق تولید سیدروفور، افزایش جذب فسفر، تثبیت نیتروژن و تولید تحریک کننده‌های رشد نظیر اکسین و اسید جیبرلیک، با افزایش تعداد و طول سلول‌های گیاهی افزایش رشد طولی گیاهچه‌ها را موجب می‌شوند (Saghfi et al., 2013). نتایج خانی‌زاده و همکاران (۱۳۹۸) نشان داد کاربرد باکتری‌های *P. fluorescens* و *P. putida* با توسعه سیستم ریشه‌ای در گیاه بادرنجبویه و بهبود جذب مواد غذایی توسط گیاه، افزایش رشد طولی ساقه را در پی داشته است. اگرچه در این پژوهش متابولیت‌های باکتری مورد استفاده قرار گرفت ولی نتایج حاصل، با بررسی‌های صورت گرفته با استفاده از باکتری‌های محرک رشد به‌طور مستقیم هم‌راستا بود. در نهایت، براساس نتایج این پژوهش استفاده از متابولیت‌های باکتری‌های محرک رشد در کشت درون شیشه‌ای، به‌عنوان یک راهکار جدید، ارزان و دوستدار محیط زیست، جهت افزایش رشد، عملکرد و در نتیجه بهبود کیفیت گیاهان دارویی پیشنهاد می‌شود.

منابع

خانی زاده، پ.، حاتمی، م.، ابطحی، ف.، حسینی، ن. ۱۳۹۸. اثرات محرک باکتری‌های سودوموناس پوتیدا و فلورسنس بر مؤلفه‌های جوانه‌زنی و رشد گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis*). مجله پژوهش‌های گیاهی. ۳۲(۳)، ۵۶۹-۵۵۸.

Carey, N.S., Krogan, N.T. 2017. The role of auxin response factors in the development and differential growth of inflorescence stems. Plant Signaling & Behavior. 12: 4, e1307492.

Ghorbanpour, M.,Hatami, M. 2014. Biopriming of *Salvia officinalis* seed with growth promoting rhizobacteria affects invigoration and germination indices. Journal of Biological and Environmental Sciences. 8(22): 29-36.

Hol, W. G., Bezemer, T. M., Biere, A. 2013. Getting the ecology into interactions between plants and the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens*. Frontiers in Plant Science. 4: 81.

Rizvi, A., Ahmed, B., Khan, M.S., El-Beltagi, H.S., Umar, S., Lee, J. 2022. Bioprospecting plant growth promoting rhizobacteria for enhancing the biological properties and phytochemical composition of medicinally important crops. Molecules. 27(4): 1-31.

Saghfi, D., Alikhani, H.A., Moteshraezade, B. 2013. Effect of plant growth promoting rhizobium bacteria on nutritional improvement of canola under salinity. Journal of Soil and Water Science. 4:159-176.

Shakeri, A., Sahebkar, A., Javadi, B. 2016. *Melissa officinalis* L. A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology. 188: 204-228.

Tennakoon, P.L.K., Rajapaksha, R.M.C.P., Hettiarachchi, L.S.K. 2019. Tea yield maintained in PGPR inoculated field plants despite significant reduction in fertilizer application. Rhizosphere. 10: 100146.

Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P.K., Puri, S. 2019. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. 12: 1-12.

Investigating the lemon balm growth using *Pseudomonas chlororaphis* bacterial metabolites *in vitro*

M. Hosseini Abasabadi[1], M. Dahajipour Heidarabadi[1*], R. Saberi riseh[2]

[1] Department of Genetics and Plant Production, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran
[2] Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

Abstract

The use of growth promoting bacteria in agriculture, as a new biological and environmentally friendly method, plays an important role in improvement of performance and growth in plants. In this research, the effect of different concentrations of *Pseudomonas chlororaphis* metabolites on growth parameters was investigated. For this purpose, an experiment using bacterial metabolites with 0, 0.3, 0.4 and 0.5% (V/V) concentrations was done in a completely randomized design with three replications *in vitro*. The results showed that the bacterial metabolites at the concentration of 0.3% reduced the leaves and nodes numbers in plant compared with the control. Also, the effect of different concentrations of bacterial metabolites on the length of the longest and the shortest internode in the seedlings was significant compared with the control. Based on the results of this research, the use of the metabolites of *Pseudomonas chlororaphis* is recommended to improve the growth of medicinal plants under controlled conditions.

Keywords: Bacterial metabolites, Plant growth promoting, *In vitro*, Lemon balm

بررسی روند تغییرات متابولیت های ثانویه در گیاهان دارویی آویشن و درمنه

علیرضا نژادمحمد نامقی*، زهرا قلی زاده

[۱] گروه گیاهان دارویی مرکز علمی کاربردی سحر خیز، دانشگاه جامع علمی کاربردی ، مشهد

چکیده

متابولیت های ثانویه موادی هستند که دربعضی از گیاهان و درمرحله رویشی خاصی ازرویش وجود دارند، با بررسی روند تغییرات این مواد در دو گیاه مرتعی درمنه و آویشن در سه سطح ارتفاعی و سه منطقه اقلیمی خشک، نیمه خشک و نیمه مرطوب پرداخته که با تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار های آماری به شاخصی جدید برای ارزیابی شدت و استفاده از آن برای پهنه بندی خشکسالی دست یافتیم. این شاخص نشان می دهد که با افزایش شدت خشکی میزان متابولیت ها ثانویه در گونه های مختلف و در مراحل مختلف رویشی به طور معنی داری افزایش می یابد.

واژگان کلیدی: گیاهان دارویی، متابولیت ثانویه، درمنه، آویشن.

* E-mail: namaghi.ar@gmail.com

۱. مقدمه

متابولیت های متابولیت های ثانویه گیاهی، ترکیباتی آلی هستند که مستقیما در رشد، نمو یا تولید مثل گیاه دخیل نیستند. این ترکیبات دارای ساختار شیمیایی پیچیده تری نسبت به متابولیت های اولیه(مثل اسیدهای امینه) که برای بقاء زندگی سلولها ضروری اند می باشند. آلکالوئید ها (مورفین، کدئین، آتروپین)، ترپنوئیدها، فلاوونوئیدها، رنگریزه هاو تانن ها از جمله مهم ترین این ترکیبات هستند، (شریفی،۱۳۸۶). اهمیت متابولیت های ثانویه برای گیاهان از ماهیتی اکولوژیک برخوردار است واین ترکیبات نیز دارای کارکردهای متنوعی اند که از آن جمله می توان به عملکرد دفاعی در برابر صیادان، انگلها و عوامل بیماریزا، فیتو الکسین ها(سموم گیاهی) در هنگام ابتلاء به قارچ جهت جلوگیری از گسترش میسلیوم قارچ در گیاه، رقابت های بین گونه ای ، یا تسهیل فرآیندهای تولید مثلی (مثل تولید بوهای جاذب و یا مواد رنگی) ویا ایجاد ارتباط با گرده افشانها اشاره کرد. برخی از ترکیبات ثانویه در گیاهان دارای عملکرد (signaling) هستند، (رابینسون،۱۳۶۳) که در این میان هورمونهای گیاهی جایگاه ویژه ای دارند، (Rustaiyan, et al., 2000). در مفهوم کلی، متابولیت‌های ثانویه ترکیباتی آلی هستند که نقش ضروری در رشد و نمو موجود زنده ندارند. گیاهان برای بیوسنتز این مواد انرژی زیادی را به کار می‌برند. زمانی که این ترکیبات اثری بر رشد و تمایز گیاه نداشته باشند، قاعدتاً باید منافع دیگری داشته باشند، (مظفریان، ۱۳۷۳). مطالعه در زمینه وظایف این ترکیبات در گیاهان، یک موضوع جذاب و مهم برای بسیاری از پروژه‌های تحقیقاتی شده است و نقش‌های اکولوژیکی تعدادی از این ترکیبات مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته است. با مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته است، به نظر می‌رسد که متابولیت‌های ثانویه، به عنوان موادی طبیعی، نقش‌های اکولوژیکی مهمی در واکنش‌های دفاعی گیاهان و همچنین گرده‌افشانی و انتشار دانه‌های گیاهان به وسیله حشرات و حیوانات دارند. متابولیت‌های ثانویه بر خلاف متابولیت‌های اولیه (که مستقیماً در رشد و متابولیسم درگیر هستند و شامل کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوندو طی فرآیند فتوسنتز تولید شده و سپس در ساخت ترکیبات سلول نقش‌آفرینی می‌کنند و تولید حجم زیاد و با ارزش اقتصادی پایین می کنند و عمدتاً به عنوان ماده خام صنعت، مواد غذایی و افزودنی‌ها کاربرد دارند) از بیوسنتز متابولیت‌های اولیه به دست می‌آیند و به عنوان ترکیبات فرعی و انتهایی متابولیسم اولیه در نظر گرفته می‌شوند، (جمزاد، ۱۳۷۳). همچنین این ترکیبات در فرآیندهای متابولیسمی وارد نمی‌شوند. مهمترین متابولیت‌های ثانویه آلکالوئیدها، فنولیک‌ها، روغن‌های ضروری، استروئیدها، لیگنین‌ها، تانن‌ها، فلاوونوئیدها می‌باشند.متابولیت-های ثانویه عمدتاً در گونه‌ها و خانواده‌های خاصی از سلسله گیاهان تولید می‌شوند. این ترکیبات به مقدار کمی در سلول ذخیره شده، (شاهرخی،۱۳۷۵) و عمدتاً در سلول‌های تخصصی و در مرحله خاصی از چرخه زندگی گیاه تولید می‌شوند و همین امر استخراج و تلخیص آنها را در مقایسه با متابولیت‌های اولیه که در تمام سلول‌ها تولید می‌شوند، دشوار می‌کند. دراین مقاله از روند تغییرات متا بولیت های ثانویه در دو گونه ی گیاهی مرتعی (درمنه و آویشن) به عنوان شاخص مورد ارزیابی شده است.

۲. مواد و روش‌ها

برای اجرای این طرح از دو گونه ی مرتعی آویش (.Th) و درمنه (.Ar) و در سه منطقه اقلیمی خشک (A) شهرستان بیرجند در خراسان جنوبی، نیمه خشک(SA) شهرستان مشهد در خراسان رضوی و نیمه مرطوب (SH) بجنورد در خراسان شمالی و ارتفاعات هزار مسجد در خراسان رضوی و سه سطح ارتفاعی H1 (۷۰۰ تا ۸۰۰)، H2 (۱۳۰۰تا ۱۲۰۰) و H3 (۱۷۰۰ تا ۱۸۰۰) متر از سطح دریا در قالب یک طرح پایه بلوک کامل تصادفی با سه تکرار استفاده شده است. صفت مورد ارزیابی که به عنوان شاخص متابولیت های ثانویه در نظر گرفته شد، میزان مواد موثره بوده است. نمونه مورد آزمایش شامل ۱۰ گرم ماده خشک گیاهی که در پایان مرحله رویشی از هر یک از مناطق مورد مطالعه تهیه گردید، بوده است، (Takashi, 1996). برای اندزه گیری میزان مواده موثره که عمدتاً از ترکیبات آلی یا همان متابولیت های ثانویه می باشند از روش تقطیر با آب استفاده گردید، (رحیمی بیدگلی، ۱۳۷۸). در این روش که برای جدا سازی مواد غیر محلول در آب استفاده می شود اساس کار بر تاثیر فشار های مناسب بخار آب بر روی اندام گیاهان می باشد، (Lai, 1995). مواد موثره ی جدا شده ازگیاه همراه با آب به صورت دو فاز متفاوت در آمده که در محیطی با فشار بخار کمتر و تفاوت نقطه میعان آب و مواد موثره از یکدیگر جدا می گردد.

۳. نتایج

میانگین میزان مواد موثره که به عنوان شاخصی از متابولیت های ثانویه در نظر گرفته شده است در هر یک از نمونه های مورد آزمایش (آویشن و درمنه) و از سه سطح ارتفاعی و سه منطقه اقلیمی متفاوت در جداول (۳-۱) و(۳-۲) آورده شده است.

جدول (۱): میانگین مواد موثره (شاخص متابولیت های ثانویه) در گیاه آویشن(.Th) و درمنه (.Ar) در سه منطقه اقلیمی خشک (A)، نیمه خشک(SA) و نیمه مرطوب (SH)

	A	*SA*	SH
Ar.	۰.۳۱۵	۰.۲۵۳	۰.۱۵۱
Th.	۰.۲۱۰	۰.۱۶۲	۰.۸۰

جدول (۲): میانگین مواد موثره (شاخص متابولیت های ثانویه) در گیاه آویشن(.Th) و درمنه (.Ar) در سه سطح ارتفاعی H1 ، H2 و H3 از سطح دریا

	H1	*H2*	H3
Ar.	۰.۲۲۱	۰.۲۵۱	۰.۲۹۴
Th.	۰.۱۰۷	۰.۱۹۶	۰.۲۵۴

جدول (۳): میانگین مواد موثره (شاخص متابولیت های ثانویه ISM) در گیاه درمنه (.Ar) در سه سطح ارتفاعی H1 ، H2 و H3 از سطح دریا و سه منطقه اقلیمی خشک (A)، نیمه خشک(SA) و نیمه مرطوب (SH)

H3	*H2*	*H1*	*Ar.*
۰.۳۰۴۸	۰.۲۸۳	۰.۲۶۸	**A**
۰.۲۷۳۵	۰.۲۵۲	۰.۲۷۳	**SA**
۰.۲۲۲۵	۰.۲۰۱	۰.۱۸۶	**SH**

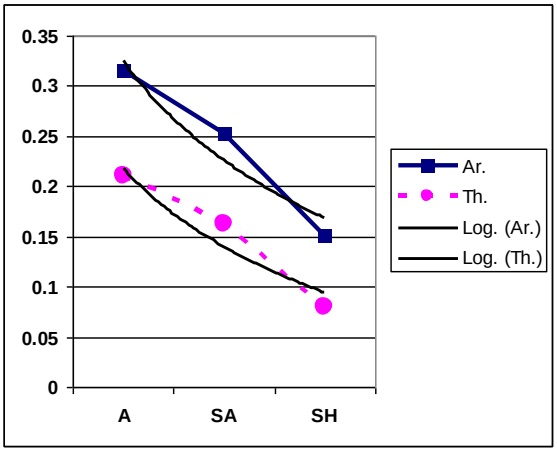
جدول (٤): میانگین مواد موثره (شاخص متابولیت های ثانویه ISM) در گیاه آویشن(.Th) در سه سطح ارتفاعی H1 ، H2 و H3 از سطح دریا و سه منطقه اقلیمی خشک (A)، نیمه خشک(SA) و نیمه مرطوب (SH)

H3	*H2*	*H1*	*Th.*
۰.۲۲۷۵	۰.۲۰۳	**۰.۱۵۸۵**	**A**
۰.۲۰۳۵	۰.۱۷۸۵	۰.۱۳۴۵	**SA**
۰.۱۶۲۵	۰.۱۳۸	۰.۰۹۳۵	**SH**

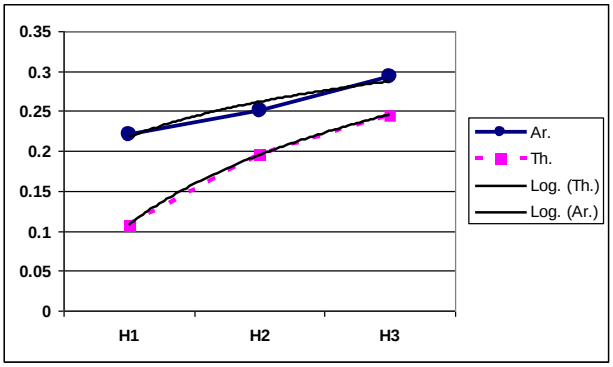
جدول (۵): میانگین مواد موثره (شاخص متابولیت های ثانویه ISM) در گیاه درمنه (.Ar) و گیاه آویشن(.Th) در سه سطح ارتفاعی H1 ، H2 و H3 از سطح دریا و سه منطقه اقلیمی خشک (A)، نیمه خشک(SA) و نیمه مرطوب (SH)

سطوح ارتفاعی		H1	H2	H3
درمنه Ar.	A	۰.۲۶۸	۰.۲۸۳	۰.۳۰۴۵
	SA	۰.۲۷۳	۰.۲۵۲	۰.۲۷۳۵
	SH	۰.۱۸۶	۰.۲۰۱	۰.۲۲۲۵
	متوسط	۰.۲۲۱	۰.۲۵۱	۰.۲۹۴
	سطح اقلیمی	*A*	*SA*	SH
	میانگین	۰.۲۲۱	۰.۲۵۱	۰.۲۹۴
آویشن Th.	A	۰.۱۵۸۵	۰.۲۰۳	۰.۲۲۷۵
	SA	۰.۱۳۴۵	۰.۱۷۸۵	۰.۲۰۳۵
	SH	۰.۰۹۳۵	۰.۱۳۸	۰.۱۶۲۵
	متوسط	۰.۱۰۷	۰.۱۹۶	۰.۲۴۵
	سطح اقلیمی	*A*	*SA*	SH
	میانگین			

تجزیه واریانس نتایج بدست آمده نشان داد که میزان مواد موثره هر دو گیاه مورد آزمایش بین سطوح مختلف اقلیمی اختلاف معنی دار در سطح ۹۹ درصد وجود دارد و میزان مواده موثره هر دو گیاه مورد آزمایش بین سطوح مختلف ارتفاعی از سطح دریا در سطح ۹۵ درصد اختلاف معنی داری داشته ولی اثر متقابل بین اقلیم و ارتفاع معنی دار نگردیده است. این نتایج مبین این مطلب است که با کاهش رطوبت در اقلیم های مختلف خشک، نیمه خشک و نیمه مرطوب میزان مواد موثره به طور معنی داری افزایش داشته (در سطح ۹۹ درصد) و با افزایش ارتفاع و یا کاهش دما میزان این مواد در سطح ۹۵ درصد افزایش معنی داری داشته اند. لذا شاخص متابولیت های ثانویه (ISM) می تواند به عنوان یک نمایه بوم شناختی در پهنه بندی خشکسالی ویا حتی تقسیمات اقلیمی استفاده شود.



شکل شماره ۱: روند تغیرات مواد موثره در دو گیاه درمنه و آویشن در سطوح مختلف اقلیمی



شکل شماره ۲: روند تغیرات مواد موثره در دو گیاه درمنه و آویشن در سطوح مختلف ارتفاعی

٤. بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به روند تغییرات مشاهده شده در میزان مواد موثره به عنوان شاخص متابولیت های ثانویه در گیاهان مرتعی مورد آزمایش در اقلیم های مختلف و سطوح مختلف ارتفاعی که با مشاهدات ف. سفید کن ۱۳۷۵، م. میرزا و احمدی۱۳۷۸، عسگری ۱۳۸۲، ربیعی ۱۳۸۲، که به بررسی تغییرات کمی و کیفی اسانس در گیاهان درمنه و آویشن پرداخته اند مطابقت داشته، (ربیعی و همکاران ۱۳۸۱)، (عسگری، سفید کن، ۱۳۸۲)، (میرزا و همکاران ۱۳۷۸)، (Sefidkon, 1999) و لذا شاخص ISM در گیاهان مختلف برای مشخص کردن پهنه بندی خشکی و خشکسالی و تهیه نقشه های اقلیمی مناطق مختلف با این خصوصیت بوم شناختی قابل استفاده است، (Ahmad et al., 2004).

منابع

جمزاد،زیبا،۱۳۷۳.آویشن،انتشارات موسسه تحقیقات خنگلها و مراتع

شاهرخی،نوبهار،۱۳۷۵.روشهای کنترل کیفی مواد اولیه داروهای گیاهی،مرکز انتشارات جهاد دانشگاهی شهید بهشتی.

شریفی،گلنوش،۱۳۸۶، بررسی تاکسونومی گیاه آویشن در ایران، دانشگاه شهید بهشتی.

رابینسون،ترور،۱۳۶۳.شیمی گیاهی.ترجمه محمد ایزددوست.

ربیعی، مینا،فاطمه سفیدکن،عادل جلیلی،تابستان ۱۳۸۱.بررسی تغییرات کیفی وکمی اسانس گیاه درمنه.پژوهش وسازندگی،شماره۵۵.

ربیعی،مینا،فاطمه سفیدکن،عادل جلیلی،زمستان۱۳۸۲.بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس ۴ گونه درمنه در شمال ایران.پژوهش و سازندگی،شماره ۶۱.

رحیمی بیدگلی،عباس،۱۳۷۸.بررسی تاثیر مراحل مختلف رشد و روشهای اسانسگیری بر کمیت وکیفیت روغن اسانسی آویشن کوهی.تهران،دانشگاه شهید بهشتی.

کوشک آبادی،هوشنگ،۱۳۵۹.شیمی دارویی(ترکیبات استروئید و ترپنها).

عسگری ،فاطمه ،فاطمه سفید کن ، تابستان ۱۳۸۲.مقایسه کمی و کیفی اسانس ۵ گونه آویشن. پژوهش و سازندگی،شماره ۵۹.

عسگری ،فاطمه ،فاطمه سفید کن، محمد باقر رضایی،پاییز و زمستان ۱۳۸۱. بررسی تغییرات کیفی و کمی اسانس آویشن.پژوهش و سازندگی،شماره ۵۶و۵۷.

مظفریان،ولی ا... ،۱۳۷۳.فرهنگ نامهای گیاهان ایران.انتشارات فرهنگ معاصر،تهران.

مظفریان،ولی ا...،بررسی و شناخت درمنه های ایران،پایان نامه کارشناسی ارشد،دانشکده علوم دانشگاه تهران.

میرزا ،مهدی،فاطمه سفید کن،لطیفه احمدی،۱۳۷۵.اسانسهای طبیعی،انتشارات موسسه تحقیقات جنگل و مراتع.

میرزا،مهدی،فاطمه سفید کن،لطیفه احمدی،بهار۱۳۷۸.کارایی دو ستون5-DB و1-db در شناسایی ترکیبهای اسانس .T fedschenkoi Ronniger. پژوهش و سازندگی،شماره ۴۱، ۴۰و۴۲.

Ahmad, S., Z. Hussain, A.S. Qureshi, R. Majeed and M. Saleem. 2004. Drought mitigation in Pakistan: current status and option for future strategies, International Water Management Institute, Drought series, Paper 3.

Hughes, B. L., and M. A. Saunders. 2002. Drought climatology for Europe, Journal of Climatology, 17:1571-1592

Takashi,H.,1996,JPn.Kokai Tokkyokoho Jp.8,104,615.

Kerekes,S.A.,Kerekes,G.,1996,Hung.Telijes HU 63.322.

Lai,Y.,1995,Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shumingshu CN.1,98,643.

Rustaiyan, A, Masoudi, Smonfared, A,2000."Volatileconstituents of three *Thymus species grown wild in iran."*Planta Medica,66,198.

Rustaiyan A.,and et all,(2000) Volatile Constituents of three Thymus species grown wild in iran, Planta medica,66, 13,218.

Sefidkon, F., Jamzad, Z., (1999). Essential oil Composition of Thymus Kotschyanus Boiss.And Hohen from Iran,11:459-460.

Study of Changing of Secondary Metabolites in Medicinal Plants of Thymus and Artemisia

Alireza Nejadmohammad Namaghi[1*], Zahra Gholizadeh [2]

[1] Director of Medicinal Plants Department of, University of Applied Science and Technology, Sahrkhiz center, Mashhad, Iran

[2] Department of Medicinal Plants, University of Applied Science and Technology Sahrkhiz center, Mashhad, Iran

Abstract

Secondary metabolites are substances that are present in some plants and in a certain vegetative stage of growth, by examining the changes in these substances in two pasture plants, Sagebrush and Thyme, at three altitude levels and three dry, semi-arid and semi-humid climatic regions, which were analyzed and analyzed. Statistical analysis with statistical software, we achieved a new index to evaluate the intensity and use it for drought zoning. This index shows that with the increase of drought intensity, the amount of secondary metabolites in different species and in different vegetative stages increases significantly.

Keywords: Medicinal plants, secondary metabolites, herbs, Thymus, Artemisia.

بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره های مختلف اتانولی و استونی گلسنگ *Diploschistes diacapsis*

خدیجه باوی*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون

چکیده

گلسنگ ها متابولیت های ثانویه زیادی با فعالیت های زیستی متنوع مانند آنتی اکسیدان، ضد ویروسی، ضد میکروبی، ضد سرطان و ضد التهاب را تولید می کنند. در تحقیق حاضر اثر ضد قارچی و کمترین ممانعت کنندگی از رشد عصاره های گلسنگی *Diploschistes diacapsis* براساس ژل دیفیوژن متد و E-test تغییریافته بر روی قارچ های: *Fusarium oxysporum, Cladosporium sp, Penicillium purpurogenome, Aspergillus flavus, Candida albicans* مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که عصاره آبی این گلسنگ اثری برمیکروارگانیسم‌های مورد آزمایش نشان نداد، در حالی که عصاره‌های الکلی و استونی بر روی همه سویه‌ها فعالیت ضد قارچی نشان داد. عصاره های استونی و اتانولی *Diploschistes dincapsis* در فصل بهار تفاوت معنی داری در فعالیت ضد قارچی در مقایسه با فصل پاییز نشان ندادند. همچنین عصاره های استونی تأثیر بیشتری بر فعالیت ضدقارچی در مقایسه با عصاره های اتانولی نشان دادند. به طور کلی از عصاره های الکلی و استونی *Diploschistes dincapsis* می توان در درمان بیماری های مختلف ناشی از این میکروارگانیسم ها استفاده کرد.

واژگان کلیدی: گلسنگ، *Diploschistes diacapsis* ، عصاره اتانولی و استونی

* Email:kh.bavi.pphy@gmail.com

۱. مقدمه

گلسنگ ها گروهی از ارگانیسم های همزیست به شمار می آیند که در اکوسیستم های مختلف وجود دارند. گلسنگ ها متابولیت های ثانویه زیادی با فعالیت های زیستی متنوعی را تولید می کنند. برخی از این متابولیت ها توسط شریک قارچی گلسنگ و سایر متابولیت ها توسط شریک های جلبکی و سیانوباکتریایی تولید می شوند. این ترکیبات شامل اسیدهای الیفاتیک، ترکیبات آروماتیک تک حلقه ای کینون ها، آروماتیک ها، کاروتونیدها و دپسیدها می باشند. تاکنون حدود ۱۰۰۰ متابولیت ثانویه در گلسنگ ها شناسایی شده است (Goga et al., 2020). میزان این متابولیت ها بین ۱٪ تا ۱۰٪ از وزن خشک ریسه گلسنگ و حتی گاهی اوقات ۳۰٪ از وزن خشک گلسنگ را تشکیل می دهند. نقش زیستی این مواد هنوز به طور کامل مشخص نشده است. اگرچه گاهی آنها دارای عملکرد دفاعی برای گلسنگ ها می باشند(Ozen andKinalioglu, 2008). فعالیت های بیولوژیکی مختلفی مانند فعالیت ضدویروسی، ضدتومور، ضدالتهاب، ضدتب، ضدتکثیر، ضدپروتوزوآ برای برخی از گلسنگ ها شناخته شده است (حمزه خانی و همکاران، ۲۰۲۰). علاوه بر آن ترکیبات گلسنگی در تغذیه انسان، جانوران، تولید رنگ، عطر و تهیه الکل و در صنعت داروسازی استفاده می گردد (Kirmizigul et al., 2003). برخی از گونه های گلسنگی برای درمان اختلالات معدی، دیابت، سیاه سرفه (Mazid et al.,1999)، سل ریوی و درمان سرطان و بیماری های پوستی (Kosanic et al., 2010) به کار می روند. اکنون ثابت شده است که عصاره های گلسنگی و ترکیبات آن فعالیت ضدباکتریایی دارند (Rankovic et al., 2007). تاکنون متابولیت های ثانویه زیادی شامل دپسیدها، دپسیدون ها، نفتوکوئینون ها، آتراکوئینون ها و دی بنزوفوران ها در گلسنگ ها شناسایی شده اند (حمزه خانی و همکاران،۲۰۲۰). رشد کند و شرایط زندگی سخت، تولید متابولیت های دفاعی را به عنوان یک ضرورت برای گلسنگ ها، امکان پذیر می سازد. تعداد زیادی از گونه های گلسنگی ثابت شده است که به عنوان یک منبع غنی از این متابولیت ها برای صنعت دارویی و غذایی می باشند. بیشتر ترکیبات گلسنگی با فعالیت آنتی بیوتیکی، از گروه متابولیت های فنولیک مانند usnic acid و anthraquinone endocrocin می باشند (Manojlovic et al., 2010).

خواص آنتی اکسیدانی گلسنگ ها به ندرت مورد مطالعه قرارگرفته است و اطلاعات کمی در مورد فعالیت آنتی اکسیدانی آنها گزارش شده است.گلسنگ ها مقدار بسیار زیادی متابولیت های ثانویه تولید می کنند که نقش زیستی این مواد هنوز مشخص نشده است، اگرچه گاهی آنها دارای عملکرد دفاعی برای گلسنگ ها می باشند(Ozen & Kinalioglu, 2008). به دلیل فعالیت ضدمیکروبی قابل توجه متابولیت های ثانویه در گلسنگ ها، گیاهان عالی و قارچ ها، توجه زیادی به شناسایی منابع جدیدی از ترکیبات فعال زیستی پیدا شده است (Karaman et al., 2003). در حال حاضر با توجه به اینکه گلسنگ ها از روزگاران قدیم در زمینه علوم پزشکی و درمانی بطور سنتی مورد استفاده قرار می گرفته اند شناسایی گلسنگ های بومی و بررسی اثرات دارویی و ضدمیکروبی آن از اهمیت خاصی برخوردار است. به همین دلیل هدف از این تحقیق شناخت و بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره های آبی، اتانولی و استونی گلسنگ های جمع آوری شده در شهرستان کازرون علیه برخی از نمونه های قارچی می باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. جمع آوری نمونه

نمونه های گلسنگی *Diploschistes diacapsis*(Ach). Lumbsch ازسطح سنگ ها و صخره ها در فصل بهار و پاییز از شهرستان کازرون جمع آوری گردید. نمونه های جمع آوری شده به مدت چند روز در هوای آزاد و در سایه خشک شدند. گلسنگ ها در آزمایشگاه گیاه شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد و توسط Yevhen M. Kondratiuk عضو هیئت علمی آکادمی گیاه شناسی خالودنی کی یف (Kholodny Institute of Botany) از دانشکده ملی علوم اوکراین مورد شناسایی قرار گرفتند وگلسنگ *Diploschistes diacapsis*(Ach). Lumbsch به علت فراوانی حجم نمونه برای تحقیق انتخاب گردید.

۲.۲. قارچ های بکار رفته

در تحقیق حاضر فعالیت ضد قارچی عصاره های آبی، استونی و اتانولی گلسنگ های جمع آوری شده در شرایط آزمایشگاهی براساس ژل دیفیوژن متد بر روی قارچ های: *Penicillium purpurogenome, Aspergillus flavus, Candida albicans , Fusarium oxysporum, Cladosporium sp.* بررسی شد. قارچ ها از مرکز کلکسیون پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. برای تهیه محیط کشت ها قارچی از potato dextrose agar (PDA) و Sabouraud dextrose (SD) agar استفاده شد. تمامی محیط های کشت در درجه حرارت چهار سانتی گراد نگهداری و هر دو هفته واکشت گردیدند.

۳.۲. تعیین اثر ضدمیکروبی عصاره

تهیه عصاره های آبی، استونی و اتانولی به روش (Kandukuri and Singara, 2010) و بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره های آبی، استونی و اتانولی با روش Well diffusion agar صورت گرفت (Gaudereau and Gilbert, 1997). بدین ترتیب که سوسپانسیون میکروبی با غلظت ۰/۵ مک فارلند از هر یک از باکتری های مورد آزمایش پس از فعال نمودن آنها تهیه گردید و در سطح پلیت های حاوی محیط کشت Muller-Hinton Agar با استفاده از سوآپ استریل به صورت کامل کشت داده شد. سپس چاهک هایی به قطر ۶ mm روی محیط کشت حفر گردید و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر عصاره در چاهک ها قرار داده شد. نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. استرین های قارچی در پلیت آگار محتوی potato dextrose (۱۰^{۸}spores/ml) کشت داده شدند. سپس هر یک از عصاره های مختلف گلسنگی جهت فعالیت ضد قارچی مورد مقایسه قرار گرفتند. جهت تعیین میزان بازدارندگی عصاره ها قطر هاله بازدارندگی رشد بر حسب میلی متر به وسیله خط کش طی سه تکرار اندازه گیری شد.

٤.۲. تعیین میزان کمترین غلظت بازدارندگی از رشد

به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی[1] و حداقل غلظت میکروب کشی عصاره ها[2] از روش استاندارد رقیق سازی بر محیط آگار Agar Dilution Method استفاده شد. به این ترتیب که رقت های مختلفی از هر یک از عصاره ها تهیه شد. با استفاده از روش حفر چاهک عصاره های تهیه شده به چاهک ها منتقل گردید. محیط کشت Muller Hinton Agar در دمای

[1]- MIC: Minimum Inhibitory Concentration
[2]- MBC: Minimum Bactericidal Concentration

۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۴ ساعت و پلیت های قارچی برای مدت ۵ روز در درجه حرارت ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس جهت بررسی تشکیل هاله های عدم رشد مورد مطالعه قرار گرفتند و حداقل غلظت MIC و MBC عصاره ها تعیین گردید.

۵.۲. تجزیه و تحلیل داده ها

کلیه آزمایش ها در قالب طرح بلوک های کاملاً تصادفی در۳ تکرار صورت گرفت. نتایج بدست آمده بوسیله نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. . مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح $P\leq 0.05$ انجام شد.

۳. نتایج

۱.۳. تاثیر عصاره های مختلف اتانولی و استونی *Diploschistes diacapsis* در دو فصل بهار و پاییز

در آزمایش تاثیر عصاره های اتانولی گلسنگ *Diploschistes diacapsis* در دو فصل بهار و پاییز بر قارچ های بکار رفته در این آزمایش، تفاوت معنی داری در سطح $P\leq 0.05$ بر فعالیت ضد قارچی مشاهده نشد. نتایج مشابهی در رابطه با مقایسه اثر عصاره های استونی این گلسنگ در دو فصل بهار و پاییز بدست آمد. در آزمایش تاثیر عصاره های اتانولی گلسنگ، حساس ترین قارچ *Fusarium oxysporum* بود که قطر هاله بازدارندگی رشد آن در دو فصل بهار و پاییز به ترتیب برابر با ۱۵ mm و ۱۷ mm بود. همچنین در رابطه با مقایسه اثر عصاره های استونی این گلسنگ حساس ترین قارچ *Cladosporium sp.* بود که قطر هاله بازداری آن در دو فصل بهار و پاییز به ترتیب برابر ۱۴/۶ mm و ۱۶/۶ mm بود (جدول ۱ و ۲). در مقایسه تاثیر عصاره های اتانولی و استونی گلسنگ *Diploschistes diacapsis* در فصل بهار قارچ *های Candida albicans* , *Cladosporium sp.* و *Fusarium oxysporum* تفاوت معنی داری در فعالیت ضدقارچی در سطح $P\leq 0.05$ مشاهده شد و در مجموع عصاره های استونی تأثیر بیشتری بر قطر هاله بازداری در اکثر قارچ های مورد آزمایش نشان دادند. در رابطه با مقایسه اثر عصاره های اتانولی و استونی این گلسنگ در فصل پاییز در رابطه با قارچ های *Candida albicans* , *Cladosporium sp.* و *Penicillium purpurogenome* نتایج مشابهی بدست آمد. در این آزمایش همچنین عصاره های استونی تأثیر بیشتری بر فعالیت ضدقارچی در مقایسه با عصاره های اتانولی نشان دادند. در حالیکه عصاره های آبی گلسنگ *Diploschistes diacapsis* بر فعالیت ضدقارچی قارچ های مورد آزمایش تأثیری نشان ندادند.MIC value در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱. MIC **عصاره های بهاره گلسنگ *Diploschistes diacapsis* بر علیه قارچ های مورد مطالعه**

قارچ های مورد آزمایش	عصاره استونی		عصاره اتانولی		عصاره آبی	
	DD	MIC	DD	MIC	DD	MIC
Fusarium oxysporum	۱۱/۵	۰/۱	۱۷	۲۵×۱۰^{-۳}	–	–
Cladosporium sp.	۱۶/۶	۰/۱	۱۰/۳	۰/۱	–	–
Penicillium purpurogenome	۱۳/۶	۰/۱	۱۱/۶	۰/۱	–	–
Aspergillus flavus	۱۲/۶	۰/۱	۱۰/۶	۰/۱	–	–
Candida albicans	۱۳/۶	۰/۱	۱۰/۶	۰/۱	–	–

جدول۲. MIC **عصاره های پاییزه گلسنگ*Diploschistes diacapsis* بر علیه قارچ های مورد مطالعه**

قارچ های مورد آزمایش	عصاره استونی		عصاره اتانولی		عصاره آبی	
	DD	MIC	DD	MIC	DD	MIC
Fusarium oxysporum	۱۳/۵	۰/۱	۱۵	۲۵×۱۰^{-۳}	-	-
Cladosporium sp.	۱۴/۶	۰/۱	۱۰/۳	۰/۱	-	-
Penicillium purpurogenome	۱۲	۰/۱	۱۰	۰/۱	-	-
Aspergillus flavus	۱۲	۰/۱	۱۰/۶	۰/۱	-	-
Candida albicans	۱۲/۶	۰/۱	۱۰	۰/۱	-	-

DD:Diameter of Inhibiton Zone (mm)
MIC:Minimum Inhibitory Concentration (mg/ml)

٤. بحث و نتیجه‌گیری

گلسنگ ها حاصل از همزیستی قارچ- جلبک هستند که خواص ضدمیکروبی دارند و از سالیان دور در طب سنتی مورد استفاده قرار گرفته اند. متابولیت های ثانویه گلسنگی بیش از ۳۰٪ وزن خشک تال را تشکیل می دهند. برخی از عصاره های گلسنگ ها دارای خواص ضدویروسی، ضدآلرژی و ضدسرطانی می باشند. اگرچه تعداد زیادی از گونه های گلسنگی در جهان تاکنون شناسایی شده است اما در رابطه با ترکیبات فعال زیستی پژوهش های بسیار کمی صورت گرفته است. در پژوهش انجام شده در رابطه با عدم فعالیت ضدمیکروبی عصاره های آبی گلسنگ *Diploschistes diacapsis* بر علیه قارچ های مورد مطالعه، به نظر می رسد که غیرقابل حل بودن عمده ترکیبات فعال موجود در تالوس گلسنگ و یا حل شدن ضعیف این ترکیبات در آب دلیل احتمالی عدم فعالیت ضدمیکروبی این عصاره ها باشد (Karthikaidevi, 2009). در آزمایش تاثیر عصاره های اتانولی و استونی گلسنگ *Diploschistes diacapsis* در دو فصل بهار و پاییز بر قارچ های بکار رفته در این آزمایش، تفاوت معنی داری در سطح $P\leq 0.05$ بر فعالیت ضد قارچی مشاهده نشد. در مجموع عصاره های استونی تأثیر بیشتری بر قطر هاله بازداری در مقایسه با عصاره های اتانولی در اکثر قارچ های مورد آزمایش نشان دادند. تفاوت فعالیت ضدمیکروبی عصاره های گلسنگی به نوع حلال بکار رفته جهت عصاره گیری بستگی دارد.

Rankovic و همکاران ویژگی های ضدباکتریایی عصاره های آبی، استونی و متانولی گلسنگ های *Lasallia pustulata,Parmelia sulcata, Umbilicaria crustulosa*, و *Umbilicaria cylindrical* را بررسی کردند و فعالیت های ضدباکتریایی عصاره های گلسنگ های مختلف با استفاده از روش disc diffusion برای باکتری های گرم مثبت و باکتری های گرم منفی و قارچ ها اندازه گیری و بعد از تعیین MIC، نتایج نشان داد که عصاره های استونی و متانولی *Lasallia pustulata*, *Parmelia, sulcata* و *Umbilicaria crustulosa* فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی برعلیه اکثر استرین های باکتریایی بکار رفته را نشان می دهند. MIC عصاره های گلسنگی برای عصاره های استونی *Lasallia pustulata* بر علیه باکتری *Bacillus mycoides* پایین ترین مقدار بود (۰/ ۷۸ mg/mL). در این آزمایش عصاره های آبی همه گلسنگ های بکار رفته غیرفعال بود (Rankovic, 2007). در رابطه با اثر متابولیت های ثانویه Usnic acid از گلسنگ *Cladonia stellaris* و *Vulpinic acid* از گلسنگ *Letharia vulpine* برعلیه میکروارگانیسم های هوازی و غیرهوازی *E. coli*، *Enterococcus faecalis*، *Staphylococcus aureus*، *Streptococcus pneumoniae*، *Haemophilus influenzae*، *Psedomonas aeruginosa*

Clostridium perfringens، *Bacteroides thetaiotaomicron*، *Candida albicans*، *Saccharomyces cerevisiae* *Bacteroides vulgatus* و *Bacteroides fragilis* نشان داد که این ترکیبات گلسنگی اثر بازدارندگی بر روی باکتری های میله ای گرم منفی یا قارچ ها در غلظت ۳۲g/ml μ≤ نداشته است اما بر علیه استافیلوکوکوس ها، آنتروکوکوسی ها و باکتری های بی هوازی اثر فعالی داشته است. Vulpinic acid اثر کمتری در مقایسه با Usnic acid بر علیه همه باکتری های aerobic cocci و anaerobic rods مورد آزمایش داشته اند. با استفاده از روش disc-difusion و تعیین MIC مشخص شد که باکتری ها حساسیت بیشتری در مقایسه با قارچ ها نشان می دهند. کمترین MIC values برابر با ۰/۳۹ mg/ml بر علیه باکتری ها و ۱/۵mg/ml بر علیه قارچ ها بود. عصاره های استونی و متانولی گلسنگ های شناخته شده فعالیت ضدمیکروبی نسبتاً قوی را نشان دادند. در حالیکه عصاره های آبی این گلسنگ ها هیچگونه فعالیت ضدمیکروبی بر علیه باکتری ها نشان ندادند (Lauterwein et al., 1995).

در تحقیقی که Kosanic و همکاران در سال ۲۰۱۰ در رابطه با فعالیت ضدمیکروبی عصاره گلسنگ های *L. frustulosa* و *P. hyperopta* انجام دادند، مشخص گردید که این عصاره ها و اسیدهای مشتق شده از این گلسنگ ها شامل Zeorin و divaricatic فعالیت ضدمیکروبی قوی را نشان می دهند که می تواند در درمان بیماری های گیاهی، جانوری و انسان اهمیت داشته باشد. شدت اثر ضدمیکروبی عصاره ها به غلظت و نوع میکروارگانیسم های انتخاب شده و همچنین به نوع عصاره تهیه شده بستگی دارد. عصاره های آبی گلسنگ های مورد آزمایش در این تحقیق فعالیت ضدمیکروبی نشان ندادند. طیف وسیعی از متابولیت های ثانویه در گلسنگ ها با فعالیت های زیستی آنتی اکسیدان، ضد ویروسی ، ضدمیکروبی، ضد التهاب و ضد سرطان مشخص شده است (Ankith et al., 2017). برطبق ساختار شیمیایی این ترکیبات، بیشتر مواد گلسنگی از نوع ترکیبات فنولیک، دی بنزوفوران ها، یوسنیک اسیدها، دِپسیدون ها، لاکتان ها، کوئینین ها و مشتقات پولوینیک اسیدها می باشند. فعالیت ضدمیکروبی این گلسنگ ها به حضور ساختارهای شیمیایی موجود در آنها برمی گردد. دیواره سلولی قارچ ها از پلی ساکاریدهای مختلف چون کیتین و گلوکان تشکیل شده است. در حالی که دیواره باکتری های گرم مثبت به طور عمده از پپتیدوگلیکان و اسید تیکوئیک و دیواره سلولی باکتری های گرم منفی از پپتیدوگلیکان، لیپوپلی ساکارید و لیپوپروتئین تشکیل شده است (Valadbeigi & Shaddel, 2015). فعالیت ضدمیکروبی متابولیت های موجود در عصاره های گلسنگی به اشکال مختلفی دیده می شود. تخریب غشای پلاسمایی، ممانعت از پروتئین سازی و رونویسی DNA و سایر عوامل منجر به مرگ سلول و یا مهار رشد آنها می شود(حمزه خانی و همکاران، ۱۳۹۹). با توجه به فعالیت ضدمیکروبی عصاره گلسنگ ها، به نظر میرسد که هاله عدم رشد وMIC به دست آمده برای هریک از عصاره های گلسنگی بستگی به حلال مورد استفاده برای عصاره گیری، روش عصاره گیری و میکروارگانیسم مورد بررسی دارد. تفاوت در میزان حساسیت قارچ ها و باکتری ها می تواند در ارتباط باتفاوت در نفوذ پذیری دیواره سلولی باشد.

منابع

حمزه خانی، ف.، پریسا محمدی، پ.، صبورا، ع. ۲۰۲۰. بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره گلسنگ‌های *Leptogium saturninum*، *Ramalina peruviana*، *Punctelia borreri*. زیست‌شناسی کاربردی. (۲)۴۵،۳۳-۳۳.

Ankith, G. N., Kekuda, P. T., Rajesh, M. R., Karthik, K. N., Avinash, H. C., & Vinayaka, K. S. 2017. Antibacterial and antifungal activity of three Ramalina species. Journal of Drug Delivery and Therapeutics. *7*(5): 27-32.

Balasubaramania, T. 2009. Screening of the Antibacterial Properties of Lichen *Roccella belangeriana and Awasthi*) from *Pichavaram Mangrove (Rhizophora Sp.*) .Advances in Biological Research. 3 (3-4): 127-131.

Gaudereau, C., and Gilbert, H. 1997. Comparison of disc diffusion and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of Campylobacter jejuni subsp. Jejuni and Campylobacter coli. J. Antimicrob Chemother. 39: 707 – 712.

Goga, M., Elccko, J., Marcincinova, M., Rucova, D., Backorova, M., & Backor, M. (2020). Lichen metabolites: an overview of some secondary metabolites and their biological potential. *Co-evolution of secondary metabolites*, 175-209.

Kandukuri, V. and Singara Charya, M.A. 2010. Antimicrobial activty of five flower extracts against three pathogenic bacteria. J. Nature Environment and pollution Technology .9(1): 73-76.

Karaman, I., Sanin F., Gulluce, M., Ogutcu, H., Sengul, M. and Adiguzel, A. 2003. Antimicrobial activity of aquaeos and methanol extracts of *Juniperus oxicedrus* . J. Ethnopharm. 97: 1-5.

Karthikaidevi, G., Thirumaran, G., Manivannan, K., Anantharaman, P., Kathiresan, K. and Kirmizigul, S., Koz, O., Anil, H. and Icli, S. 2003. Isolation and Structure elucidation of Novel Natural Products from Turkish lichens. Turk. J. Chem. 27: 493 – 500.

Kosanic, M., Rankovic, B. and Sukdolak, S.O. 2010. Antimicrobial activity of the lichen Lecanora frustulosa and *Parmeliopisis hyperota* and their divaricatic acid and zeorin constituents. African Journal of Microbiology Research. 4(9): 885- 890.

Lauterwein, M., Oethinger, M., Belsner, K., Peters, T. and Marre, R. 1995. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid ,(+)-usnic acid, and (-)- usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2541-2543.

Manojlovic, N.T., Vsiljevic, P.J., Gritsanapan, W., Supab, R. and Manojlovic, I. 2010. Phytochemical and antioxidant studies of *Laurera benguelensis* growing in Thailand. Biol Res. 43: 169-176.

Mazid, M.A., Hasan, C.M. and Rashid, M.A. 1999. Antibacterial activity of *Parmelia kamstchandalis*. Fitoterapia. 70: 615- 617.

Ozen,T. and Kinalioglu K. (2008). Determination of antioxidant activity of various extracts of *Parmelia saxatilis*. Biologia 63(2): 211-216.

Rankovic, B., Misjic M. and Sukdolak, S. 2007. Evaluation of Antimicrobial activity of the Lichens *Lasallia pustulata, Parmelia sulcata, Umbilicaria crustulosa and Umbilicaria cylindrica*. J. Microbiol.,76: 723-727.

Valadbeigi, T., and Minoo Shaddel, M. 2015. Antibacterial and Antifungal Activities of Gelatinose Lichen Species. J Arch Mil Med. 3(4):e31610. and

Vartia, K.O. 1949. Antibodies in lichens. Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 27 (1): 46- 54.

Investigating the antifungal activity of ethanolic and acetone extracts of the lichen *Diploschistes diacapsis*

Khadijeh Bavi*

***Department of biology, Faculty of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

Abstract

Lichens produce several secondary metabolites with various biological activities including antioxidant, antiviral, antimicrobial, anticancer and anti-inflammatory.The present study was conducted to investigate the antifungal effect and minimal inhibitory concentration (MIC) of *Fusarium oxysporum, Cladosporium sp., Penicillium purpurogenome, Aspergillus flavus, Candida albicans*. Gel diffusion and modification of E-test method were carried out to achieve information concerning to the same. The results obtained from this study indicated that aqueous extract had no antifungal activity against the microorganisms tested while alcoholic and acetone extracts had antifungalal activity on on all the strains. Acetone and ethalonic extracts of *Diploschistes dincapsis* in spring season did not show significant differences in antifungal activity in comparison with autumn season. The acetone extracts showed a stronger effect on the antifungal activity compared to the ethanolic extracts. In general, alcoholic and acetone extracts of *Diploschistes dincapsis* can be used in the treatment of various diseases caused by these microorganisms.

Keywords: Lichen, *Diploschistes dincapsis,* Acetone and ethalonic extracts

* Email:kh.bavi.pphy@gmail.com

بررسی متابولیت‌های ثانویه ضدویروسی از منشأ جلبکهای سبز–آبی

امیر کنعانیان[۱]، احمد فرهاد طالبی[۲]*

۱- گروه زیست فناوری میکروبی، پردیس علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه سمنان، سمنان

چکیده

تغییرات آب و هوایی و افزایش جمعیت خطر گسترش عفونت ویروسی را افزایش می‌دهند. متاسفانه تعداد داروهای موثر و در دسترس برای پیشگیری و درمان این عفونت‌ها محدود است. بنابراین، در سال های اخیر، تلاش ها برای تولید داروها یا واکسن‌های جدید ضد ویروسی تشدید شده است. سیانومتابولیت‌های ضد ویروسی عمدتاً در برابر ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) و سایر ویروس های پوششی مانند ویروس هرپس سیمپلکس(HSV)، ابولا یا ویروس‌های آنفلوانزا فعال هستند. اکثر متابولیت‌ها به عنوان لکتین‌ها، پروتئین‌های مونومر یا دیمری با توالی های اسید آمینه منحصر به فرد طبقه بندی می‌شوند. همه آنها در محدوده نانومولار فعالیت نشان می‌دهند. لکتین‌های سیانوباکتری شامل سیانوویرین، سایتوویرین، میکروویرین، میکروسیستیس ویریدیس و آگلوتینین هستند. پلی ساکارید سولفاته و کلسیم اسپیرولان-CA) (SPعفونت ویروسی را مهار کرده، پاسخ سیستم ایمنی را تحریک و فعالیت ضد توموری را نشان داند. علاوه بر این، بسیاری از عصاره‌های سیانوباکتری دارای فعالیت ضد ویروسی هستند، اما عوامل فعال آنها تاکنون شناسایی نشده‌اند. این واقعیت پایه خوبی برای مطالعات بیشتر در مورد پتانسیل درمانی این میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌کند.

واژگان کلیدی: سیانوباکتری‌ها، متابولیت‌های ثانویه، داروهای ضدویروسی

ایمیل نویسنده مسئول
aftalebi@semnan.ac.ir

مقدمه:

از شروع قرن ۲۱ شیوع بیماری‌های ویروسی به طور چشمگیری بر جامعه بشری با گسترش چندین بیماری کشنده، مانند سندرم حاد تنفسی(SARS) ، سندرم تنفسی خاورمیانه(MERS) ، آنفولانزای پرندگان و اخیراً بیماری کرونا-COVID) (19تأثیر گذاشته است. علاوه بر این، افزایش ناراکارآمدی داروهای ضدویروسی و بعضاً اثرات نامطلوب آنها به یکی از مسائل مهم پزشکی تبدیل شده است(Carpine and Sieber 2021). متأسفانه، از آنجایی که دستگاه‌های ویروسی کاملاً به ریزمحیط سلولی متصل هستند، عوامل ضد ویروسی اغلب نه تنها عفونت ویروسی را مهار می‌کنند، بلکه بر فرآیندهای متابولیک میزبان نیز تأثیر می‌گذارند(Mazur-Marzec, Cegłowska et al. 2021). برخی از این ویروسها بعنوان عامل بیماریزای مشترک بین انسان و دام ظاهر می‌شوند. زمانی که ویروس‌های حیوانی ناشناخته برای سیستم ایمنی ما از مرز گونه عبور می‌کنند و موفق می‌شوند با میزبان جدید سازگار شوند. متأسفانه، محافظت مؤثر با واکسیناسیون فقط برای گونه‌های ویروسی منتخب در دسترس است. بطورکل، تعداد داروهای موثر و در دسترس برای پیشگیری و درمان این عفونت‌ها محدود است. علاوه بر این، توسعه داروهای موثر یک فرآیند طولانی و هزینه‌بر است که اغلب به شکست منجر می‌شود. در سال ۲۰۱۶، فهرست عوامل ضد ویروسی تنها حاوی ۹۰ داروی تایید شده برای درمان ۲۲ بیماری عفونی انسان بود(Mazur-Marzec, Cegłowska et al. 2021). درمان‌های ضد ویروسی موجود مراحل مختلف عفونت ویروسی را هدف قرار می‌دهند، از جذب و نفوذ به سلول میزبان، ممانعت از تکثیر اسیدهای نوکلئیک گرفته تا جمع‌آوری و انتشار ویروس(Mazur-Marzec, Cegłowska et al. 2021).

بسیاری از عصاره‌های سیانوباکتریایی دارای فعالیت ضد ویروسی هستند، اما عوامل فعال شناسایی نشده‌اند .این واقعیت پایه خوبی برای مطالعات بیشتر در مورد پتانسیل درمانی این میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌کند. بسیاری از عوامل ضد ویروسی طبیعی دیگر شناسایی شده‌اند و تلاش‌ها برای کشف متابولیت‌های فعال زیستی جدید، افزایش کارایی آنها و توسعه مقرون‌به‌صرفه‌ترین روش‌های تولید داروهای ضد ویروسی ادامه دارد(Mazur-Marzec, Cegłowska et al. 2021).

سیانوباکترها، گروهی از پروکاریوت‌های فوتواتوتروف گرم منفی، قادر به انجام فتوسنتز اکسیژن هستند. این دسته منحصر به فرد از میکروارگانیسم‌ها نام‌های زیادی مانند سیانوپروکاریوت‌ها، سیانوفیت‌ها و باکتری‌های سبز-آبی دارند آنها دارای یک سازمان سلولی پروکاریوتی معمولی هستند، اما مانند یوکاریوت‌ها دارای یک سیستم پیچیده از غشاهای داخلی هستند که مسئول انتقال الکترون تنفسی و فتوسنتزی هستند. آنها دارای ترکیبات منحصر به فرد ذخیره غذا، نشاسته میکسوفیسین و سیانوفایسین هستند. مورفولوژی سیانوباکتری‌ها از شکل تک سلولی تا رشته‌ای متفاوت است. کلنی‌ها اغلب با یک غلاف موسیلاژینی یا ژلاتینی بسته به شرایط محیطی احاطه شده‌اند (Singh, Tiwari et al. 2011).

درجه بالایی از تنوع در فعالیت‌های زیستی سیانوباکتری‌ها به دلیل طیف وسیع متابولیت‌های ثانویه آن است. از آنجایی که سیانوباکتری‌ها کلاس خاصی از مواد شیمیایی تولید نمی‌کنند، طیف متابولیت‌های ثانویه آنها شامل ۴۰/۲ درصد لیپوپپتیدها، ۵/۶ درصد اسیدهای آمینه، ۴/۲ درصد اسیدهای چرب، ۴/۲ درصد ماکرولیدها، ۹/۴ درصد آمیدها و غیره است. این متابولیت‌ها طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های زیستی را نشان می‌دهند که ممکن است با محیط طبیعی مرتبط باشند، مانند ضد باکتری، ضد قارچ، ضد ویروس، سیتوتوکسیک و سایرین که عملکرد طبیعی آنها ممکن است واضح نباشد اما ممکن است

از نظر دارویی به عنوان عوامل ضد سرطان، تعدیل‌کننده‌های ایمنی یا مهارکننده‌های پروتئاز مهم باشند. بنابراین، این مولکول‌های فعال زیستی به طور همزمان پتانسیل دارویی سیانوباکتری‌ها را نشان می‌دهند(Singh, Tiwari et al. 2011).

بقای بیشتر سیانوباکتری‌ها در محیط‌های سخت، مانند دریاچه‌های سودا، بیابان‌های قطبی سرد و خشک و چشمه‌های حرارتی نیازمند متابولیت‌های انحصاری است که در گیاهان عالی یا سایر میکروارگانیسم‌ها وجود ندارند. علاوه بر این، مزیت دیگر سیانوباکترها به عنوان منبع میکروبی برای کشف دارو، از نظر کشت اقتصادی آنها در مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌ها به دلیل نیاز آنها به مواد مغذی معدنی ساده برای رشد، می‌باشد(Srivastava, Prajapati et al. 2022).

تا سال ۲۰۲۰ بیش از ۲۰۰۰ متابولیت ثانویه سیانوباکتری کشف شده است(Jones, Pinto et al. 2021). این متابولیت‌ها شامل سموم و متابولیت‌هایی می‌شوند که ماده اولیه ارزشمندی برای توسعه داروهای جدید علیه سرطان، عفونت‌های باکتریایی یا اختلالات متابولیک هستند(Demay, Bernard et al. 2019). در مقایسه با سایر فعالیت‌های سیانومتابولیت‌ها، اثرات ضد ویروسی به میزان کمتری بررسی شده است(Demay, Bernard et al. 2019). بیشتر مطالعات بر روی لکتین‌ها و پلی‌ساکاریدها متمرکز بوده‌اند(Mazur-Marzec, Cegłowska et al. 2021).

۱. ترکیبات ضد ویروسی از سیانوباکتری‌ها

بیشتر پروتئین‌های ضد ویروسی جدا شده از سیانوباکتری‌ها لکتین‌ها هستند. لکتین‌ها پروتئین‌های مونومری با وزن مولکولی کم هستند که معمولاً دارای خاصیت مهاری برای گلیکوپروتئین‌ها هستند(Carpine and Sieber 2021) از جمله آنهایی که گلیکوپروتئین‌های پوششی ویروسی را تشکیل می‌دهند(Mazur-Marzec, Cegłowska et al. 2021) و برای فعالیت‌های بیولوژیکی خود به یون‌های فلزی نیاز ندارند(Carpine and Sieber 2021). به عنوان مهارکننده‌های قوی ورود ویروس، می‌توان از آنها در پیشگیری استفاده کرد، اما نقش آنها در درمان عفونت‌های ویروسی نیز بررسی شده است(Mitchell, Ramessar et al. 2017).

سیانوویرین-N (CV-N)، میکروویرین (MV-N)، سایتوویرین (SVN)، میکروسیتیس ویریدیس لکتین (MVL) و اوسیلاتوریا آگاردی آگلوتینین (OAA) از اعضای خانواده لکتین هستند که توسط سیانوباکتری‌ها تولید می‌شوند. علاوه بر ترکیبات پروتئینی سیانوباکتری‌ها ترکیبات کربوهیدراتی هم تولید می‌کنند(Carpine and Sieber 2021). در اینجا برخی از این ترکیبات مورد بررسی قرار می‌گیرند.

۱.۱ سیانوویرین- N (CV-N)

سیانوویرین یک پروتئین ۱۱ کیلو دالتونی است که توسط سیانوباکتری *Nostoc ellipsosporum* تولید می‌شود (Bewley 2001) و فعالیت در محدوده نانومولاری در برابر ویروس‌های نقص ایمنی انسانی (HIV1 , HIV2) و ویروس نقص ایمنی میمون (SIV) دارد. علاوه بر این، CV-N از تکثیر ویروس هپاتیتC ، ویروس های آنفولانزا و ابولا جلوگیری می کند. حالت عمل CV-N شامل مهار همجوشی بین HIV و سلول هدف با تداخل در اتصال بین پروتئین‌های HIV gp120 و گیرنده‌ها و گیرنده‌های مشترک سلول‌ها است(Carpine and Sieber 2021). CV-N در محدوده وسیعی از pH و دما پایدار است، همچنین در برابر حلال‌های آلی و مواد شوینده مقاوم است(Bewley 2001). CV-N با مسدود کردن تعامل بین gp120 ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) و گیرنده سلول T CD4 عمل می‌کند(Liu, Carroll et al. 2009).

اتصال به gp120 ویروسی از تغییرات ساختاری CD4 و برهمکنش با گیرنده های همراه CXCR4 و CCR5 جلوگیری می‌کند. در نتیجه، ویروس نمی‌تواند وارد سلول شود و انتقال آن از سلول آلوده به سلول غیرآلوده مسدود می‌شود(Mazur-Marzec, Cegłowska et al. 2021). حذف N-گلیکان‌ها در gp120 ویروسی منجر به ایجاد مقاومت در سویه‌های در معرض CV-N شد(Liu, Carroll et al. 2009).

پتانسیل CV-N برای توسعه به عنوان یک میکروب‌کش موضعی به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. علاوه بر تعامل با gp120 و مهار عفونت HIV، سیانوویرین در سطح نانومولاری در برابر سایر ویروس‌های پوششی مانند ویروس هرپس انسانی۶ و ویروس سرخک(Dey, Lerner et al. 2000)، ویروس ابولا(Barrientos, O'Keefe et al. 2003)، ویروس هپاتیت(Helle, Wychowski et al. 2006) و ویروس آنفلوانزا(O'Keefe, Smee et al. 2003) فعال است. با توجه به طیف گسترده‌ای از فعالیت در برابر ویروس‌های پوششی و پایداری بالا(Lotfi, Sheervalilou et al. 2018)، CV-N پتانسیل زیادی را به عنوان یک اقدام پیشگیری در برابر عفونت‌های ویروسی نشان می‌دهد. بنابراین، نیاز به توسعه روش‌های جایگزین یا بهبود یافته تولید CV-N احساس می‌شود.

۲.۱ میکروویرین (MVN)

میکروویرین ۱۲/۷ کیلو دالتونی از *Microcystis aeruginosa* جدا شد(Kehr, Zilliges et al. 2006). پروتئینی مونومری که از ۱۰۸ اسید آمینه تشکیل شده است. به عنوان یک پروتئین تک ظرفیتی، MVN با الیگومانوزیدهای شاخه‌دار ارتباط متقابل برقرار نمی‌کند(Mazur-Marzec, Cegłowska et al. 2021). آزمایش‌های آزمایشگاهی فعالیت قوی MVN را در برابر طیف وسیعی از سویه‌های آزمایشگاهی و بالینی HIV-1 و همچنین در انواع مختلف سلول در سطح نانومولاری نشان داد. بر خلاف سایر لکتین‌ها، از جمله CV-N، تنها فعالیت سیتوتوکسیک و میتوژنیک جزئی داشت. همچنین تکثیر ویروسی را در سلول‌های از پیش تیمار شده فعال یا تقویت نکرد(Shahzad-ul-Hussan, Gustchina et al. 2011). MVN در برابر ویروس هپاتیت C هم فعالیت نشان داده است(Min, Duan et al. 2017).

۳.۱ سایتوویرین (SVN)

سایتوویرین با وزن مولکولی ۹/۷۱ کیلودالتون برای اولین بار از *Scytonema varium* جدا شده است. این لکتین ۹۵ اسید آمینه‌ای و تک زنجیره‌ای از دو تکرار توالی تشکیل شده است. ساختار اولیه SVN شبیه به گروهی از پروتئین‌های شبه کیتین با دو محل اتصال کیتین است. SVN به تتراساکاریدهای مربوط به گلیکوپروتئین‌های پوششی ویروسی، به ویژه به gp120، gp160 و همچنین به gp41 متصل می‌شود(Mazur-Marzec, Cegłowska et al. 2021). SVN دارای فعالیت قوی در برابر جدایه‌های مختلف HIV-1 است. لکتین همچنین در برابر ویروس ابولا زئیر، ویروس ماربورگ و HCV فعال است(Garrison, Giomarelli et al. 2014). در آزمایش‌ها روی موش‌های BALB/c، حداکثر محافظت ضدویروسی زمانی به دست آمد که SVN به طور مداوم قبل از عفونت یا در مراحل اولیه چرخه زندگی ویروسی تجویز می‌شد. به دلیل پایداری کم در سرم، SVN باید هر ۶ ساعت تکرار شود تا موثر باشد(Garrison, Giomarelli et al. 2014).

٤.١ کربوهیدرات‌ها

کلسیم اسپیرولان (Ca-SP) در سال ۱۹۹۶ از *Spirulina platensis* جدا شد و فعالیت ضد ویروسی را در برابر طیف گسترده‌ای از ویروس‌ها از جمله HIV-1، ویروس هرپس‌سیمپلکس نوع ۱(HSV-1)، سیتومگالوویروس انسانی (HCMV)، ویروس مربیلی سرخک(MeV)، ویروس اوریون و ویروس آنفولانزا نشان داد. ساختار Ca-SP از یک پلی‌ساکارید سولفاته با وزن مولکولی تقریباً ۷۴ کیلو دالتون تشکیل شده است. جالب توجه است که Ca-SP ویروس فلج اطفال و ویروس کوکساکی را مهار نمی‌کند، دو ویروس بدون پوشش که انتخابی بودن را برای ویروس‌های پوششی پیشنهاد می‌کنند. Ca-SP در مراحل اولیه تکثیر ویروس، به عنوان مثال، مراحل جذب و نفوذ دخالت می‌کند (Carpine and Sieber 2021).

لیستی از ترکیبات ضدویروسی در جدول ۱ نشان داده شده است. عمده‌ترین پپتید تولید شده توسط سیانوباکتری‌ها، لکتین‌ها هستند. این ترکیبات گلیکوپروتئین‌های واقع در پوشش ویروسی را هدف قرار می‌دهند و ورود ویروس‌ها به سلول‌های میزبان را مهار می‌کنند(Carpine and Sieber 2021).

جدول ۱:ترکیباتی با فعالیت ضد ویروسی در برابر ویروس‌های بیماری‌زای انسانی(Carpine and Sieber 2021)

گونه سیانوباکتر تولیدکننده	نام بیومولکول	نوع بیومولکول	هدف ویروسی	مکانیسم عمل
Dichothrix Spp.	بوئرین A بوئرین B بوئرین C	آلکالوئید	HSP 2	مهار فعالیت ویروس
Lyngbya Spp.	سولفوکینووسیل دی آسیل گلیسرول	لیپید	HIV 1	مهار فعالیت ویروس
Microcystis Spp.	میکروویرین(MVN)	پروتئین	HIV 1 HIV 2	مهار تعامل ویروس و سلول
Microcystis Spp.	لکتین میکروسیستیس ویریدیس(MVL)	پروتئین	HIV1	مهار همجوشی سلولی با واسطه پوشش ویروس
Nostoc sp.	سیانوویرین -N (CV-N)	پروتئین	HIV1 HIV2	فعالیت ضد ویروسی CV-N به دلیل برهمکنش‌های منحصر به فرد و میل ترکیبی بالای CV-N با گلیکوپروتئین gp120 پوشش سطح ویروس است.
Oscillatoria sp.	اسیلاتوریا آگاردی آگلوتینین(OAA)	پروتئین	HIV1 HIV2	مهار تکثیر ویروس
Scytonema sp.	سایتوویرین	پروتئین	HIV1	سایتوویرین به پروتئین های پوششی ویروسی gp120 ، gp160و gp41 متصل می شود.
Phormidium sp.	سولفوکینووسیل دی آسیل گلیسرول	لیپید	HIV 1	مهار فعالیت ویروس
Spirulina sp *Spirulina sp*	کلسیم اسپیرولان تانن ها و کسر پلی‌ساکارید	کربوهیدرات پلی‌فنل و کربوهیدرات	HIV1 HIV1	اثر بازدارنده بر تکثیر ویروس پوشش‌دار اثر بازدارنده تکثیر ویروس

مرحله‌ای از چرخه تکثیر ویروس را هدف قرار می‌دهند که پس از ورود ویروس رخ می‌دهد	*Chikungunya virus*	پلی‌کتاید	۳-متوکسی دبروماپلیسیاتوکسین، انیدرودبروماپلیسیاتوکسین، دبروماپلیزیاتوکسین	*Trichodesmium erythraeum*

۲. نتیجه‌گیری

سیانوباکتری‌ها گروه منحصر به فردی از میکروارگانیسم‌های فتوسنتزی هستند که متابولیت‌های فعال زیستی متعددی را تولید می‌کنند که پتانسیل بالایی برای تبدیل شدن به درمان‌های جدید دارند. علاوه بر این، تحقیقات رو به گسترش روی سیانوباکتری‌ها به عنوان میزبان‌های هترولوگ، مزایای این موجودات را در تبدیل CO_2 به محصولات با ارزش برجسته می‌کند. همچنین سیانوباکتری‌ها را می‌توان بدون نیاز به زمین‌های زراعی یا منابع آب آشامیدنی کشت کرد. با وجود فعالیت‌های بیولوژیکی قوی، تنها تعداد کمی از ترکیبات سیانوباکتری وارد آزمایش‌های بالینی شده‌اند. فرض بر این است که پتانسیل دارویی این ترکیبات افزایش می‌یابد و محصولات طبیعی سیانوباکتری به زودی به طور قابل توجهی بر سیستم سلامت انسان تأثیر می‌گذارد. به طور بالقوه، سیانوباکتری‌ها می‌توانند برای توسعه روش‌های درمانی جدید علیه ویروس‌های جدید، مانند ویروس کرونا (SARS-CoV-2) استفاده شوند.

منابع

Barrientos, L. G., B. R. O'Keefe, M. Bray, A. Sanchez, A. M. Gronenborn and M. R. Boyd (2003). "Cyanovirin-N binds to the viral surface glycoprotein, GP1, 2 and inhibits infectivity of Ebola virus." Antiviral research **58**(1): 47-56.

Bewley, C. A. (2001). "Solution structure of a cyanovirin-N: Manα1-2Manα complex: structural basis for high-affinity carbohydrate-mediated binding to gp120." Structure **9**(10): 931-940.

Carpine, R. and S. Sieber (2021). "Antibacterial and antiviral metabolites from cyanobacteria: Their application and their impact on human health." Current Research in Biotechnology **3**: 65-81.

Demay, J., C. Bernard, A. Reinhardt and B. Marie (2019). "Natural products from cyanobacteria: Focus on beneficial activities." Marine drugs **17**(6): 320.

Dey, B., D. L. Lerner, P. Lusso, M. R. Boyd, J. H. Elder and E. A. Berger (2000). "Multiple antiviral activities of cyanovirin-N: blocking of human immunodeficiency virus type 1 gp120 interaction with CD4 and coreceptor and inhibition of diverse enveloped viruses." Journal of virology **74**(10): 4562-4569.

Garrison, A. R., B. G. Giomarelli, C. M. Lear-Rooney, C. J. Saucedo, S. Yellayi, L. R. Krumpe, M. Rose, J. Paragas, M. Bray and G. G. Olinger Jr (2014). "The cyanobacterial lectin scytovirin displays potent in vitro and in vivo activity against Zaire Ebola virus." Antiviral research **112**: 1-7.

Helle, F., C. Wychowski, N. Vu-Dac, K. R. Gustafson, C. Voisset and J. Dubuisson (2006). "Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans." Journal of Biological Chemistry **281**(35): 25177-25183.

Jones, M. R., E. Pinto, M. A. Torres, F. Dörr, H. Mazur-Marzec, K. Szubert, L. Tartaglione, C. Dell'Aversano, C. O. Miles and D. G. Beach (2021). "CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria." Water Research **196**: 117017.

Kehr, J. C., Y. Zilliges, A. Springer, M. D. Disney, D. D. Ratner, C. Bouchier, P. H. Seeberger, N. T. De Marsac and E. Dittmann (2006). "A mannan binding lectin is involved in cell–cell attachment in a toxic strain of Microcystis aeruginosa." Molecular microbiology **59**(3): 893-906.

Liu, Y., J. R. Carroll, L. A. Holt, J. McMahon, B. Giomarelli and G. Ghirlanda (2009). "Multivalent interactions with gp120 are required for the anti-HIV activity of Cyanovirin." Peptide Science: Original Research on Biomolecules **92**(3): 194-200.

Lotfi, H., R. Sheervalilou and N. Zarghami (2018). "An update of the recombinant protein expression systems of Cyanovirin-N and challenges of preclinical development ".BioImpacts: BI **8**(2): 139.

Mazur-Marzec, H., M. Cegłowska, R. Konkel and K. Pyrć (2021). "Antiviral cyanometabolites—A review." Biomolecules **11**(3): 474.

Min, Y.-Q., X.-C. Duan, Y.-D. Zhou, A. Kulinich, W. Meng, Z.-P. Cai, H.-Y. Ma, L. Liu, X.-L. Zhang and J. Voglmeir (2017). "Effects of microvirin monomers and oligomers on hepatitis C virus." Bioscience Reports **37**(3).

Mitchell, C. A., K. Ramessar and B. R. O'Keefe (2017). "Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry." Antiviral research **142**: 37-54.

O'Keefe, B. R., D. F. Smee, J. A. Turpin, C. J. Saucedo, K. R. Gustafson, T. Mori, D. Blakeslee, R. Buckheit and M. R. Boyd (2003). "Potent anti-influenza activity of cyanovirin-N and interactions with viral hemagglutinin." Antimicrobial agents and chemotherapy **47**(8): 2518-2525.

Shahzad-ul-Hussan, S., E. Gustchina, R. Ghirlando, G. M. Clore and C. A. Bewley (2011). "Solution structure of the monovalent lectin microvirin in complex with Manα (1–2) Man provides a basis for anti-HIV activity with low toxicity." Journal of Biological Chemistry **286**(23): 20788-20796.

Singh, R. K., S. P. Tiwari, A. K. Rai and T. M. Mohapatra (2011). "Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery." The Journal of antibiotics **64**(6): 401-412.

Srivastava, R., R. Prajapati, T. Kanda, S. Yadav, N. Singh, S. Yadav, R. Mishra and N. Atri (2022). "Phycochemistry and bioactivity of cyanobacterial secondary metabolites." Molecular Biology Reports: 1-19.

Evaluation of antiviral secondary metabolites from blue-green microalgae

Amir Kananian[1], Ahmad Farhad Taleb*[2]

1- Department of Microbial Biotechnology, Campus of New Sciences and Technologies, Semnan University, Semnan

Abstract

Climate change and population growth increase the risk of spreading viral infection. Unfortunately, the number of effective and available drugs for the prevention and treatment of these infections is limited. Therefore, in recent years, efforts to design new antiviral drugs or vaccines have intensified. Antiviral cyanometabolites are mainly active against human immunodeficiency virus (HIV) and other enveloped viruses such as herpes simplex virus (HSV), Ebola or influenza viruses. Most metabolites are classified as lectins, monomeric or dimeric proteins with unique amino acid sequences. All of them show activity in the nanomolar range. Cyanobacterial lectins include cyanovirin, cytovirin, microvirin, microcystis viridis lectin, and agglutinin. sulfated polysaccharide, calcium spirulan, (CA-SP) inhibited infection by enveloped viruses, stimulated immune system response and showed antitumor activity. In addition, many cyanobacterial extracts have antiviral activity, but their active agents have not been comprehensively identified. It provides a good basis for further studies on the therapeutic potential of these microorganisms.

Keywords: Cyanobacteria, secondary metabolites, antiviral drugs

[1] corresponding author e-mail:

aftalebi@semnan.ac.ir

بررسی مقایسه‌ای متابولیت‌های ثانوی در اندام‌های مختلف گیاه زرشک (*Berberis integerrima*)

نسترن ژاله، محسن شریفی*، الهه ثمری

گروه زیست شناسی علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

چکیده

گیاهان دارویی به دلیل داشتن متابولیت‌های ثانوی در درمان بیماری‌ها نقش دارند. گونه‌ای از گیاه زرشک با نام علمی *Berberis integerrima* جز گیاهان دارویی و بومی ایران است. مهم‌ترین متابولیت ثانوی در زرشک آلکالوئیدها هستند. این گیاه دارای اثرات ضدمیکروبی، ضدالتهاب، ضدسرطان، ضددیابت و ضددرد است که می‌تواند در ارتباط با ترکیبات آلکالوئیدی، فنلی و سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی باشد. این پژوهش به منظور بررسی متابولیت‌های ثانوی در اندام‌ها و بافت‌های مختلف این گیاه انجام شد. ابتدا گیاه زرشک از رویشگاه طبیعی جمع‌آوری، خشک و سپس پودر شد. مقدار کل ترکیبات آلکالوئیدی، فنلی، فلاونوئیدی، فلاونولی و آنتوسیانین در اندام‌ها و بافت‌های مختلف شامل میوه، برگ، پوست ساقه، مغز ساقه، کل ساقه، پوست ریشه، مغز ریشه، کل ریشه و ریشه‌های جانبی ریز به طور جداگانه اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار ترکیبات آلکالوئیدی، فلاونوئیدی و فلاونولی در اندام ریشه مشاهده شد. مقدار ترکیبات ذکر شده در بافت پوست ریشه بیشتر از مغزآن بود. در حالی که، کمترین مقدار این ترکیبات در بافت مغز ساقه مشاهده شد. بیشترین مقدار ترکیبات فنلی به ترتیب در میوه، برگ، پوست ساقه و پوست ریشه ارزیابی شد. محتوای آنتوسیانین در میوه اختلاف قابل توجهی نسبت به سایر اندام ها داشت که مقدار آن ۶ برابر بیشتر از برگ بود. در نهایت می‌توان بیان کرد که مقدار آنتوسیانین در اندام هوایی شامل میوه و برگ و مقدار آلکالوئید در ریشه گیاه زرشک بیشتر می‌باشد.

واژگان کلیدی: آنتوسیانین، ترکیبات آلکالوئیدی، ترکیبات فنلی، زرشک، متابولیت‌های ثانوی.

* Msharifi@modares.ac.ir

۱. مقدمه

گیاه زرشک با نام علمی *Berberis integerrima* Bunge. از خانواده زرشکیان (Berberidaceae) است که این خانواده، شامل ۱۵ جنس و ۱۵۰ گونه می‌باشد (Vojodi et al., 2019). وجود متابولیت‌های ثانوی مختلف، منجر به ایجاد اثرات دارویی متنوعی در این گیاه شده است. در طب سنتی از اندام‌های مختلف زرشک از قبیل میوه، پوست ریشه و ساقه به منظور درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود. عصاره‌های حاصل از گونه‌های مختلف این خانواده از جمله *Berberis vulgaris* و *Berberis aristata* در درمان انواع بیماری‌های رماتیسمی و مزمن کاربرد دارند. برخی پژوهشگران معتقدندکه این نوع عصاره‌ها اثر ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد قارچی دارند (رحیمی و همکاران، ۱۳۹۳). میوه این گیاه پرمصرف‌ترین اندام در صنایع دارویی، غذایی و غیره محسوب می‌شود. مهم‌ترین متابولیت ثانوی در این گیاه آلکالوئیدهایی مانند بربرین، بربامین، اکسیاکانتین و کلمبامین می باشند که در اندام‌ها و بافت‌های مختلف گزارش شده‌اند. یکی از مهم‌ترین آلکالوئیدهای این گیاه بربرین است که می‌تواند در پیشگیری از بیماری عروق کرونر و کاهش سطح کلسترول و تری‌گلیسیرید خون موثر باشد. علاوه بر این، بربامین سبب مسدود شدن کانال‌های کلسیمی و اکسیاکانتین سبب گشاد شدن عروق می‌شود (Rahimi et al., 2017).

آلکالوئیدها گروهی از ترکیبات ثانوی هستند که در گروه‌های محدودی از گیاهان وجود دارند. خانواده زرشکیان از جمله خانواده‌های نهاندانگان است که دارای آلکالوئیدهای ایزوکینولینی می‌باشد. این دسته از آلکالوئیدها به سه گروه آپورفین‌ها[1]، پروتوبربرین‌ها[2] و بنزیل‌ایزوکینولین‌ها[3] تقسیم می‌شوند (Singh et al., 2021). مطالعات انجام شده در زمینه‌ی خواص و ساختار شیمیایی این ترکیبات بیانگر این است که ساختار ایزوکینولینی، دلیل اصلی خواص ضدمیکروبی آن‌ها است (رحیمی و همکاران، ۱۳۹۳).

از دیگر ترکیبات ثانویه مهم گیاه زرشک، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی می‌باشد که اثرات ضدالتهاب، ضدویروس و آنتی-اکسیدانی آن‌ها شناخته شده است. فراوان‌ترین ترکیبات فنلی در این گیاه انواع تانن‌ها بوده که تانن‌های هیدرولیز شونده دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (Vojodi et al., 2019).

با توجه به مطالعات اندک در زمینه ی ترکیبات ثانوی موجود در اندام های *B. integerrima*، هدف از این تحقیق، بررسی و مقایسه مقدار ترکیبات آلکالوئیدی، فنلی، فلاونوئیدی، فلاونولی و آنتوسیانین در اندام‌ها و بافت‌های مختلف این گیاه می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. منطقه مورد مطالعه

[1] Aporphines
[2] Protoberberines
[3] Benzylisoquinolines

اندام‌های مختلف گیاه شامل میوه، برگ، ساقه و ریشه به طور کاملا تصادفی از منطقه کیاسر در شهرستان بهشهر واقع در استان مازندران با مختصات جغرافیایی N ״۱۴ ׳۳۵ °۳۶ ، E ״۳۴ ׳۵۰ °۵۳ جمع‌آوری شد. ساقه و ریشه گیاه به برش‌های عرضی کوچک تقسیم و به همراه میوه و برگ به مدت دو هفته در آون و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا کاملا خشک شوند. پس از خشک شدن، پوست ساقه و پوست ریشه جدا گردید و همه نمونه‌ها به وسیله دستگاه آسیاب پودر شدند.

۲.۲. روش تحقیق

۲.۲.۱اندازه‌گیری محتوای آلکالوئید کل

ابتدا ۰/۲ گرم از بافت خشک گیاهی با ۳ میلی‌لیتر متانول ساییده و به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. سپس، محلول حاصل سانتریفیوژ شد. محلول رویی به فالکون دیگری منتقل و در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به عصاره خشک شده ۵ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید ۲ نرمال اضافه و سانتریفیوژ شد. ۱ میلی‌لیتر از این محلول به قیف جداکننده منتقل و با ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم سه مرتبه شسته شد. pH محلول توسط سدیم هیدروکسید ۶ مولار به ۱۲/۷ رسانده شد. ۵ میلی‌لیتر محلول بروموکروزول سبز[1] و ۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات (pH=۴/۷) به این محلول اضافه شد. سپس به مخلوط واکنش، ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه شد و با تکان دادن شدید استخراج صورت گرفت. در نهایت فاز کلروفرمی (محلول زرد رنگ زیرین) جمع‌آوری و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای اندازه‌گیری آلکالوئید کل از منحنی استاندارد بربرین استفاده شد (Shamsa et al., 2008).

۲.۲.۲. اندازه‌گیری محتوای فنل کل

به منظور بررسی محتوای فنل کل، ۰/۱ گرم از بافت خشک گیاهی با ۲ میلی‌لیتر متانول اسیدی ۱ درصد ساییده و سپس سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از عصاره متانولی اسیدی ۵ میلی‌لیتر فولین ۱۰ درصد و سپس ۴ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای اندازه گیری فنل کل از منحنی استاندارد گالیک اسید استفاده شد (Ainsworth and Gillespie, 2007).

۳.۲.۲. اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل

۰/۱ گرم از بافت خشک گیاهی در ۳ میلی‌لیتر متانول اسیدی ۱ درصد ساییده و سپس سانتریفیوژ شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره متانولی اسیدی ۱۰۰ میکرولیتر پتاسیم استات ۱ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد و ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد و ۲/۸ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل از منحنی استاندارد روتین استفاده شد (Chang et al., 2002).

٤.۲.۲. اندازه‌گیری محتوای فلاونول کل

[1] Bromocresol Green

۰/۱ گرم از بافت خشک گیاهی در ۳ میلی‌لیتر متانول اسیدی ۱ درصد ساییده و سپس سانتریفیوژ شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره متانولی اسیدی ۱/۵ میلی‌لیتر سدیم استات ۵ درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۲ درصد اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲/۵ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل از منحنی استاندارد روتین استفاده شد (Akkol et al., 2007).

۵.۲.۲. اندازه‌گیری محتوای آنتوسیانین کل

۰/۱ گرم از بافت خشک گیاهی با ۵ میلی‌لیتر متانول اسیدی ۱ درصد ساییده و سپس سانتریفیوژ شد. محلول رویی به فالکون‌های جدید انتقال داده و به مدت یک شب در تاریکی قرار داده شد. در نهایت، جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین کل از رابطه‌ی ضریب خاموشی استفاده گردید (Krizek et al., 1998).

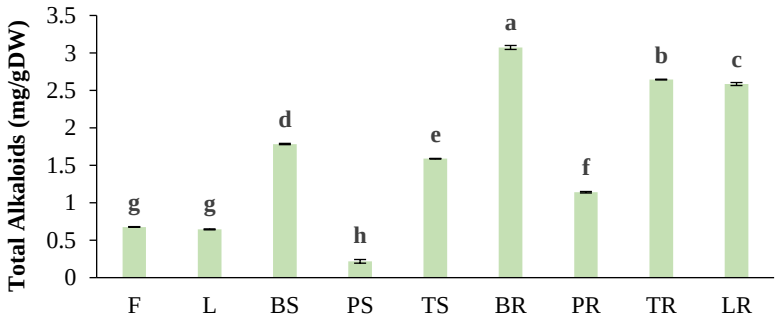
۳.۲. تجزیه و تحلیل آماری

آنالیزهای آماری در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها به وسیله آزمون one way ANOVA توسط نرم افزار SPSS (نسخه ۲۰) انجام شد. آزمون دانکن جهت معنی‌دار بودن تفاوت ها در سطح $p\leq ۰/۰۵$ انجام شد.

۳. تایج

۱.۳. بررسی محتوای آلکالوئید کل

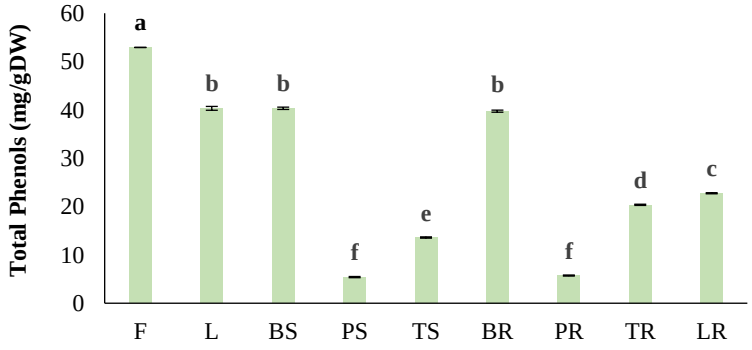
همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، محتوای آلکالوئید کل در اندام‌های مختلف اختلاف معنی‌داری داشت. بیشترین مقدار محتوای آلکالوئید کل دراندام ریشه به ویژه در پوست ریشه مشاهده شد. پس از آن، کل ریشه و ریشه های جانبی ریز بیشترین مقدار را نشان دادند. پس از ریشه، بیشترین مقدار محتوای آلکالوئید کل در اندام ساقه به خصوص در پوست ساقه مشاهده شد. به طور کلی، محتوای الکالوئید کل در پوست و کل ساقه به طور تقریبی نصف پوست ریشه بود. کمترین مقدار آلکالوئید کل در مغز ساقه مشاهده شد. مقدار آلکالوئید کل میوه و برگ تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.



شکل ۱. محتوای آلکالوئید کل در اندام‌های مختلف. مقادیر نشان داده شده میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف متفاوت نشان دهنده معنی-دار بودن تفاوت‌ها در سطح P ≤۰/۰۵ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد. حروف ذکر شده در محور افقی نمودار نشان دهنده‌ی میوه (F)، برگ (L)، پوست ساقه (BS)، مغز ساقه(PS)، کل ساقه (TS)، پوست ریشه (BR)، مغز ریشه (PR)، کل ریشه (TR) و ریشه‌های جانبی ریز (LR) می‌باشند.

۲.۳. بررسی محتوای فنل کل

بیشترین مقدار فنل کل در میوه می‌باشد. پس از آن تجمع ترکیبات فنلی به ترتیب در برگ، ریشه و ساقه مشاهده شد. مقدار فنل کل بافت پوست ریشه و پوست ساقه با برگ یکسان بوده و اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد اما بطور کلی ریشه و ساقه کمتر از برگ دارای ترکیبات فنلی می‌باشند. هم چنین کمترین مقدار ترکیبات فنلی در مغز ساقه و مغز ریشه می‌باشد که بایکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (شکل ۲).

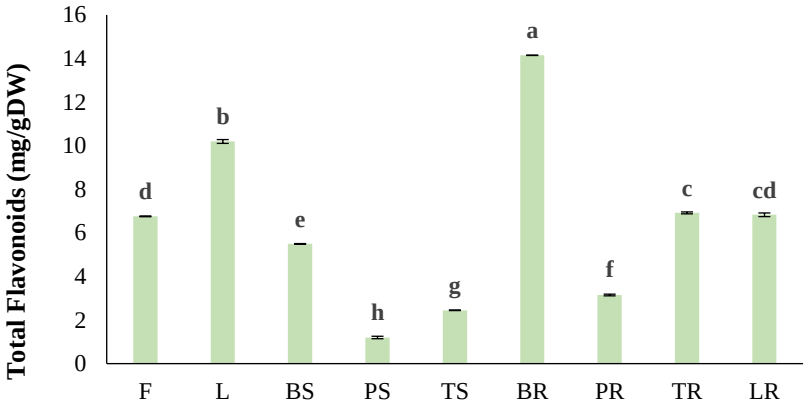


شکل ۲. محتوای فنل کل در اندام‌های مختلف. مقادیر نشان داده شده میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح P ≤۰/۰۵ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد. حروف ذکر شده در محور افقی نمودار نشان دهنده‌ی میوه (F)، برگ (L)، پوست ساقه (BS)، مغز ساقه(PS)، کل ساقه (TS)، پوست ریشه (BR)، مغز ریشه (PR)، کل ریشه (TR) و ریشه‌های جانبی ریز (LR) می‌باشند.

۳.۳. بررسی محتوای فلاونوئید کل

با توجه به شکل ۳ محتوای فلاونوئید کل در تمام اندام‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارد. بیشترین محتوای فلاونوئید کل در بافت پوست ریشه و پس از آن در برگ مشاهده شد. محتوای ترکیبات فلاونوئیدی در کل ریشه و میوه با یکدیگر متفاوت بودند.

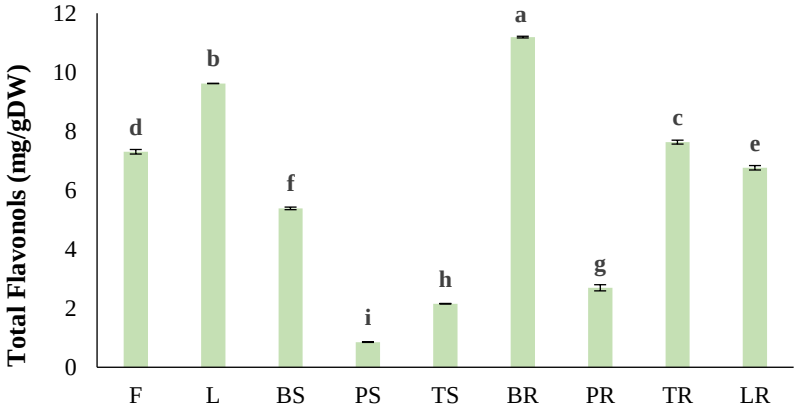
اما ریشه‌های جانبی ریز با آن‌ها اختلاف معنی‌داری نداشتند. کمترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی در بافت مغز ساقه نسبت به سایر اندام‌ها و بافت‌ها مشاهده شد.



شکل ۳. محتوای فلاونوئید کل در اندام‌های مختلف. مقادیر نشان داده شده میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح P ≤۰/۰۵ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد. حروف ذکر شده در محور افقی نمودار نشان دهنده‌ی میوه (F)، برگ (L)، پوست ساقه (BS)، مغز ساقه(PS)، کل ساقه (TS)، پوست ریشه (BR)، مغز ریشه (PR)، کل ریشه (TR) و ریشه‌های جانبی ریز (LR) می‌باشند.

٤.٣. بررسی محتوای فلاونول کل

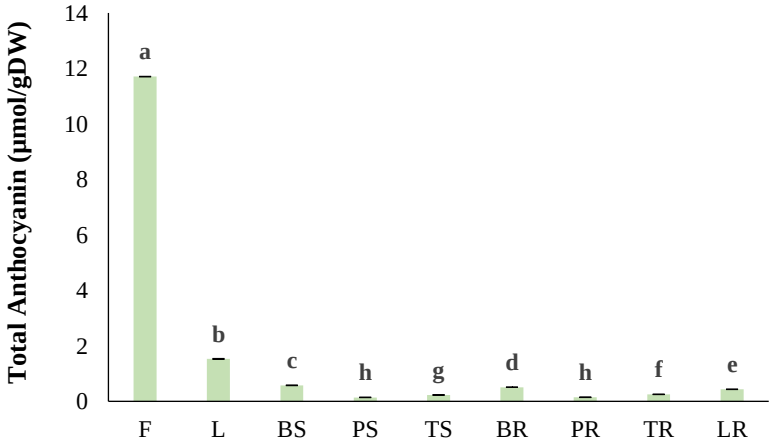
نتایج ما در شکل ۴ نشان می‌دهد که محتوای فلاونول کل در تمام اندام‌ها و بافت‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند. بیشترین محتوای فلاونول کل در اندام ریشه به خصوص در بافت پوست ریشه و پس از آن در برگ دیده شد. پس از آن بیشترین ترکیبات فلاونولی در اندام میوه مشاهده شد. همچنین، در بافت مغز ساقه کمترین میزان محتوای فلاونول کل ارزیابی شد.



شکل ۴. محتوای فلاونول کل در اندام‌های مختلف. مقادیر نشان داده شده میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح P ≤۰/۰۵ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد. حروف ذکر شده در محور افقی نمودار نشان دهنده‌ی میوه (F)، برگ (L)، پوست ساقه (BS)، مغز ساقه(PS)، کل ساقه (TS)، پوست ریشه (BR)، مغز ریشه (PR)، کل ریشه (TR) و ریشه‌های جانبی ریز (LR) می‌باشند.

۵.۳. بررسی محتوای آنتوسیانین کل

مقدار آنتوسیانین در میوه اختلاف قابل توجهی نسبت به سایر اندام ها داشت، به طوری که مقدار آن ۶ برابر بیشتر از برگ بود. ساقه و ریشه نسبت به برگ و میوه آنتوسیانین کمتری داشتند.



شکل ۵. محتوای آنتوسیانین کل در اندام‌های مختلف. مقادیر نشان داده شده میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $P \leq ۰/۰۵$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد. حروف ذکر شده در محور افقی نمودار نشان دهنده‌ی میوه (F)، برگ (L)، پوست ساقه (BS)، مغز ساقه(PS)، کل ساقه (TS)، پوست ریشه (BR)، مغز ریشه (PR)، کل ریشه (TR) و ریشه‌های جانبی ریز (LR) می‌باشند.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

گیاهان طیف گسترده‌ای از ترکیبات آلی را تولید می‌کنند که متابولیت‌های ثانوی نامیده می شوند. این ترکیبات ثانوی از گیاهان در برابر گیاهخواران و عوامل بیماریزا دفاع می‌کنند. برخی از این ترکیبات به عنوان دارو به مصرف انسان‌ها می‌رسد. زرشک یکی از گیاهان دارویی ارزشمند است که خواص درمانی آن به دلیل حضور انواع مختلفی از ترکیبات ثانوی مانند ترکیبات آلکالوئیدی، فنلی، آنتوسیانین و سایرآنتی اکسیدان‌ها است (Srivastava et al., 2015). در این مطالعه، ترکیبات آلکالوئیدی، فنلی، فلاونوئیدی، فلاونولی و آنتوسیانین در اندام‌ها و بافت‌های مختلف گونه *B. integerrima* بررسی شد.

مقایسه محتوای ترکیبات آلکالوئیدی در اندام‌های مختلف نشان داد که بیشترین مقدار ترکیبات آلکالوئیدی در اندام ریشه و پس از آن در ساقه مشاهده شد. در ریشه و ساقه، نسبت مقدار آلکالوئید کل در بافت پوست بیشتر از بافت مغز آن بود. پس از ساقه، محتوای آلکالوئید کل در برگ و میوه با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند و کمترین مقدار را در میان اندام‌ها به خود اختصاص دادند. Andola و همکاران در سال ۲۰۱۰ محتوای ترکیبات آلکالوئیدی به ویژه بربرین بر روی سه گونه‌ی مختلف از زرشک با

نام های *B. aristata* ، *B. lycium* و *B. asiatica* را بررسی کردند. آن‌ها گزارش دادند که محتوای بربرین به عنوان مهم‌ترین آلکالوئید در ریشه هر سه گونه بیشتر از پوست ساقه می‌باشد (Andola et al., 2010).

بررسی محتوای ترکیبات فنلی در اندام‌های مختلف نشان داد که در میان اندام‌ها میوه بیشترین محتوای ترکیبات فنلی را دارا است. پس از آن به ترتیب اندام‌های برگ، ریشه و ساقه دارای بیشترین محتوای ترکیبات فنلی بودند. نتایج پژوهشی بر ظرفیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات فنلی میوه *B. vulgaris* نشان داد که اسیدهای آلی و ترکیبات فنلی در بسیاری از خواص میوه‌ها دارای نقش مهمی هستند (Gundogdu, 2013). در این مطالعه مشخص شد که فراوان‌ترین ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در میوه‌ی زرشک شامل، کلروژنیک اسید، گالیک اسید، کافئیک اسید، کوماریک اسید، کتچین، روتین و کوئرستین می‌باشد که این ترکیبات فنلی به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی برای سلامتی و تغذیه انسان اهمیت فراوانی دارند. غالب‌ترین اسیدهای آلی در میوه این گیاه عبارتند از مالیک اسید، سیتریک اسید، تارتاریک اسید و سوکسینیک اسید. محتوای اسیدهای آلی تعیین کننده خواص خوراکی میوه می‌باشد (Gundogdu, 2013).

نتایج همچنین نشان داد که محتوای آنتوسیانین کل در میوه به میزان قابل توجهی با سایر اندام ها تفاوت داشت. Sun و همکارانش در سال ۲۰۱۴ با مطالعه بر روی آنتوسیانین‌های میوه *B. heteropoda* بیان کردند که محتوای بالای آنتوسیانین میوه یک منبع عالی از ترکیبات مفید غذایی و رنگ‌های طبیعی می‌باشد. ازطرفی، آنتوسیانین‌ها با از بین بردن گونه‌های رادیکال آزاد به عنوان آنتی- اکسیدان عمل می‌کنند. مهم‌ترین آنتوسیانین‌های میوه این گیاه شامل Delphinidin-3-O-glucopyranoside، Cyanidin-3-O-glucopyranoside، Petunidin-3-O-glucopyranoside، Peonidin-3-O-glucopyranoside، Malvidin-3-O-glucopyranosidn، Peonidin، Malvidin می‌باشد (Sun et al., 2014).

منابع

رحیمی، ن.، مسکوکی، ع.، مرتضوی، س.ع.، الهامی‌راد، الف.، رجب‌زاده، ق. ۱۳۹۳. مطالعه و بهینه‌سازی شرایط استخراج بربرین از ریشه زرشک بی‌دانه توسط دی‌اکسید کربن فوق بحرانی. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی. جلد۳. شماره۱. صفحات۷۸-۶۷.

Ainsworth, E.A., Gillespie, K.M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. Nature Protocols. 2(4): 875–877.

Akkol, E.K., Goger, F., Kosar, M., Baser, K.H.C. 2008. Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. Food Chemistry. 108(2008): 942–949.

Andola, H.C., Rawal, R.S., Rawat, M.S.M., Bhath, I.D., Purohit, V.K. 2010. analysis of berberine content using HPTLC fingerprinting of root and bark of three himalayan *Berberis* species. Asian Journal of Biotechnology. 2(4): 239-245.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C. 2002. estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis. 10(3): 178-182.

Gundogdu, M. 2013. determination of antioxidant capacities and biochemical compounds of *Berberis vulgaris* L. fruits. Advances in Environmental Biology. 7(2): 344-348.

Krizek, D.T., Britz, S.J., Mirecki, R.M. 1998. inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. Physiologia Plantarum. 103: 1-7.

Rahimi, M., Lorigoini, Z., Zamani, H., Rafiean, M. 2017. *Berberis vulgaris*: specifications and traditional uses. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 20:569-587.

Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R., Verdian-Rizi, M. 2008. spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences. 32:17-20.

Singh, S., Pathak, N., Fatima, E., Negi, A.S. 2021. plant isoquinoline alkaloids: Advances in the chemistry and biology of berberine. European Journal of Medicinal Chemistry. 226: 113839.

Srivastava, S., Srivastava, M., Misra, A., Pandey, G., Rawat, A.K.S. 2015. a review on biological and chemical diversity in *Berberis* (Berberidaceae). Experimental and Clinical Sciences Journal. 14: 247-267

Sun, L.L., Gao, W., Zhang, M.M., Li, C., Wang, A.G., Su, Y.L., Ji, T.F. 2014. composition and antioxidant activity of the anthocyanins of the fruit of *Berberis heteropoda* Schrenk. Molecules. 19(11): 19078-19096.

Vojodi, L., Valizadeh Kamran, R., Hassanpouraghdam, M.B. 2019. evaluation of some phytochemical characteristics of *Berberis integerrima* in response to nano-zinc foliar application and post-harvest drying temperature. Plant Product. 42(3) 345-358.

Comparative investigation of secondary metabolites in different organs of *Berberis integerrima*

Nastaran zhaleh[1], Mohsen Sharifi[*1], Elahe samari[1]

[1]Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

abstract

Medicinal plants have secondary metabolites to play roles in treating many diseases. A species of barberry (*Berberis integerrima*) belongs to a medicinal endemic plant of Iran. The most important secondary metabolites in barberry are alkaloid compounds. This plant has antimicrobial, anti-inflammatory, anticancer, antidiabetic, and pain killer effects that can be associated with the presence of alkaloid, phenolic compounds as well as other antioxidant agents. This research was performed for investigating the contents of secondary metabolites in different organs and tissues in this plant species. Firstly, this plant was harvested from wild habitat, dried and then, ground to fine powder. The contents of total alkaloid, phenolic, flavonoid, flavonol, and anthocyanin compounds were superlatively assayed in different organs and tissues including fruit, leaf, bark stem, pith stem, stem, bark root, pith root, root, and lateral root. The results showed that the highest content of total alkaloid, flavonoid, and flavonol compounds were observed in root organ. The contents of aforesaid compounds were higher in bark root than pith root. While, the lowest contents of these compounds were observed in pith stem. The highest amounts of phenolic compounds were determined in fruit, leaf, bark stem and bark root, respectively. The concentration of anthocyanin had significantly variations amongst fruit and the other organs and tissues, which was 6-fold more than leaf. Finally, it can be explained that the content of anthocyanin was higher in arial organ such as fruit, and leaf and the content of total alkaloids was higher in root within *B. integerrima*.

Keywords: Alkaloid compound, Anthocyanin, Barberry, Phenolic compound, Secondary metabolites

،

[1] Msharifi@modares.ac.ir

بررسی میزان اسیدهای چرب ژنوتیپ‌های مختلف گیاه کرچک در شرایط آب و هوایی اصفهان

حسینعلی اسدی قارنه*، شهلا اعتباریان

گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

چکیده

گیاه کرچک با نام علمی *Ricinus communis* L.، یکی از گیاهان روغنی خانواده فرفیون است. روغن کرچک در بین روغن‌های گیاهی بی‌نظیر بوده و دارای ارزش سنتی و دارویی بالایی است. هدف از این پژوهش بررسی درصد چربی و محتوای اسیدهای چرب موجود در ۱۵ ژنوتیپ مختلف گیاه کرچک در شرایط آب و هوایی استان اصفهان بود. نتایج این تحقیق نشان داد که تفاوت زیادی بین ژنوتیپ‌های گیاه کرچک مورد مطالعه از نظر درصد چربی وجود دارد. مقایسه میانگین به روش حداقل تفاوت معنی‌دار(LSD) در سطح احتمال ۵ درصد نیز بیانگر این مطلب بود که ژنوتیپ ساری با دارا بودن ۴۲/۸ درصد بیشترین درصد چربی و ژنوتیپ ملایر با دارا بودن ۲۶/۳ درصد، کم‌ترین میزان چربی را به خود اختصاص داده‌اند. نتایج تجزیه واریانس حاکی از آن بود که اسیدهای چرب پالمیتیک اسید، پالمیتولئیک اسید، اسید استئاریک، اولئیک اسید، اسید لینولئیک، ای- لینولئیک اسید، آ- لینولئیک اسید، ترانس- لینولئیک اسید در سطح ۱ درصد بین ژنوتیپ‌های مختلف بسیار معنی‌دار می‌باشند. درصورتی‌که برای مارگاریک اسید و هپتادکنوئیک اسید تنوع ژنتیکی اندکی بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی دیده شد. بنابراین تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بین ژنوتیپ‌های گیاه کرچک مورد بررسی، از نظر درصد چربی و اکثر اسیدهای چرب موجود است. همچنین میتوان با کشت ژنوتیپ‌های ساری و شهرکرد در اصفهان از عملکرد بالای چربی آن در صنعت استفاده کرد. به‌طور کلی عوامل محیطی در کنار پتانسیل ژنتیکی می‌توانند بر روی درصد چربی و میزان اسید چرب گیاه کرچک تأثیرگذار باشند.

واژگان کلیدی: کرچک، درصد چربی، اسیدهای چرب اشباع، اسیدهای چرب غیراشباع

* h.asadi@khuisf.ac.ir

۱. مقدمه

گیاه کرچک با نام علمی *Ricinus communis L.* و نام انگلیسی Castor bean یکی از گیاهان روغنی خانواده فرفیون[1] است. خانواده فرفیون دارای ۳۳۱ جنس و ۸۰۰ گونه است، که اغلب شیرابه‌دار بوده و گل‌های تک‌جنسی دارند (دوازده امامی و مجنون حسینی،۱۳۸۷).

پراکنش این گیاه در شرق و شمال شرقی آفریقا تا خاورمیانه بوده و در سراسر مناطق حاره اهلی شده‌اند. گیاه کرچک در ایران و بسیاری از نقاط جهان علاوه بر مصارف صنعتی و دارویی به‌عنوان گیاه زینتی نیز کشت می‌شود (دوازده امامی و مجنون حسینی،۱۳۸۷). این گیاه به دلیل ویژگی منحصر به فرد خود به‌عنوان یکی از گیاهان مقاوم به شرایط آب و هوایی مختلف شناخته شده است. به طوری‌که در مناطق سردسیر گیاهی علفی و یکساله بوده که ارتفاع آن به ۲ تا ۳ متر می‌رسد (مارتر[2]، ۱۹۸۱)، در حالیکه در مناطق گرمسیری به صورت درختچه‌های چند ساله می‌باشد و ارتفاع آن به بیش از سه متر می‌رسد (کوتروباس و همکاران[3]، ۱۹۹۹).

کرچک گیاهی بوته‌ای با رشد سریع می‌باشد. برگ‌های آن به رنگ سبز یا مایل به قرمز هستند که حدود ۳۰ تا ۶۰ سانتی‌متر قطر دارند و حاوی ۵ تا ۱۲ لوب عمیق با مقطع دندانه‌ایی درشت می‌باشند. برگ‌ها به صورت متناوب بر روی ساقه قرار گرفته‌اند. ساقه‌ها از نظر رنگدانه متفاوت هستند. میوه این گیاه یک کپسول خاردار سه هسته‌ای می‌باشد. اندازه بذرهای ژنوتیپ‌های مختلف، تفاوت چشمگیری با یکدیگر دارند(جنا و کوپتا[4]، ۲۰۱۲).

گیاه کرچک یکی از گیاهان مهم و دارویی مورد استفاده در صنایع آرایشی، بهداشتی و داروسازی می‌باشد. اثرات دارویی گیاه کرچک مربوط به وجود ترکیبات فیتوشیمیایی مانند آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و تانن‌ها است که دارای فعالیت‌های بیولوژیکی دیگری نیز هستند (اگونی[5]، ۲۰۰۶).

روغن گیاه کرچک دارای ارزش سنتی و دارویی بالایی برای درمان عفونت های کبدی، معده درد ، نفخ معده، یبوست، التهاب، زگیل، قولنج، ورم روده، تب، سردرد و به‌عنوان یک ماده ضد تحریک است. داروهای شیمیایی گیاهی متنوعی از آن می‌توان نام برد که دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های دارویی ارزشمند از جمله محافظت کبدی، ضد درد، آنتی‌اکسیدان، ضد زخم، ضد سرطان، ضد التهاب، ضد درد مرکزی، ضد دیابت، ضد میکروب، ضد ویروس و ترمیم زخم می‌باشد (الکوسی و همکاران[6]، ۲۰۲۱).

محققان امروزه توانسته‌اند از دهیدراسیون و ایزومریزاسیون روغن کرچک ایزومرهای اسید لینولئیک کونژوگه(CLA) تولید کنند(ویلنیو و همکاران[7]، ۲۰۰۵). پژوهشگران ثابت کرده‌اند کـه ایزومرهای اسید لینولئیک کونژوگه نقش مهمی در سلامتی

[1] . Euphorbiaceae
[2] . Marter
[3] . Koutroubas *et al.*
[4] . Jena and Gupta
[5] . Ogunniyi
[6] . Elkousy *et al.*
[7] . Villeneuve *et al.*

انسان و حیوان دارند. بر همین اساس تحقیقات نشان می‌دهد که افزایش میزان اسید لینولئیک کونژوگه در بافتهای پستانداران باعث کاهش سرطان سینه و سرطان پروستات می‌شود. همچنین اخیراً از روغن کرچک ترکیب ۲ - نوننال استخراج شده است که به عنوان طعم دهنده مورد استفاده قرار می گیرد (بورچ جنسن[1]، ۱۹۹۷).

دانه کرچک حدود ۵۵- ۵۰ درصد روغن داشته و میزان آن در واریته‌های تجاری معمولا بین ۴۰ تا ۶۰ درصد می‌باشد و اسیدهای چرب روغن کرچک شامل رسینولئیک اسید ۹۰٪، اسید لینولئیک[2] ۴/۲٪، اسید لینولنیک[3] ۰/۳٪ اولئیک اسید[4] ۳٪، استئاریک اسید[5] ۱٪، دی هیدروکسی استئاریک اسید[6] ۰/۷٪، پالمتیک اسید[7] ۱٪ و ایکوزانوئیک اسید[8] ۰/۳٪ است (اگونی، ۲۰۰۶).

از مهمترین عوامل محیطی که تاثیر عمده‌ای بر کیفیت و کمیت مواد موثره گیاهان دارویی دارند، میتوان به تراکم کشت، آب، عناصر غذایی، نور، حرارت، موقعیت جغرافیایی و عوامل مربوط به خاک و غیره اشاره کرد (پالویچ[9]، ۱۹۸۷). تحقیقات انجام گرفته روی گیاه کرچک نشان داد که میزان روغن و ترکیبات اسیدهای چرب در مناطق و زمانهای مختلف کاشت، متفاوت می‌باشد(علیرضالو و همکاران، ۲۰۱۱؛ امیدبیگی و همکاران، ۲۰۰۹). بر اساس نظر جوس و همکاران[10](۱۹۹۰) میزان اسیدهای چرب غیراشباع دانه‌های روغنی مناطق سرد نسبت به مناطق گرم بیشتر است.

در رابطه با بررسی عملکرد و اجزاء عملکرد و میزان روغن ژنوتیپ‌های مختلف کرچک در ایران اطلاعات خیلی ناچیزی در دسترس می‌باشد و در این رابطه تحقیقات بسیار اندکی صورت گرفته است. بنابراین در این پژوهش با جمع‌آوری بذور گیاه کرچک از ۱۵ شهر مختلف ایران شامل اصفهان، ورامین، ساری، فارس، برخوار، زاهدان، ایرانشهر، شهرکرد، جیرفت، ملایر، تبریز، رزن تبریز، همدان، ابرکوه یزد و مشهد به بررسی تاثیر آب و هوای یکسان بر روی درصد چربی و اسیدهای چرب ژنوتیپ‌های مختلف این گیاه پرداخته شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲ .منطقه مورد مطالعه

---

[1] . Borch-Jensen
[2] . Linoleic acid
[3] . Linolenic acid
[4] . Oleic acid
[5] . Stearic acid
[6] . Dihydroxy stearic acid
[7] . Palmitic acid
[8] . Eicosaenoic acid
[9] . Palevich
[10] . Jose *et al.*

این پژوهش طی سالهای ۱۴۰۰ تا ۱۴۰۱ در مزرعه‌ی تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) واقع در شرق اصفهان منطقه‌ی خاتون آباد انجام شد. محل این تحقیق در عرض جغرافیایی ۳۲ درجه و ۴۰ درجه شمالی و طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۴۸ دقیقه شرقی واقع شده است. ارتفاع از سطح دریا ۱۵۵۵ متر و اقلیم منطقه خشک و بسیار گرم بوده به طوریکه دارای زمستانهای نسبتا سرد و تابستانهای گرم و خشک می‌باشد.

قبل از شخم زدن ابتدا خاک مزرعه را آزمایش داده تا نوع خاکی که در آن کشت می‌کنیم مشخص شود. بدین منظور نمونه خاک از مزرعه جمع‌آوری گردید و به آزمایشگاه شرکت خدمات مهندسی شاخص سازان زاینده رود ارسال شد. در نهایت نتایج آنالیز خاک به شرح جدول۱ بدست آمد.

جدول۱. آنالیز خاک محل انجام آزمایش

Texture	Sand	Silt	Clay	K(ava)	P(ava)	N	OC	$CaSO_4$	TNV	SP	PH	Ec
	%	%	%	ppm	ppm	%	%	%	%	%		ds/m
SiCL	۱۱	۵۲	۳۷	۵۱۰	۵۸	۰/۰۶۱	۰/۵۷	۰/۰۸	۴۳	۵۸	۷/۸	۸/۵

۲.۲. روش تحقیق

بذور مورد نیاز برای این تحقیق از ۱۵ منطقه‌ی مختلف ایران جمع‌آوری گردید. سپس بذرهای جمع‌آوری شده از شهرهای مختلف ایران شامل اصفهان، ورامین، ساری، زاهدان، ایرانشهر، فارس،شهرکرد، جیرفت، ملایر، تبریز، برخوار، رزن تبریز، همدان، ابرکوه یزد و مشهد در مزرعه‌ی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) در بهار سال ۱۴۰۰ کشت شد.

جهت آماده‌سازی سطح زیر کشت ابتدا کود حیوانی روی مساحت مد نظر پخش گردید. سپس به‌منظور بهبود ساختار خاک و از بین بردن علفهای هرز عملیات شخم زدن در زمین انجام شد. که با این عمل لایه زیرین خاک به سطح زمین آورده شد و کودهایی که در سطح خاک قرار داشتند به درون خاک که محیطی مساعد برای پوسیده شدنشان می‌باشد، منتقل شدند. پس از آن زمین تسطیح گشت.

زمین بعد از آماده‌سازی به سه قسمت مساوی تقسیم شد. در این پژوهش روش کاشت به صورت جوی و پشته در نظر گرفته شد. بنابراین در هر کرت ۱۵ جوی و پشته به منظور کشت ۱۵ ژنوتیپ از بذور کرچک آماده گردید. فاصله بین ردیفها از همدیگر یک متر و فاصله بوته روی ردیف نیم متر در نظر گرفته شد (شیدفر و همکاران، ۱۳۹۰). در کل برای هر ژنوتیپ سه ردیف به طول پنج متر ایجاد شد. به‌منظور آبیاری بذور از نوار تیپ آبیاری یا همان آبیاری قطره‌ای استفاده شد.

اولین آبیاری بلافاصله بعد از کاشت بذور کرچک صورت گرفت و آبیاری‌های بعدی به فاصله‌ی هر ۴ روز یکبار با استفاده از آبیاری قطره‌ای و به طور کاملاً یکسان برای تمامی لاینها انجام شد.

جهت اندازه‌گیری نوع و میزان اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع این گیاه از دستگاه کروماتوگرافی گازی[1](GC) استفاده شد. برای شناسایی ترکیبهای روغن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی، مواد باید فراریت لازم را داشته باشد. از این رو اسیدهای چرب قبل از تزریق به دستگاه متیل استری شدند تا به مشتقات فرار با نقطه جوش پایین‌تر تبدیل شوند.

به منظور آنالیز متیل استر اسیدهای چرب، از دستگاه گاز کروماتوگرافی Agilent مدل ۶۸۹۰ ساخت کشور آمریکا، دارای آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای(FID) و ستون موئینه HP_88 (طول ستون ۱۰۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ و ضخامت فیلم ۰/۲ میکرومتر) استفاده شد. گاز نیتروژن با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان گاز حامل(هلیم) استفاده شد. دمای محل تزریق ۲۶۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. برنامه دمایی برای جداسازی به این صورت انجام شد که دمای آون روی ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه ثابت و سپس با سرعت ۴ درجه سلسیوس بر دقیقه تا دمای ۲۴۰ درجه سلسیوس و مدت ۳۰ دقیقه ثابت در این دما قرار گرفت. دمای آشکارساز روی ۲۸۰ درجه سلسیوس بود. میزان ترزیق هر نمونه ۲۰ میکرولیتر، برای شناسایی اسیدهای چرب زمان بازداری با زمان بازداری استانداردهای متیل استر تهیه شده تحت شرایط آزمایشی یکسان مقایسه و زمان بازداری هر یک از نمونه‌ها معین شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به کمک نرم‌افزار SAS انجام شد. در این پژوهش از طرح بلوک کامل تصادفی و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار(LSD) در سطح احتمال ۱ درصد انجام گردید.

۳. نتایج

نتایج تجزیه واریانس صفت چربی نشان داد که تفاوت بسیار معنی‌داری بین ژنوتیپهای گیاه کرچک وجود دارد. این مطلب حاکی از وجود تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه بین ژنوتیپهای کرچک از نظر صفت چربی می‌باشد. ژنوتیپ ساری با میانگین ۴۲/۸ درصد بیشترین میانگین درصد چربی را به خود اختصاص دادند. از طرفی، ژنوتیپ ملایر با دارا بودن ۲۶/۳ درصد چربی کمترین میانگین این صفت را نشان داد. شیدفر و همکاران(۱۳۹۰) در پژوهشی بر روی ژنوتیپهای مختلف کرچک در منطقه آذربایجان غربی، به این نتیجه رسیدند که رقم مهریز به دلیل استفاده بهتر از امکانات محیطی و توان بالای مقابله با عوامل نامساعد محیطی که باعث افزایش دوره رشد رویشی گیاه می گردد دارای بیشترین میزان چربی بوده و حتی عملکرد دانه بالاتری نیز در مقایسه با سایر ارقام داشت. بنابراین میتوان دریافت، مقدار روغن در بذر کرچک یک صفت ژنتیکی است اما تحت تاثیرشرایط محیطی و عملیات زراعی و زمان برداشت قرار می گیرد(لائورتی و ماراس[2]، ۱۹۹۵).

نتایج تجزیه واریانس نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی زیادی بین ژنوتیپهای کرچک مورد بررسی از نظر صفت اولئیک اسید بود مقایسه میانگینها نیز نشان دهنده همین مطلب بوده و بر امکان گزینش ژنوتیپهای مطلوب تاکید می‌نماید. نتایج نشان داد

[1]. Gas chromatography- mass spectrometry
[2]. Laureti and Marras

که ژنوتیپ زاهدان بیشترین میانگین اولئیک اسید(۳۰/۹۶ درصد) و ژنوتیپ تبریز کمترین میانگین(۲۲/۱۹ درصد) این صفت را دارا می‌باشند. سایر ژنوتیپ‌ها بین این دو ژنوتیپ قرار گرفتند.

نتایج تحقیقات نژاد حبیب‌وش و همکاران(۱۳۹۹) بر روی نسترن حاکی از آن بود که بیشترین میزان اسید اولئیک از نمونه روغن رویشگاه شاهین دژ و کمترین میزان آن از نمونه روغن بوکان و ارومیه حاصل شد. مقایسه میانگینها نشان داد بین شاهین دژ و سایر مناطق از لحاظ مجموع درصد اسیدهای چرب غیراشباع تفاوت معنی‌داری وجود دارد، که این اختلاف به موجب تاثیر عوامل محیطی بر روی آنها می‌باشد.

تفاوت بسیار معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های کرچک از نظر لینولئیک اسید وجود دارد. مقایسه میانگین‌ها نیز نشان داد که ژنوتیپ رزن با ۴۵/۱ درصد بیشترین و ژنوتیپ ابرکوه با ۳۸/۰۴ درصد کمترین میانگین لینولئیک اسید را دارا می‌باشند. لذا تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای از نظر این خصوصیت بین ژنوتیپ‌های کرچک وجود داشته که انجام انتخاب را تسهیل می‌نماید. نیک- نشان و همکاران (۱۳۹۴) با انجام تحقیقی بر روی ژنوتیپ‌های کرچک اصفهان، اردستان، اراک، نایین، یزد و اهواز در شرایط تنش کم آبی و در دو محیط اصفهان و شهرکرد به این نتیجه دست یافتند که بیشترین عملکرد دانه و روغن متعلق به اکوتیپ اصفهان در منطقه اصفهان و تحت شرایط عدم تنش می‌باشد. لذا، اعلام نمودند که پاسخ ژنوتیپهای کرچک از نظر خصوصیات کمی و کیفی در واکنش به مکان و شرایط محیطی مانند تنش خشکی متفاوت می‌باشد. لذا، میتوان دریافت که هر ژنوتیپ برای رسیدن به حداکثر پتانسیل تولید خود بایستی در شرایط مساعد محیطی و اقلیمی قرار گیرد.

در مورد بوتیریک اسید نتایج جالبی حاصل شد. بدین صورت که تنها ژنوتیپی که دارای ۰/۰۲ درصد از این اسید چرب بود ژنوتیپ شهرکرد بود و سایر ژنوتیپ‌ها دارای مقدار صفر بودند. مقایسه میانگین‌ها نیز حاکی از آن بود که ژنوتیپ رزن با دارا بودن ۰/۰۲ درصد تنها ژنوتیپی است که واجد این اسید چرب می‌باشد و سایر ژنوتیپ‌ها حاوی این اسید چرب نبودند.

نتایج نشان داد که ژنوتیپ تبریز بیشترین میزان تریکوسیلیک اسید، اکوساتریونیک اسید و اورسیک اسید و کمترین میزان میریستیک اسید را دارد. همچنین ژنوتیپ جیرفت بیشترین میزان ترانس- اولئیک اسید، میریستیک اسید، پالمیتولئیک اسید، پنتادسیکلیک اسید، هپتادکنونیک اسید، آراشیدیک اسید و کمترین میزان وای لینولئیک اسید و استئاریک اسید را در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی به خود اختصاص داده است.

ژنوتیپ اصفهان دارای بیشترین میزان لائوریک اسید، بهینیک اسید، پالمیتولئیک اسید و آ- لینولئیک اسید بود و از نظر میزان ترانس- لینولئیک اسید و کروونیک اسید کمترین میزان را در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی دارا بود.

ژنوتیپ جیرفت ۱۲/۱۱ درصد پالمیتیک اسید داشته که بالاترین مقدار این صفت می‌باشد. همچنین ژنوتیپ زاهدان ۹/۰۶ درصد پالمیتیک اسید داشته که کمترین مقدار این خصوصیت می‌باشد. میانگین سایر ژنوتیپها بین ژنوتیپهای جیرفت و زاهدان قرار داشتند. طی پژوهشی بر روی گیاه کرچک، بیشترین میزان پالمیتیک اسید در رقم بندرعباس و کمترین مقدار مربوط به

منطقه تهران گزارش شد (زارع و همکاران، ۱۳۹۵). میزان پالمتیک اسید در شرایط آب و هوای اصفهان تغییر یافته است. پالمیتیک اسید طی فرآیندی از استیل کوآنزیم A به‌وجود می‌آید. برای انجام این فرآیند نیاز به انرژی می‌باشد که این انرژی توسط نور محیط دریافت می‌شود. بنابراین می‌توان گفت میزان عملکرد پالمتیک اسید وابسته به نور محیط کشت می‌باشد.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

روغنهای گیاهی در مواد غذایی و صنایع مختلف کاربرد فراوان دارند و کوشش‌های بسیاری جهت یافتن منابع جدید، بهبود فرآیندها، اصلاح دانه‌های روغنی و غیره صورت می‌گیرد. در سالهای اخیر به‌طور موازی تلاشهایی جهت دستیابی و شناسایی روغن‌هایی که خواص کاربردی ویژه‌ای دارند نیز صورت گرفته است. بسیاری از این روغن‌ها دارای مقادیر بالا یا نسبت مناسبی از اسیدهای چربی که از دیدگاه تغذیه‌ای، پزشکی یا صنعتی مطلوبند می‌باشند. علاوه بر آن روغن‌های گیاهی به دلیل تامین کالری مورد نیاز بدن به‌عنوان انرژی‌زاترین و فشرده‌ترین منبع سوخت و ساز پس از هیدروکربن‌ها از اهمیت فوق العاده‌ای بهره‌مند بوده و از محصولات مختلفی به‌دست می‌آیند (احمدی، ۱۹۹۹).

در پژوهش انجام شده تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بین ژنوتیپ‌های کرچک مورد بررسی از نظر اکثر اسیدهای چرب و نیز کل چربی وجود دارد.

شرایط اقلیمی و کیفیت خاک و آب مناطق مختلف می‌تواند بر بروز صفات مختلف موثر باشد. به‌طوری‌که در تحقیق حاضر مشخص گردید ژنوتیپ ملایر با دارا بودن ۲۶/۳ درصد چربی کمترین میزان چربی را در بین ژنوتیپهای مورد بررسی به خود اختصاص داده است. با توجه به نتایج حاصل به نظر می‌رسد که ژنوتیپهای ساری و شهرکرد ارقام مناسبی از نظر صفت درصد چربی باشند. بنابراین میتوان نتیجه گرفت، ژنوتیپهای ساری و شهرکرد توان بالایی جهت مقابله با عوامل نامساعد محیطی در اقلیم اصفهان را دارند. از طرفی، تلاقی بین ژنوتیپهای دارای درصد بالای روغن (ساری و شهرکرد) و ژنوتیپهایی که درصد پایین چربی دارند (ملایر)، می‌تواند منجر به بروز پدیده تفکیک متجاوز و ظهور نتاجی گردد که میزان بالاتری از درصد چربی و حتی عملکرد دانه را در مقایسه با والدین خود دارند(ایی بیگا و آن ووالو[1]، ۲۰۱۵).

ژنوتیپ زاهدان دارای بیشترین مقادیر اولئیک اسید و ژنوتیپ رزن دارای بیشترین مقادیر لینولئیک اسید می‌باشند. لذا ژنوتیپهای مذکور جهت کشت و استفاده در برنامه‌های انتخاب مناسب می‌باشند. با توجه به اهمیت این اسیدهای چرب در رژیم غذایی میتوان با کشت ژنوتیپهای زاهدان و رزن در اصفهان از این اسیدهای چرب در برنامه‌های غذایی بهره برد.

بنابراین عوامل محیطی در کنار پتانسیل ژنتیکی می‌توانند موتور محرکه تولید در گیاهان باشند. لذا، با دست‌ورزی برخی از متغیرها می‌توان به افزایش تولید امید بیشتری داشت.

[1]. Ibeagha and Onwualu

منابع

دوازده امامی س، مجنون حسینی ن. ۱۳۸۷. زراعت و تولید برخی گیاهان دارویی و ادویه‌ای. چاپ دوم. تهران: انتشارات دانشگاه تهران.

زارع س، پودینه ز.، نجفی م.ع.، براتعلی ف.، جعفری ع.ا. ۱۳۹۵. بررسی برخی صفات کمی و کیفی ژنوتیپ های مختلف کرچک در منطقه بروجرد. مجموعه مقالات اولین کنگره بین المللی و سیزدهمین کنگره ملی علوم زراعت و اصلاح نباتات. کرج. ایران. ۵-۱.

زارع س، نجفی م ع، براتعلی ف، جعفری ع ا. ۱۳۹۵. ارزیابی کیفیت و خصوصیات فیزیکوشیمیائی روغن کرچک در ارقام وحشی و مقایسه آن ها با رقم زراعی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. ۶۱: ۱۵۲-۱۴۳.

شیدفر ر، تاج بخش م، حسن زاده قورت تپه ع، رشدی م. ۱۳۹۰ بررسی برخی صفات زراعی ژنوتیپ های مختلف کرچک در منطقه آذربایجان غربی. مجله الکترونیک تولید گیاهان زراعی. ۴: ۲۰۳-۱۹۵.

نژادحبیب وش، ف.، پیروش، ا.، خاموشی، س. ۱۳۹۹. بررسی و مقایسه میزان روغن و پروفایل اسیدهای چرب میوه جمعیتهای مختلف گیاهان دارویی .*Rosa canina* L در رویشگاه‌های مختلف آذربایجان غربی، شمال غرب ایران. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی. ۳۰(۲): ۴۵- ۶۰.

نیک نشان پ، تدین ع، رفیع الحسینی م، بحرینی نژاد ب. ۱۳۹۴. پاسخ اکوتیپ های مختلف مرچک به تنش کم آبی در شرایط آب و هوایی اصفهان و شهرکرد. مجله به زراعی کشاورزی. ۱۷: ۱۰۳۳-۱۰۱۵.

Ahmadi M.1999. Quality and use of oilseeds. Nashr Amozesh Keshavarzi of Karaj.

Alirezalu, A., Farhadi, N., Shirzad, H., Hazarti, S. 2011. The effect of climatic factors on the production and quality of castor oil, Nat Sci. 9: 15-19.

Borch-Jensena C, Jensenb B, Mathiasenb K, Mollerupa J. 1997. Analysis of seed oil from Ricinus communis and Dimorphoteca pluvialis by Gas and supercritical fluid chromatography. J. Amer. Oil Chem. Soc, 74: 277-284.

Elkousy, R.H., Said, Z.N.A.,Abd El-Baseer, M.A., Abu El Wafa, S.A. 2021. Antiviral activity of castor oil plant (*Ricinus communis*) leaf extracts. Journal of Ethnopharmacology. 271: 1-13.

Ibeagha, O.A., Onwualu, A.P. 2015. Strategies for improving the value chain of castor as an industrial raw material in Nigeria. Agric Engineering International CIGR Journal. 17(3): 217 – 230.

Jena, J., Gupta, A.K., 2012. Ricinus communis Linn: a phytopharmacological review. Int.J.Pharm. Pharmaceut. Sci. 4(4):25-29.

Jose, R.L., Ursicino, D., Rafael, D.Q. 1990. Definite influence of location and climatic condition on the fatty acid composition of sunflower seed oil. Journal of the American Oil Chemists ' Society. 67 :618 -623.

Koutroubas SD, Papakosta DK, Doitsinis A. 1999. Adaptation and yielding ability of castor plant (*Ricinus communis* L.) genitypes in a Mediterranean climate. Eur. J. Agron,11: 227-230.

Laureti, D., G. Marras. 1995. Irrigation of castor (Ricinus communis L.) in Italy. Eur. J. Agron. 4: 229-235.

Marter, A.D. 1981. Castor: Markets, Utilization and Prospects. J Tropical Product Institute, 15 . Laureti, D., G. Marras. 1995. Irrigation of castor (Ricinus communis L.) in Italy. Eur. J. Agron. 2: 55- 78.

Omidbaigi, R. 2009. Production and processing of medicinal plant (3rd edition. Vol. 1). Razavi Ghods Astan Publication.

Ogunniyi, D.S. 2006. Castor oil: A vital industrial raw material. J Bioresource Technology. 97: 1086–1091.

Palevich, D. 1987. Recent advance in the cultivation of medicinal plants. J. Acta. Hort, 208: 29-34.

Villeneuve P, Lago R, Barouh N, Barea B, Piombo G, Dupré JY, Guillou AL and Pina M, 2005. Production of Conjugated Linoleic Acid Isomers by Dehydration and Isomerization of Castor Bean Oil. J The American Oil Chemists, 82 (4): 261-269.

Evaluation of Fatty Acids Content in Different Castor Genotypes in the Climate Condition of Isfahan

, Shahla Etebarian[*]Hossein Ali Asadi-Gharneh

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Abstract

Castor plant with the scientific name *Ricinus communis* L. is one of the oily plants of the Euphorbiaceae family. Castor oil is unique among vegetable oils and has high traditional and medicinal value. The purpose of this research is to investigate the percentage of fat and the content of fatty acids in 13 different genotypes of castor plant in the climatic conditions of Isfahan province. The results of this research showed that there is a big difference between the studied castor plant genotypes in terms of fat percentage. Comparison of the mean using the least significant difference (LSD) method at the 5% probability level also indicated that the Sari genotype with 42.8% had the highest percentage of fat and the Malair genotype with 26.3% had the lowest amount of fat. Assigned. The results of analysis of variance indicated that fatty acids palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, y-linoleic acid, a-linoleic acid, trans-linoleic acid at the 1% level between different genotypes. They are meaningful. However, for margaric acid and heptadecanoic acid, a slight genetic variation was seen between the investigated genotypes. Therefore, there is considerable genetic variation between castor plant genotypes in terms of fat percentage and most fatty acids. Also, by cultivating Sari and Shahrekord genotypes in Isfahan, its high fat yield can be used in the industry. In general, environmental factors along with genetic potential can affect the percentage of fat and the amount of fatty acid of castor plant.

Keywords: Castor, Oil percent, Saturated fatty acids, Unsaturated fat acids

[*] e-mail for the corresponding author: h.asadi@khuisf.ac.ir

بررسی میزان فنل و فلاونوئید و خاصیت آنتی‌اکسیدانی گونه های درمنه جمع آوری شده از شمال‌غرب ایران

سعید ملائی[۱]*، سید محمد مولای[۱]، مصطفی عبادی[۲]

[۱] گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز
[۲] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز

چکیده

در این کار پژوهشی، میزان فنل و فلاونوئید و خواص آنتی‌اکسیدانی چهار گونه *Artemisia* (*A. fragrans*، *A. vulgaris*، *A. annua* و *A. biennis*) جمع‌آوری شده از از شمال غرب ایران مورد بررسی قرار گرفت. محتوای کل فنلی و فلاونوئیدی نمونه‌ها با استفاده از روش رنگ‌سنجی Folin-Ciocalteu و کلرید آلومینیوم تعیین شدند. همچنین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها با استفاده از روش DPPH ارزیابی شدند. بررسی میزان فنل کل نمونه های مورد مطالعه نشان داد که *A. fragrans* و *A. vulgaris* دارای بیشترین میزان ترکیبات فنلی است و عصاره *A. fragrans* با مقدار ۳۲/۲ میلی گرم کوئرستین بر گرم عصاره دارای بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی است. ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی نشان داد که مقادیر IC_{50}عصاره‌های *A. fragrans* و *A. vulgaris* به ترتیب برابر با ۱۳/۷۷و ۱۹/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر هستند که این نتایج نشان می‌دهد که این عصاره،ها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به بقیه عصاره‌ها می‌باشند. بنابراین، از بین گونه های مورد مطالعه، *A. fragrans* دارای بیشترین میزان ترکیبات فنل و فلاونوئیدی آنتی اکسیدانی هستند.

واژگان کلیدی: *Artemisia*، آنتی اکسیدان، عصاره، فلاونوئید، فنل

* e-mail: s.mollaei@azaruniv.ac.ir

۱. مقدمه

*Artemisia*گیاهان مقاوم و بوته‌ای هستند که متعلق به تیره کاسنیان است و شامل بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی می‌باشد که عمدتاً در آسیا، اروپا و آمریکای شمالی یافت می‌شوند. گونه‌های این جنس دارای خواص دارویی بوده و در داروهای سنتی برای درمان انواع بیماری‌ها مفید می‌باشد (Bhakuni et al., 2001; Bilia et al., 2014).

*A. fragrans*گیاهی چندساله می‌باشد که در برخی کشورها همچون روسیه، ارمنستان، ایران و در دامنه‌های همسایگی آن‌ها کشت داده می‌شود. این گیاه دارای برگ‌های متناوب و ساده و یا پهنک کم و بیش بریده بوده وگل‌آذین به صورت کپه‌ای دارد. این گیاه دارای پنج عدد پرچم به هم پیوسته هست و میوه‌های آن عموماً به صورت فندقه‌ای است.

A. vulgaris گیاهی چندساله، معطر و کمی تلخ است که تا ۱٫۲ متر رشد می‌کند. این گیاه در مناطق معتدل آسیا، اروپا، شمال آفریقا و آمریکای شمالی رویش دارد. ب سر گل‌های این گیاه تخم‌مرغی شکل، به طول ۴-۳ میلی‌متر و به عرض ۲ میلی‌متر است. *A. vulgaris* دارای گل‌های مایل به زرد یا قهوه‌ای قرمز و تقریباً بدون کرک است و برگ‌ها به طول ۱۰-۵ سانتی‌متر، صاف و لبه‌های آن‌ها اغلب پیچیده به پشت هستند. سطح فوقانی معمولا به رنگ سبز تیره و بدون کرک و سطح زیرین کرک‌دار است. برگ‌های اصلی، برگچه کوتاه و ضخیم با یک برش انتهایی و یک یا دو جفت کاسبرگ کناری کوچک می‌باشند (Bhakuni et al., 2001; Bilia et al., 2014).

A. annua گیاهی یکساله، معطر و بومی مناطق شمالی استان‌های چاهار و سوئویان در چین است. این گیاه در مقیاس وسیع در چین، ویتنام، ترکیه، ایران، افغانستان و استرالیا کشت داده می‌شود. *A. annua* تا ۲٫۴ متر رشد می‌کند و ساقه آن استوانه‌ای و شاخه‌دار می‌باشد. برگ‌های آن متناوب بوده و به رنگ سبز تیره یا قهوه‌ای مایل به سبز است. این گیاه با خوشه‌های بزرگی از گل‌آذین‌های کپه‌ای با پوشش‌های غشایی سفیدمانند و توسط برگ‌های بریده شانه‌ای که پس از دوره شکوفایی از بین می‌روند مشخص می‌شود (Bhakuni et al., 2001; Bilia et al., 2014).

*A. biennis*گیاهی یکساله یا دوساله است که ساقه انفرادی سبز مایل به قرمز تا ارتفاع حداکثر ۲ متر به وجود می‌آورد. این گیاه عموماً بدون پرز و بی‌بو است. برگ‌های پرزدار تا ۱۳ سانتی‌متر طول دارند و به بخش‌های نیزه‌مانند و باریک با دندانه‌های بلند تقسیم می‌شوند. گل‌آذین، یک میله متراکم از خوشه‌های سنبله است که با برگ‌ها پراکنده شده‌اند.

در این مطالعه، میزان فنل و فلاونوئید و خواص آنتی‌اکسیدانی چهار گونه *Artemisia* (*Artemisia fragrans*، *Artemisia vulgaris*، *Artemisia annua* و *Artemisia biennis*) جمع‌آوری شده از شمال‌غرب ایران ارزیابی شدند.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. جمع آوری گونه‌های *Artemisia*

گونه های *Artemisia* از حوالی شهرخوی و تبریز جمع‌آوری شدند و بعد از شناسایی، در دمای اتاق خشک گردیدند و سپس به صورت دستی پودر شده و برای عصاره‌گیری آماده شدند.

۲.۲. عصاره گیری از گیاه

به یک گرم از گیاه ۱۰ میلی‌لیتر متانول اضافه گردید و توسط دستگاه التراسونیک عمل عصاره گیری انجام شد. بعد از گذشت نیم ساعت، عصاره توسط کاغذی صافی صاف گردید و سپس با دستگاه تبخیر کننده مدور خشک گردید و در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای انجان آزمایش‌های بعدی نگهداری شد.

۳.۲. بررسی میزان فنل کل

با استفاده از معرف فولین کولین سنجش مقدار ترکیبات کل فنلی صورت گرفت. به ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک عصاره‌های دارای غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۵۰۰ میکرولیتر محلول فولین‌سیکالتو اضافه شد و بعد از گذشت ۵ دقیقه ۵۰۰ میکرولیتر محلول سدیم‌کربنات اضافه گردید. بعد از قرار گرفتن نمونه‌ها در تاریکی به مدت ۲ ساعت، جذب آن‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Vis در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شدند.

٤.۲. بررسی میزان فلاونوئید کل

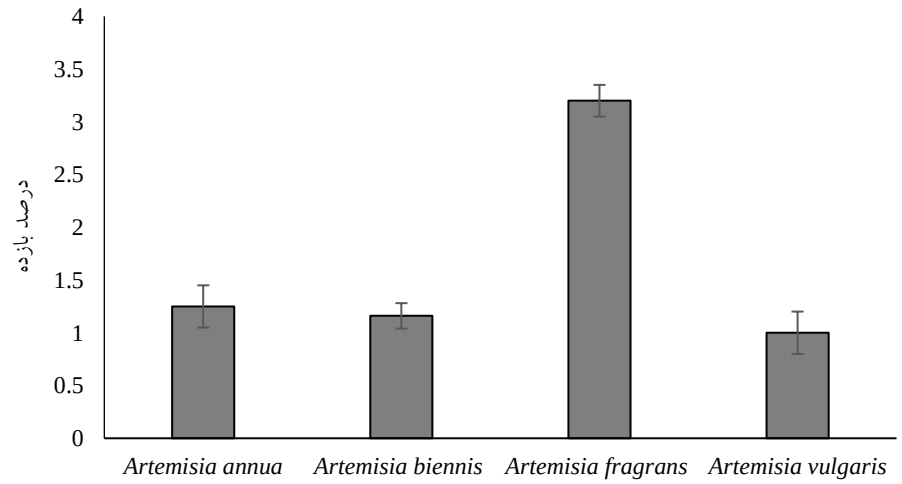
با استفاده از کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری مقدار ترکیبات کل فلاونوئیدی انجام گرفت. در این مطالعه، به میزان ۵۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم‌کلرید و ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات‌آمونیوم به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های دارای غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر محلول مادر اضافه شدند. بعد از ۱۰ دقیقه قرارگرفتن نمونه‌ها در تاریکی، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۲۶ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شدند.

۵.۲. بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی

۱۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH (۱ میلی مولار) به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شدند؛ سپس جذب آن‌ها در ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری گردید.

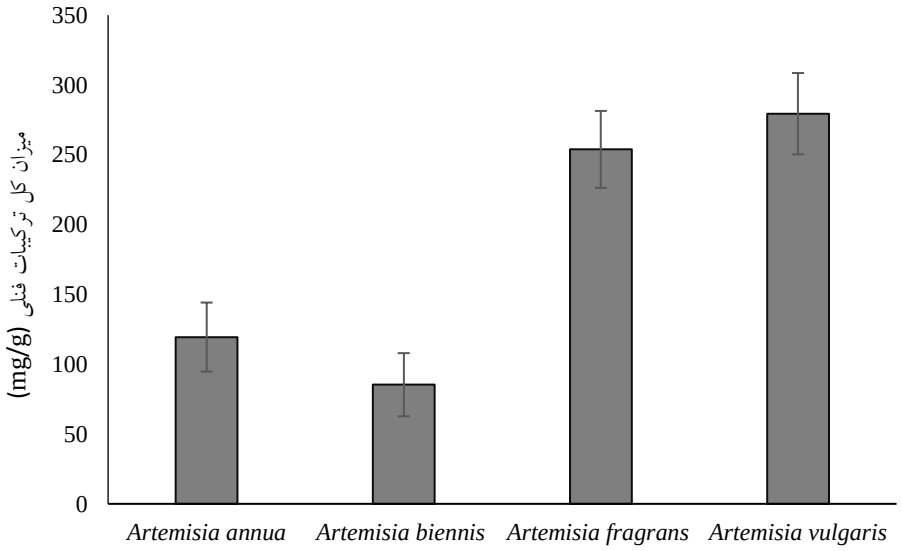
۳. نتایج

شکل ۱ بازده عصاره متانولی گونه های مختلف درمنه جمع آوری شده از نواحی مختلف شمال‌غرب ایران را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج بدست آمده، گونه *Artemisia fragrans* با مقدار ۳/۲ درصد دارای بیشترین بازده می باشد.

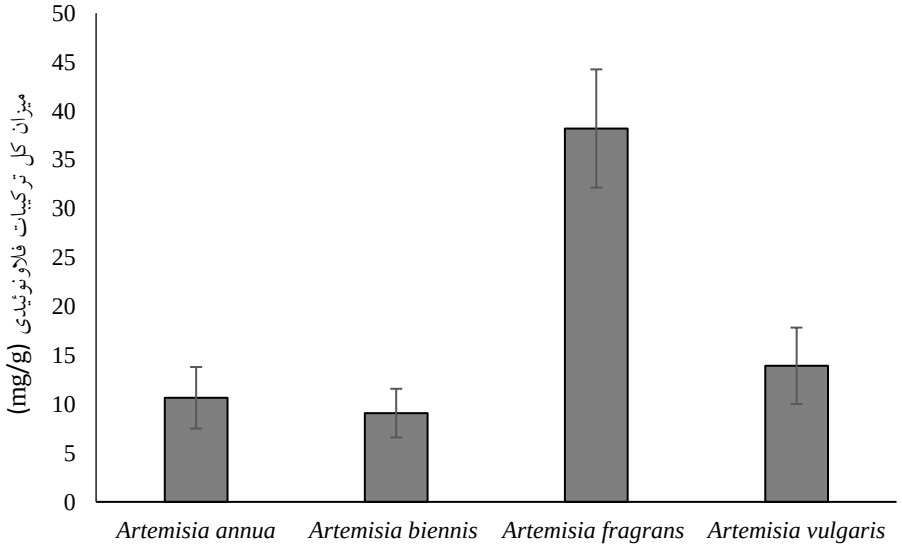


شکل ۱. بررسی بازده گونه های درمنه

بررسی میزان فنل کل نمونه های مورد مطالعه نشان داد که *Artemisia fragrans* و *Artemisia vulgaris* دارای بیشترین میزان ترکیبات فنلی است و کمترین میزان فنل نیز متعلق به دو گونه دیگر است (شکل ۲). همچنین، نتایج فلاونوئید کل نشان داد که عصاره *Artemisia fragrans* با مقدار ۳۲/۲ میلی گرم کوئرستین بر گرم عصاره دارای بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی است و تفاوت معنی‌داری در میزان فلانوئید بقیه گونه‌ها مشاهده نشد (شکل ۳).

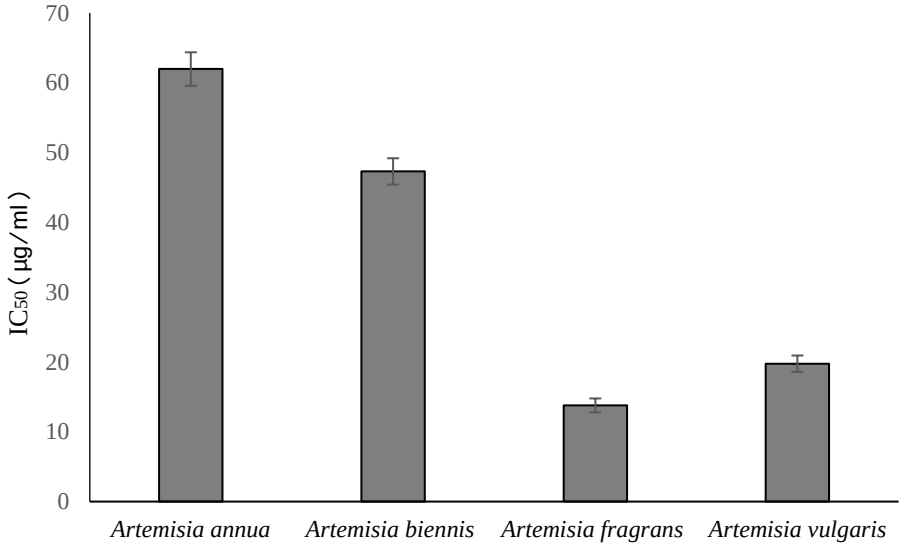


شکل ۲. بررسی میزان فنل کل گونه های درمنه. میزان فنل بر اساس میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره می باشد.



شکل ۳. بررسی میزان فلاونوئید کل گونه های درمنه. میزان فلاونوئید بر اساس میلی گرم کوئرستین بر گرم عصاره می باشد.

برای بدست آوردن خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها، ابتدا غلظت‌های مختلف از نمونه‌ها تهیه گردید و درصد مهارکنندگی آنها محاسبه شد. در ادامه نمودار آنها رسم گردید و بر اساس نمودار و رابطه بدست آمده از نمودار، مقدار دقیق IC_{50} محاسبه گردید (شکل ۴). بر اساس داده‌ها، مقادیر IC_{50}در عصاره‌های *Artemisia fragrans* و *Artemisia vulgaris* به ترتیب برابر با ۱۳/۷۷و ۱۹/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر هستند که این نتایج نشان می‌دهد که این عصاره،ها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به بقیه عصاره‌ها می‌باشند.



شکل ٤. بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی گونه های درمنه.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

فنل‌ها متابولیت‌های گیاهی هستند که چندین عملکرد مهم داشته، در انواع مختلف میوه‌ها، سبزیجات و گیاهان داروئی یافت می‌شوند و خواص زیستی فراوانی در هر دو شرایط *in vitro* و *in vivo* دارند (Wang et al., 2017; Kumar and Goel, 2019). در این تحقیق، محتوا فنل و فلاونوئید عصاره‌های متانولی چهار گونه اندام‌های *Artemisia* بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که بیشترین مقدار ترکیبات فنلی مربوط به *Artemisia fragrans* و *Artemisia vulgaris* بودند. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز نشان داد *Artemisia fragrans* و *Artemisia vulgaris* بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارد. بر اساس مطالعات انجام گرفته، محتوای بالای فنلی نقش مهمی در فعالیت‌های بیولوژیکی و دارویی آن‌ها دارد (Berhow et al., 2012). نتایج نشان داده‌اند که ارتباط مستقیمی بین محتوای فنل کل و خاصیت آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. در تحقیقی که Siddiqui و همکاران (۲۰۱۷) انجام دادند دریافتند که به دلیل بالا بودن محتوای فنل کل گیاه *Nepeta bracteata*، این گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای آن است. طبق نتایج حاصل از این پژوهش و مطالعات قبلی، شاید بتوان حدس زد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای *Artemisia fragrans* و *Artemisia vulgaris* ، مربوط به محتوای فنلی موجود در آن‌ها است و بالا بودن مقدار آن‌ها می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها را توجیه نماید.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه شهید مدنی آذربایجان بخاطر حمایت مالی کمال تشکر و قدردانی رو داریم.

منابع

Berhow, M.A., Affum, A.O., Gyan, B.A. 2012. Rosmarinic acid content in antidiabetic aqueous extract of *Ocimum canum* Sims. Journal of Medicinal Food. 15(7): 611-620.

Bhakuni, R.S. Jain, D.C. Sharma, R.P., Kumar, S. 2001. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. Current Science. 80: 35-48.

Bilia, A.R., Santomauro, F., Sacco, C., Bergonzi, M.C., Donato, R. 2014. Essential oil of *Artemisia annua* L.: An extraordinary component with numerous antimicrobial properties. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2014: 1-7.

Kumar, N., Goel, N. 2019. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. Biotechnology Reports. 24: e00370.

Siddiqui, N., Rauf, A., Latif, A., Mahmood, Z. 2017. Spectrophotometric determination of the total phenolic content, spectral and fluorescence study of the herbal Unani drug Gul-e-Zoofa (Nepeta bracteata Benth). Journal of Taibah University Medical Sciences. 12(4): 360-363.

Wang, M., Jiang, N., Wang, Y., Jiang, D., Feng, X. 2017. Characterization of phenolic compounds from early and late ripening sweet cherries and their antioxidant and antifungal activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 65(26): 5413-5420.

Total phenol and flavonoid content and antioxidant properties of Artemisia species collected from the north-west of Iran

, Seyyed Mohammad Mowlaye[1], Mostafa Ebadi[2*]Saeed Mollaei[1]

[1] Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

Abstract

In this study, total phenol and flavonoid contents as well as antioxidant activity of four *Artemisia* species including *Artemisia fragrans* ،*Artemisia vulgaris* ،*Artemisia annu, and Artemisia biennis* were investigated. The total phenolic and flavonoid content of the samples were determined using Folin–Ciocâlteu colorimetric method and aluminum chloride, respectively. Also, the antioxidant activity of the samples was evaluated using the DPPH method. Studying of the total phenol content of the studied samples showed that *Artemisia fragrans* and *Artemisia vulgaris* have the highest amount of phenolic contents, and *Artemisia fragrans* extract with 32.2 mg QE/g has the highest amount of flavonoid contents. Evaluation of antioxidant properties showed that the IC_{50} values of *Artemisia fragrans* and *Artemisia vulgaris* extracts were 13.77 and 19.75 µg/mL, respectively, and these results show that these extracts have better antioxidant properties than other extracts. Therefore, among the studied species, *Artemisia fragrans* has the highest amount of antioxidant phenolic and flavonoid compounds.

Keywords: *Artemisia*, Antioxidant, Extract, Flavonoid, Phenol

* e-mail: s.mollaei@azaruniv.ac.ir

بررسی نحوه انتقال دارویی ترکیبات گیاهی بر پایه Rhamnetin

هستی طاعتی[۱]، عزیزه اسدزاده[۲]، فاطمه شمس معطر[۳۱]

۱-گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان

۲-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، موسسه آموزش عالی نوردانش، میمه، اصفهان، ایران

۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان

چکیده

آلبومین سرم انسانی از مهم‌ترین پروتئین های پلاسما است که در انتقال داروها به بافت‌های هدف تاثیر بسزایی دارد. آلبومین از دسته پروتئین های کروی (گلوبولار) است. تمام پروتئین های خانواده آلبومین به راحتی در آب حل می‌شوند، این دسته از پروتئین ها تحت فرایند گلیکوزیلاسیون قرار نمی‌گیرند. Rhamentin از فلاونوئیدهای مهم گیاهی است که به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطان، ضد ویروس، ضد التهاب کاربردهای دارویی فراوانی دارد. در این مطالعه با توجه به اهمیت آلبومین سرم انسانی در انتقال داروها، نحوه برهم‌کنش این فلاونوئید گیاهی با آلبومین با استفاده از روش داکینگ مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است. براساس نتایج، این پلی‌فنول گیاهی توسط آمینواسیدهایSER579، GLN580 و HIS535 با ۱۷۱.۲۳- Docking Score: به آلبومین متصل می‌شود. بنابراین پروتئین آلبومین می‌تواند به عنوان حامل این ترکیب و ترکیبات مشتق شده از رامنتین عمل کند.

کلمات کلیدی: ترکیبات گیاهی، داکینگ مولکولی، Rhamnetin، آلبومین

[1] E-mail: fshams@ymail.com

۱.مقدمه

آلبومین ها پروتئین های کروی هستند که معمولاً در پلاسمای خون، سفیده تخم‌مرغ، شیر و گیاهان یافت می‌شوند. آلبومین سرم فراوان ترین پروتئین در پلاسمای خون در بین مهره‌داران است. این ماده در کبد به عنوان پیش‌آلبومین سنتز می‌شود و قبل از ترشح از سلول‌های کبدی در شبکه آندوپلاسمی و اجسام گلژی بالغ می‌شود.

آلبومین سرم انسانی (HSA) دارای غلظت پلاسمایی ۳۵mg/mL–۵۰، نیمه عمر تقریبی ۱۹ روز است و در هر دو فضای خارج عروقی و داخل عروقی وجود دارد(Mishra V and Heath R J,2021).

طیف گسترده ای از داروها وجود دارد که با اتصال به HSA به اندام ها و بافت های هدف خود تحویل داده می‌شوند. بنابراین، HSA نه تنها از داروهای متصل شده در برابر اکسیداسیون محافظت می کند و بر توزیع دارو در داخل بدن تأثیر می گذارد، بلکه خواص فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک داروها را نیز تغییر می‌دهد.

فعل و انفعالات بین HSA و لیگاندها به طور گسترده برای چندین دهه با استفاده از روش های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است. با این حال، از آنجایی که HSA یک ماکرومولکول انعطاف‌پذیر است که دارای مکان‌های اتصال پیچیده برای دارو است و مطالعه دقیق این سیستم دشوار بوده است(Yang F et al.,2014).

آلبومین سرم گاوی (BSA) و آلبومین سرم انسانی (HAS) مدل های پروتئینی هستند که در مطالعات داکینگ مولکولی مورد توجه ویژه قرار گرفته‌اند. ساختار آلبومین در سرم انسانی متشکل از ۵۸۵ آمینواسید و یک زنجیره پروتئین است که ۱۷ آمینواسید Tyr و یک Trp در باقیمانده ۲۱۴ هستند(Salehi M et al.,2021). بنابراین، در پیش‌بینی اینسیلیکو اتصال HSA به طور قابل توجه ای به کشف داروهای جدید کمک می کند(Vallianatou T et al, 2013).

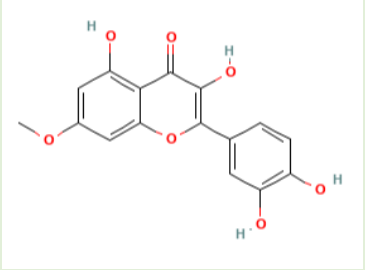
در این مطالعه با توجه به اهمیت آلبومین سرم انسانی در انتقال داروها، نحوه برهم‌کنش این فلاونوئید گیاهی با آلبومین با استفاده از روش داکینگ مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است تا بتوان تا حدودی به نحوه داروررسانی ترکیبات گیاهی بر پایه Rhamnetin پی‌برد.

۲.مواد و روش ها

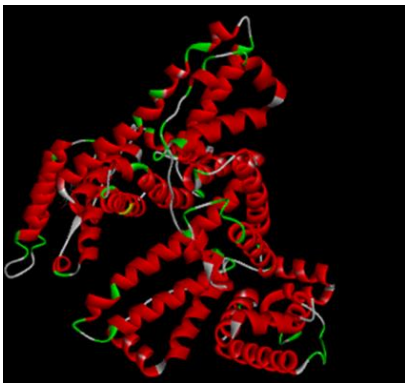
در این تحقیق از نرم‌افزارآنلاین برای انجام داکینگ مولکولی استفاده شد. بدین منظور ترکیب فلاونوئیدی مورد بررسی ازسایت https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov دانلود شد. در جدول۱ ویژگی‌ها و ساختار ترکیب مورد بررسی آورده شده است. ساختار کریستالی مناسب آلبومین نیز ازسایت http://www.rcsb.org/pdb با کد 1N5U بدست آمد.

لیگاند استخراج شده از سایت پاب کم با استفاده از نرم افزار Hyperchem و توسط الگوریتم Polak-Ribiere از نظرانرژی بهینه شد. در مرحله ی بعد لیگاند بهینه شده به عنوان ورودی نرم‌افزار اتوداک به عنوان مولکول کوچک استفاده شد.

پروتئین استخراج شده از سایت PDB با استفاده از نرم افزار دیسکاوری آماده شد و مولکول های آب و کوکریستال حذف گردید. در مرحله ی بعد پروتئین به عنوان رسپتور استفاده شد. در شکل۱ ساختار پروتئین آورده شده است.

ساختار شیمیایی	نام ترکیب	وزن مولکولی	فرمول مولکولی	کد شناسایی در کم‌پاب
	Rhamnetin	316.26	$C_{16}H_{12}O_7$	5281691

جدول۱. ویژگی ها و ساختار ترکیب مورد بررسی

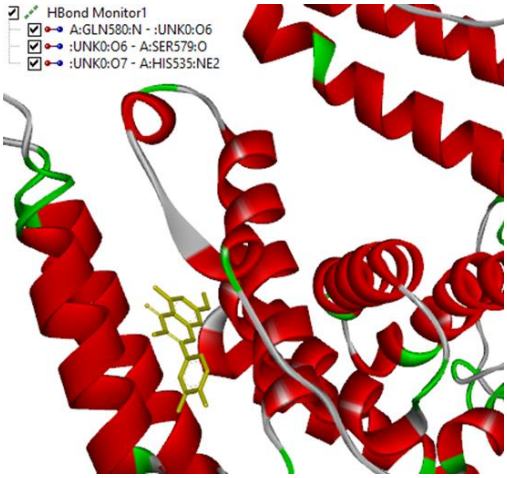


شکل۱. ساختار پروتئین آلبومین

۳.نتایج و بحث

داکینگ مولکولی یک روش In silico است که برای پیش‌بینی برهم‌کنش کمپلکس مولکول و ماکرومولکول استفاده می‌شود. داکینگ مولکولی به دلیل توانایی آن در پیش‌بینی اتصال و ترکیب لیگاندهای مولکولی کوچک به محل اتصال مناسب، یکی از متداول‌ترین روش‌ها در طراحی دارو است. تعیین سطح انرژی اتصال داروها در موثر بودن داروها بسیار مهم می‌باشد.

در این تحقیق به منظور دستیابی به نحوه ی اتصال ترکیبات مورد مطالعه با آلبومین از داکینگ مولکولی استفاده شد. پس از انجام عملیات داکینگ، انرژی اتصال لیگاند و انواع برهم‌کنش های لیگاند با پروتئین شامل برهم‌کنش های هیدروژنی با استفاده از نرم‌افزار دیسکاوری مورد بررسی قرار گرفت (شکل۲). در جدول ۲ سطح انرژی کونفورماسیون های برنر رامنتین از شماره یک تا ده آورده شده است که همانطور که مشخص است این ترکیب با سطح انرژی مناسبی به آلبومین متصل می‌شود.



شکل ۲. ترکیب رامنتین (زرد) در اتصال با پروتئین

Rank	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Docking Score	-171.23	-170.13	-167.33	-167.33	-167.32	-164.54	-157.73	-157.01	-156.90	-155.73
Confidence Score	0.6046	0.5993	0.5858	0.5858	0.5857	0.5722	0.5386	0.5350	0.5344	0.5286

جدول ۲. سطح انرژی کونفورماسیون های برتر رامنتین از شماره ۱ تا ۱۰

Vallianatou T و همکارانش در سال ۲۰۱۳ مروری کوتاه بر اصول اتصال HSA و ساختار کرسیستالی HSA و همچنین بحث و تحلیل مدل‌های اتصال HSA مبتنی بر ساختار و لیگاند اخیر ارائه کردند. همچنین این محققان مزایا و محدودیت‌های هر روش را برای ساخت مدل‌های محلی یا جهانی کارآمد و تشریح ویژگی‌های ساختاری حیاتی مرتبط با HSA ارائه کردند (Vallianatou T et al. 2013).

برهم‌کنش اتصال پروتئین-لیگاند می‌تواند دانش مفیدی در مورد ساختار آنها به عنوان عوامل درمانی بالقوه ارائه دهد در مطالعه‌ای، که توسط صالحی و همکارانش در سال ۲۰۲۱ صورت گرفت، برهم‌کنش TMP با HSA، با فرآیند اتصال مولکولی ارزیابی شد. در این مطالعه، انعطاف پذیری باقی‌مانده زنجیره جانبی انتخابی توسط نرم‌افزار AutoDock ارائه شده است. مزیت اصلی این گزینه ارائه یک رویکرد عملی برای تعامل لیگاند-پروتئین بدون افزایش قابل توجه در زمان پردازش کامپیوتری است. ابتدا، برای ارزیابی تغییرات ساختاری ناشی از اتصال لیگاند (TMP)، فرآیند شبیه سازی MD HSA آزاد (زیر دامنه II) و کمپلکس TMP-HSA انجام شد و نتایج با دقت مقایسه شدند. نتایج نشان داد که اتصال TMP به HSA منجر به تغییرات ساختاری در HAS و در نتیجه پایداری پیچیده می‌شود. تغییرات فوق از طریق چندین پارامتر از جمله RMSD، Rg و DSSP ارزیابی شد. اتصال مولکولی و رویکردهای شبیه سازی MD نشان می‌دهد که مولکول TMP به حوزه II پروتئین HSA متصل می‌شود (Salehi M,2020).

مطهری نیا و همکارانش در سال ۲۰۲۱، اتصال مولکولی آلبومین سرم انسانی با داروی ضد سرطان فلوئوروواوراسیل، را بررسی کردند. علاوه بر این، بارهای جزئی روی اتم های پروتئین آلبومین سرم و اتم های فلوئوروواوراسیلدر این مطالعه محاسبه شدند. بهترین پیکربندی نیز جستجو شد و در بهترین مدل، فلوئوروواوراسیل قادر است از طریق چهار پیوند هیدروژنی با رزیجوهای تیروزین، هیستیدین وآرژنین به پروتئین آلبومین HSA سرم انسان متصل شود. مطالعه داکینگ مدل‌های پیشنهادی نشان داد که فلوئوروواوراسیل دارای یک حلقه آلیفاتیک و بخش‌های آبگریز بوده، بنابراین توانایی بالایی در ایجاد فعل و انفعالات آبگریز با رزیجوهای اصلی در جایگاه فعال پروتئین آلبومین سرم دارد (Motaharinia,et al, 2021).

بر اساس نتایج داکینگ بهترین کونفورماسیون پلی‌فنول گیاهی رامنتین توسط اسید آمینه های SER579، GLN580 و HIS535 با سطح انرژی ۱۷۱.۲۳ kcal/mol به آلبومین متصل می‌شود. بنابراین پروتئین آلبومین می‌تواند به عنوان حامل این ترکیب و ترکیبات مشتق شده از رامنتین عمل کند.

منابع

Mishra, V., and Heath, R J., 2021. Structural and Biochemical Features of Human Serum Albumin Essential for Eukaryotic Cell Culture; 22(16).

Yang, Zhang. Y., and Liang, H. 2014. Interactive Association of Drugs Binding to Human Serum Albumin. Int J Mol Sci. (2014); 15(3): 3580–3595.

Salehi, 2020.A Comprehensive Study of Human Serum Albumin Interaction with Trimethoprim Using Molecular Docking and Molecular Dynamics Methods: An Appropriate Tool for Drug Delivery Systems.; 25(2), 99-104.

Vallianatou T and *et al*. 2013. In Silico prediction of human serum albumin binding for drug leads. Expert Opinion on Drug Discovery; 8(5), 583-595.

Motaharinia M, Sadeghpour M. and Shalbafan M. 2021.Study of Human Albumin Protein Interaction with Fluorouracil. Anticancer Drug Using Molecular Docking Method.journal of Ilam University of Medical Sciences; 30(2).33-40.

Investigating the method of drug delivery of herbal compounds based on Rhamnetin

Hasti Taati[1] Azizeh Asadzadeh[2], Fatemeh Shams Moattar [31]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Basic Siences, lahijan Branch Islamic Azad University, Lahijan, Guilan, Iran.
[2]Department of biology, faculty of science, Nour Danesh institute of higher education, Meymeh, Isfahan, Iran.
[3]Department of Microbiology, Faculty of Basic Siences, lahijan Branch Islamic Azad University, Lahijan, Guilan, Iran.

Abstract:

Human serum albumin (HSA), being the most abundant protein of blood plasma that influences the delivery of drugs to their targeting organs. Albumin is a solute globular protein found in blood plasma. Albumin is differ from other blood proteins and it is not glycosylated. Rhamnetin is phenolic flavonoid compound. Due to its antioxidant, anti-cancer, anti-viral, and anti-inflammatory properties, it has many medicinal uses. Considering the importance of human serum albumin in the transfer of drugs, the interaction of this plant flavonoid with albumin has been investigated using the molecular docking method. Based on the results, this plant polyphenol binds to albumin with Docking Score:-171.23 by residues HIS535, GLN580, SER579. Therefore, albumin can act as a carrier for this compound and compounds derived from Rhamnetin.

Keywords: Medicinal compounds, Rhmnetin inhibitor, molecular docking, albumin

بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی روغن و پروفایل اسیدهای چرب در جلبک قهوه‌ای سارگاسوم بوویانوم سواحل بوشهر

مریم اکبری [۱]، رویا رضوی زاده [۱]، حمید سبحانیان [۱]، غلامرضا بخشی خانیکی [۱] و غلامحسین محبی [۲*]

۱.گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

چکیده

برخی جلبک‌ها منابع غنی لیپیدها و اسیدهای چرب مفید مختلفی هستند. در سال‌های اخیر، مطالعات متعددی بر روی کمیت و کیفیت لیپیدها در جلبک‌ها انجام شده است. مطالعه حاضر به منظور بررسی میزان لیپید تام، پروفایل اسیدهای چرب و مقادیر امگا۳، ۶ و ۹ در جلبک *سارگاسوم بوویانوم* انجام گرفت. استخراج لیپید با استفاده از روش بلای و دایر انجام گردید. فاکتورهای عدد اسیدی (AV)، عدد پراکسید (PV) و ضریب شکست (RI) لیپیدها، به ترتیب بر اساس روش‌های استاندارد ایزو به شماره‌های ۶۶۰ (۲۰۰۹) ، ۳۹۶۰ (۲۰۱۷) و ۶۳۲۰ (۲۰۱۷) انجام شدند. متیل استر نمودن نمونه‌ها بر اساس روش استاندارد ۶۶-AOCS –Ce-۲، و آنالیز اسیدهای چرب، توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی، مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله (GC-FID)، انجام گردید. میزان چربی در این ماکروجلبک (۰/۰۴۷± ۲/۶۷) بود. آنالیز GC-FID، تعداد ۱۷ نوع اسید چرب را در این ماکروجلبک نشان داد. در بین اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع ، پالمیتیک اسید و سرونیک اسید، به ترتیب بیشترین میزان را نشان دادند. یافته‌های این مطا لعه را می‌توان برای دستیابی به مکانیسم‌ها و شرایط هدفمند که موجب افزایش اسیدهای چرب خاص می‌شود، گسترش داد.

واژگان کلیدی: اسیدچرب *سارگاسوم بوویانوم*، لیپید، ماکروجلبک

* Mohebbihsn@yahoo.com

۱. مقدمه

لیپیدها به عنوان یکی از ماکرومولکول‌های مهم ساختاری غشای سلولی و ذخیره انرژی بوده و برای عملکرد سلولی حیاتی هستند (Xu, 1994; Rismani and Shariati, 2017). برخی جلبک‌ها منابع غنی لیپیدها و اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFA)، نظیر آلفا- لینولنیک اسید (ALA)، ایکوزاپنتانوئیک (EPA)، دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA)، آراشیدونیک اسید (ω_6) و گاما-لینولنیک اسید (ω_6) هستند (Powell and Hill, 2009). امروزه، استفاده از EPA و DHA، به دلیل اثرات مفید آن‌ها در سلامت انسان از جمله کاهندگی کلسترول خون، پیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی، چاقی و افسردگی مورد توجه فراوانی قرار گرفته است (Buckley and Howe, 2010). با توجه به ناکافی بودن منبع اصلی امگا-۳، یعنی ماهی‌ها و لزوم معرفی منابع جدیدتر این اسیدهای چرب (Fontani *et al.*, 2005)، جلبک‌ها به عنوان منابع غنی امگا-۳ پیشنهاد گردیده‌اند (Rismani and Shariati, 2017).

جلبک‌های جنس *سارگاسوم*، اوکروفیتا (Ochrophyta)، به‌طور گسترده‌ای از عرض‌های جغرافیایی معتدل تا گرمسیری اقیانوس‌های جهان توزیع شده‌اند و نسبت به سایر جلبک‌ها، فعالانه مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Ye *et al.*, 2009). در دهه‌های گذشته، توجه محققان به برخی خصوصیات نوتریسیتیکال (Khalifeh et al., 2021) و فعالیت‌های مختلف بیولوژیکی چون خواص آنتی‌اکسیدانی (Hwang *et al.*, 2010)، ضد التهابی (Yang *et al.*, 2013)، تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی (Zhang *et al.*, 2012)، ضد قارچی (Kim *et al.*, 2007)، فیبرینولیتیک (Wu *et al.*, 2009)، ضد باکتریایی (Arunkumar *et al.*, 2005)، ضد ویروسی (Plouguerné *et al.*, 2013) و ضد سرطانی (Ayyad *et al.*, 2011) گونه‌های خاصی از این جلبک‌ها معطوف گشته‌اند. محتوای لیپیدی و اسیدهای چرب برخی گونه‌های *سارگاسوم* برای ارزیابی ویژگی‌های تغذیه‌ای و دارویی آنها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Nomura *et al.*, 2013; Paiva *et al.*, 2014).

جلبک‌ها جهت فتوسنتز و رشد خود به شرایط ساده‌ای چون نور، آب، دی‌اکسیدکربن و برخی مواد معدنی نیازمند هستند. آنها بسته به گونه، شرایط و وضعیت فیزیولوژیکی کشت، می‌توانند به سرعت مقادیر زیادی لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و رنگدانه هایی با ترکیبات و غلظت‌های مختلف را تولید نمایند (Sánchez et al., 2008). هدف این مطالعه بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی روغن و پروفایل اسیدهای چرب در جلبک قهوه‌ای *سارگاسوم بوویانوم* سواحل بوشهر بود.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. نمونه‌گیری و آماده‌سازی نمونه

نمونه جلبک سارگاسوم بوویانوم، از فاصله جزر و مدی سواحل روستای چاهک شهرستان گناوه، بدلیل تمرکز این زیست‌مندان دریایی در این منطقه در زمستان سال ۱۴۰۰ در نمونه دو کیلوگرمی جمع‌آوری گردید. پس از شناسایی جلبک توسط پژوهشگران پژوهشکده زیست فناوری خلیج فارس دانشگاه علوم پزشکی بوشهر و جداسازی اولیه عوامل اضافی از جلبک و شستشوی اولیه با آب دریا به آزمایشگاه منتقل گردید. جلبک جمع

آوری شده پس از شستشوی مجدد با آب دریا و جداسازی گل و لای و اپی‌فیت‌های متصل به آن، با آب تمیز شستشو داده شد. نمونه جلبک خشک، توسط آسیاب برقی بصورت پودر درآمد. و در نهایت جهت استخراج چربی تام و آنالیز اسیدهای چرب توسط دستگاه GC-FID مورد استفاده قرار گرفت (Khalifeh *et al*., 2021).

۲.۲. استخراج و تعیین درصد لیپید

استخراج لیپید هر یک از نمونه‌های جلبک *سارگاسوم بوویانوم*، با استفاده از روش بلای و دایر (Bligh and Dyer,1959,) انجام شد میزان چربی کل (درصد)، از نسبت وزن چربی به دست آمده به وزن نمونه اولیه بدست آمد.

۳.۲. تعیین عدد اسیدی (AV)، عدد پراکسید (PV) و ضریب شکست (*Refractive Index*)

جهت تعیین این فاکتور، از روش استاندارد ایزو شماره ۶۶۰ (۲۰۰۹) استفاده شد (ISO 660: 2009). برای تعیین عدد پراکسید از روش استاندارد ایزو به شماره ۳۹۶۰ استفاده گردید (ISO 3960, 2017). ضریب شکست نمونه با استفاده از یک رفراکتومتر کروز (KRUSS DR201-95)، بر اساس روش استاندارد ایزو به شماره ۶۳۲۰ (۲۰۱۷) تعیین گردید (ISO 6320, 2017).

۴.۲. آنالیز پروفایل اسیدهای چرب

۱.۴.۲. متیل استر نمودن نمونه

متیل استر نمودن نمونه بر اساس روش Akbari و همکاران (۲۰۱۲)، انجام گردید و در نهایت یک میکرولیتراز آن، برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی گازی با دتکتور یونش شعله‌ای (GC-FID) برداشته شد.

۲.۴.۲. تعیین پروفایل اسیدهای چرب

آنالیز اسیدهای چرب، توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی واریان مدل (CP-3800)، مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله انجام شد پس از تزریق نمونه به دستگاه GC-FID، سطح زیر پیک و زمان بازداری مربوط به هر اسید چرب با سطح زیر پیک (Peak Area) مربوط به اسید چرب استاندارد و زمان بازداری (RT) موجود در کروماتوگرام‌ها مقایسه گردیدند. بدین ترتیب، نوع و میزان اسیدهای چرب چرب امگا-۳، ۶ و ۹ موجود در نمونه مورد آزمون مشخص گردید (Akbari *et al*., 2012).

۵.۲. تجزیه و تحلیل آماری

آزمونها با سه بار تکرار انجام گردیدند. نتایج با استفاده از آزمون آنالیز آماری واریانس مورد بررسی قرار گرفتند. در تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS استفاده شد. جهت مدیریت دستگاه GC-FID از نرم افزار ورکستیشن نسخه ۶/۴۱، استفاده گردید.

۳. نتایج

۱.۳. شرایط منطقه نمونه‌برداری

شرایط منطقه نمونه‌برداری جلبک شامل مقادیر pH (۸/۳۲)، هدایت الکتریکی(۶۲۲۰۰ mS/cm)، شوری(۴۲٪)، اکسیژن محلول در آب (mg/l) و کدورت (۱۹۰۷NTU) بود.

۲.۳. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی روغن جلبک سارگاسوم بوویانوم

میزان درصد چربی تام و برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی جلبک *سارگاسوم بوویانوم*، با استخراج توسط حلال ان-هگزان در زمان‌های جمع‌آوری در جدول (۱) آورده شده است.

جدول۱- میزان درصد روغن جلبک سارگاسوم بوویانوم با استخراج توسط حلال ان-هگزان در زمان جمع‌آوری

(گرم بر لیتر)	چربی تام (٪)	عدد اسیدی (میلی-گرم بر گرم سود)	عدد پراکسید (میلی‌اکی والان اکسیژن بر کیلوگرم روغن)	ضریب شکست نور
نمونه جلبک	۲/۶۷±۰/۰۴۷	*۱/۴±۰/۰۴۵۸	۱/۶۱±۰/۰۲۰۸	*۱/۴۲۳±۰/۰۰۱۷

(*): سطح معناداری بر اساس آزمون دانکن ($p<0/05$).

۳.۳. پروفایل اسیدهای چرب جلبک در نمونه جلبک سارگاسوم بوویانوم

اسیدهای چرب شناسایی شده در جلبک *سارگاسوم بوویانوم* در نمونه جلبک سارگاسوم بوویانوم در جدول (۲) ذکرشده است. آنالیز GC-FID، تعداد ۱۷ نوع اسید چرب را در این گروه نشان داد (جدول۲).

جدول۲- پروفایل اسیدهای چرب در جلبک *سارگاسوم بوویانوم* در نمونه جلبک

ردیف	فرمول مولکولی	نام ترکیب	تعداد کربن	± میانگین انحراف معیار(٪)	RT
۱	$C_{12}H_{24}O_2$	دودکانوئیک اسید	$C_{۱۲:۰}$	±۱/۱ ۰/۰۳	۱۷/۲۷۷
۲	$C_{13}H_{26}O_2$	تری دکانوئیک اسید	$C_{۱۳:۰}$	۰/۰±۷/۰۲	۱۸/۹۷۷
۳	$C_{14}H_{28}O_2$	تترادکانوئیک اسید	$C_{۱۴:۰}$	۱۸/۰±۸/۰۱	۲۰/۵۸۰
۴	$C_{15}H_{30}O_2$	پنتادکانوئیک اسید	$C_{۱۵:۰}$	۱/۰±۳/۰۴	۲۲/۰۸۳
۵	$C_{16}H_{32}O_2$	هگزادکانوئیک اسید	$C_{۱۶:۰}$	±۴/۴۴/۰۵	۲۳/۵۲۷
۶	$C_{16}H_{30}O_2$	هگزا-۹-دکانوئیک اسید	$C_{۱۶:۱}$	±۹/۱/۰۴	۲۴/۳۵۷
۷	$C_{17}H_{34}O_2$	هپتادکانوئیک اسید	$C_{۱۷:۰}$	±۶/۲/۰۴	۲۴/۸۷۰
۸	$C_{18}H_{36}O_2$	اکتادکانوئیک اسید	$C_{۱۸:۰}$	۳/۰±۲/۰۲	۲۶/۱۸۳
۹	$C_{18}H_{34}O_2$	اکتادکامونوانوئیک‌اسید	$C_{۱۸:۱}$	۲/۰±۱/۰۳	۲۶/۸۵۰
۱۰	$C_{18}H_{32}O_2$	اکتا دکا۹و۱۲ دی-انوئیک‌اسید	$C_{۱۸:۲}$	±۲/۳/۰۴	۲۷/۹۲۷
۱۱	$C_{19}H_{38}O_2$	نونادکانوئیک اسید	$C_{۱۹:۰}$	±۵/۳/۰۴	۲۸/۶۲۳
۱۲	$C_{18}H_{30}O_2$	اکتادکاتری‌انوئیک اسید	$C_{۱۸:۳}$	۲/۰±۴/۰۲	۲۸/۷۱۷
۱۳	$C_{20}H_{30}O_2$	ایکوزانوئیک اسید	$C_{۲۰:۰}$	۱/۰±۸/۰۳	۲۹/۴۳۷

۱۴	$C_{20}H_{36}O_2$	ایکوزادی انوئیک اسید	$C_{۲۰:۲}$	±۳/۰۴	۳۰/۲۳۳
۱۵	$C_{20}H_{32}O_2$	ایکوزا تترااانوئیک اسید	$C_{۲۰:۴}$	۱/۰±۳/۰۲	۳۱/۹۴۰
۱۶	$C_{20}H_{30}O_2$	ایکوزاپنتاانوئیک اسید	$C_{۲۰:۵}$	۰±۲/۰۱	۳۲/۷۰۷
۱۷	$C_{22}H_{32}O_2$	سرونیک اسید	$C_{۲۲:۶}$	±۶/۶/۰۴	۳۳/۵۲۷

از این میان، تعداد ۹ اسید چرب متعلق به اسیدهای چرب اشباع (SFA)، شامل دودکانوئیک اسید ($C_{۱۲:۰}$)، تری دکانوئیک اسید ($C_{۱۳:۰}$)، تترادکانوئیک‌اسید ($C_{۱۴:۰}$)، پنتادکانوئیک اسید ($C_{۱۵:۰}$)، هگزادکانوئیک اسید ($C_{۱۶:۰}$)، هپتادکانوئیک اسید ($C_{۱۷:۰}$)، اکتادکانوئیک اسید ($C_{۱۸:۰}$)، نونادکانوئیک اسید ($C_{۱۹:۰}$) و ایکوزانوئیک اسید ($C_{۲۰:۰}$) و تعداد ۸ اسید چرب غیر اشباع (UFA)، شامل هگزا-۹-دکانوئیک اسید ($C_{۱۶:۱}$)، سیس-۹-اکتادکانوئیک اسید ($C_{۱۸:۱}$)، متعلق به $MUFA_s$ و (۹z و۱۲z) اکتا دکا ۹ و۱۲ دی‌انوئیک اسید ($C_{۱۸:۲}$)، اکتادکاتری‌انوئیک اسید ($C_{۱۸:۳}$)، ایکوزا دی انوئیک اسید ($C_{۲۰:۲}$)، ایکوزاتترااانوئیک اسید ($C_{۲۰:۴}$)، ایکوزاپنتاانوئیک اسید ($C_{۲۰:۵}$) و سرونیک اسید ($C_{۲۲:۶}$) متعلق به $PUFA_s$ بودند

در مجموع، در آنالیز پروفایل اسیدهای چرب با دستگاه GC-FID، در نمونه جلبک سارگاسوم بوویانوم مشخص گردید که در بین اسیدهای چرب اشباع، پالمیتیک اسید بیشترین میزان را دارا است و پس از آن، میریستیک اسید با میزان قابل ملاحظه‌ای مشاهده شد. در بین اسیدهای چرب غیر اشباع نیز سرونیک اسید دارای بیشترین میزان بود. در نمونه جلبک سارگاسوم بوویانوم در بین اسیدهای چرب غیر اشباع، ایکوزا دی انوئیک اسید پس از سرونیک اسید بیشترین میزان را دارا بود.

٤. بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر به منظور بررسی میزان لیپید تام، پروفایل اسیدهای چرب و میزان امگاهای ۳، ۶ و ۹ در جلبک سارگاسوم بویانوم انجام شد. بر اساس مطالعه Chisti، بسیاری از جلبک‌ها می‌توانند ۵۰- ۱۵ درصد وزن خشک خود را چربی تجمع نمایند (Chisti ,۲۰۰۷). گرچه محتوای لیپیدی جلبک‌های قهوه‌ای با منابع معمول لیپیدی قابل مقایسه نیست اما از نظر کیفی، دارای ترکیبات زیست فعال بسیار ارزشمندی می‌باشند (Miyashita, 2013). نتایج مطالعه خیری Khairy و همکاران (۲۰۱۳)، بر روی میزان چربی جلبک *سارگاسوم بوویانوم*، سواحل مصر نشان داد که چربی کل معادل ۳ درصد می¬باشد (Khairy *et al.*, 2013). در مطالعه Herbreteau و همکاران (۱۹۹۷)، کل محتوای چربی تام این جلبک‌ها کمتر از ۴ درصد گزارش گردید (Herbreteau et al., 1997). میزان چربی در جلبک سارگاسوم بوویانوم در این مطالعه ۲٪ بود. افزایش سریع تجمع لیپید در جلبک‌ها بویژه سویه‌های ریزجلبکی هنگام شرایط استرس یا کمبود مواد مغذی چون نیتروژن، فسفات، کربن، سیلیکون و کامپوزیت‌های آهن اتفاق افتاده است. علاوه بر این، محرک‌های شیمیایی مختلفی چون pH، شدت نور و دمای محیط رشد نیز عوامل موثر بوده‌اند (Pandit et al., 2017). آنالیز چربی تام جلبک *سارگاسوم بوویانوم*، ۱۷ نوع اسید چرب ($C_{۱۲}$-$C_{۲۲}$) را در

این جلبک نشان داد. از بین تمام اسیدهای چرب مورد شناسایی در هر سه گروه، بیشترین درصد مربوط به اسید چرب اشباع پالمتیک اسید و در بین اسیدهای چرب غیر اشباع، سرونیک اسید بود. در مطالعه حافظیه و همکاران (۲۰۱۴)، بر روی مقادیر اسیدهای چرب جلبک‌های دریایی *سارگاسوم ایلیسیفولیوم* دریای عمان، نیز بیشترین اسید چرب مربوط به پالمتیک اسید با میزان ۶۷/۸۳ درصد از کل اسیدهای چرب بود(حافظیه و همکارن.، ۲۰۱۴). در مطالعه khotimchenko نیز مطابق با یافته‌های مطالعه اخیر، پالمیتیک اسید، غالب‌ترین اسید چرب موجود در هفت گونه سارگاسوم مورد آنالیز بود (Khotimchenko, 1991). در یک مطالعه مشابه، Chen و همکاران (۲۰۱۶)، اسیدهای چرب چهارگونه جلبک سارگاسوم را توسط آنالیز GC-MS مورد بررسی قرار دادند. آنالیز گونه سارگاسوم فوزیفورم، تعداد ۲۰نوع اسید چرب را نشان داد. بیشترین میزان اسید چرب در این مطالعه، متعلق به پالمیتیک اسید با مقدار ۳۱/۴۴ درصد بود که با فراوانی پالمیتیک اسید در مطالعه حاضر با میزان ۴۴/۴ درصد مطابقت داشت (Chen et al., 2016)یافته های این مطالعه را می‌توان برای دستیابی به مکانیسم‌ها و شرایط هدفمند که موجب افزایش لیپیدها و اسیدهای چرب خاص مانند امگا-۳ می‌شود، گسترش داد.

منابع

محمود حافظیه، یزدان مرادی محمد پورکاظمی، شهرام دادگر، منصور شریفیا(۱۳۹۵). ترکیبا ت تقریبی شیمیایی گیاه دریایی سارگاسوم(*Sargassum ilicifolium*) مناطق مختلف ساحلی استان سیستان و بلوچستان. سال بیست و پنجم/شماره/٤ زمستان ۵۹.

Akbari, M., Razavizadeh, R., Mohebbi, G. H. and Barmak, A. 2012. Oil characteristics and fatty acid profile of seedsfrom three varieties of date palm (Phoenix dactylifera) cultivars in Bushehr-Iran. African Journal of Biotechnology.11: 12088-93.

Arunkumar, K., Selvapalam, N. and Rengasamy, R. (2005) The antibacterial compound sulphoglycerolipid 1-0palmitoyl-3-0-(6'-sulpho-α-quinovopyranosyl)-glycerol from *Sargassum wightii* Greville (Phaeophyceae). Botanica Marina 48: 441-445.

Ayyad, S. E., Ezmirly, S. T., Basaif, S. A., Alarif, W. M., Badria, A. F. and Badria, F. A. 2011. Antioxidant, cytotoxic,antitumor, and protective DNA damage metabolites from the Red Sea Brown alga Sargassum sp. PharmacognosyResearch 3: 160-165.

Buckley, J. D. and Howe , P. R. C. 2010 .Long -chain omega -3 polyunsaturated fatty acids may be beneficial for reducing obesity . A review. Nutrients 2: 1212 -1230.

Chen, Z,Xu, Y.,Liu,T.,Zhang, L., Liu, H., & Guan, H. 2016. Comparative studies on the characteristic fatty acid profiles of four different Chinese medicinal Sargassum seaweeds by GC-MS and chemometrics . Marine drug, 14(4),68.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances 25: 294-306.

Fontani, G., Corradeschi, F., Felici, A., Alfatti, F., Migliorini, S. and Lodi, L. 2005. Cognitive and physiological effects of omega -3 polyunsaturated fatty acid supplementation in healthy subjects. European Journal of Clinical Investigation 35: 691 -699.

Herbreteau, F., Coiffard, L. J. M. and Derrien, A. 1997. The fatty acid composition of five species of macroalgae.Botanical Marina 40: 25-8.

Hwang, P. A., Wu, C. H., Gau, S. Y., Chien, S. Y . and Hwang, D. F. 2010. Antioxidant and immune -stimulating activities of hot -water extract from seaweed Sargassum hemiphyllum. Journal of Marine Science and Technology 18: 41 -46.

ISO 3960: 2017. Animal and vegetable fats and oils - Determination of peroxide value - Iodometric (visual) endpoint determination.

ISO 6320: 2017. Animal and vegetable fats and oils - Determination of refractive index.

ISO 660: 2009. Animal and vegetable fats and oils- Determination of acid value and acidity- Test method.

Khalifeh, T., Vazirizadeh, A., Mohebbi, G. H., Barmak, A. R. and Darabi , A. H. 2021. Determination of some nutraceutical compounds, amino acids and fatty acids present in the extracts of Sargasum boveanum algae obtained from the Coastal Waters of Central Bushehr, Iran. Iran South Medical Journal 24: 134 -159 .

Khotimchenko, S.V. 1991. Fatty Acids Composition Of Seven Sargassum Species. Phytochemistry; 30(8): 2638-41.

Kim, Y. H., Kim, E. H., Lee, C., Kim, M. H . and Rho , J. R. 2007. Two new monogalactosyl diacylglycerols from brown alga Sargassum thunbergii. Lipids 42: 395 -399.

Miyashita, K., Mikami, N. and Hosokawa, M. 2013. Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids:A review. Journal of Functional Foods 5: 1507-17.

Pandit, P. R., Fulekar, M. H. and Karuna, M. S. L. 2017. Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fattyacid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus bliquus* and *Chlorella vulgaris*. Environmental Scienceand Pollution 24: 13437-13451.

Plouguerne, E. D. E., Souza, L. M., Sassaki, G. L., Cavalcanti, J. F., Romanos, M. T. V., DA- Gama, B. A. P., Pereira R. C. and Barreto-Bergter, E. 2013. Antiviral Sulfoquinovosyldiacylglycerols (SQDGs) from the Brazilian Brown Seaweed Sargassum vulgare. Marine Drugs 11: 4628-4640.

Powell, E. E. and Hill, G. A. 2009. Economic assessment of an integrated bioethanol biodiesel microbial fuel cell facility utilizing yeast and photosynthetic algae. Chemical Engineering Research and Design 87: 1340 -1348.

Rismani, S. and Shariati, M. 2017. Changes of the total lipid and omega -3 fatty acid contents in two microalgae Dunaliella salina and Chlorella vulgaris under salt stress. Brazilian Archives of Biological and Applied Sciences 60.

Sanchez, J. F., Fernandez, J. M., Acien, F. G., Rueda, A., Perez-Parra, J. and Molina, E. 2008. Influence of cultureconditions on the productivity and lutein content of the new strain Scenedesmus almeriensis. Process Biochemistry.٤٠٥-٣٩٨ :٤٣ .

Xu, X. Q. 1994. Studies on microalgae from Antarctic hypersaline lakes. Monash University, Australia.

Ye, H., Zhou, C., Sun, Y., Zhang, X., Liu, J., Hu, Q. and Zeng, X. 2009. Antioxidant activities in vitro of ethanol extract from brown seaweed Sargassum pallidum. European Food Research and Technology 230: 101 -109.

Zhang, R. L., Luo, T. N. and Zhou, S. K. 2012. Evaluation of antioxidant and immunity-enhancing activities of *Sargassum pallidum* aqueous extract in Gastric Cancer Rats. Molecules 17: 8419-8429.

Investigating the physicochemical characteristics of oil and fatty acid profile in brown algae *Sargassum bouvianum* of Bushehr coasts

Maryam Akbari[1], Roya Razavizadeh[1], Hamid Sobhanian[1], Ghlomreza BakhshiKhaniki[1], Gholamhossein Mohebbi[2]*

[1] Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
[2] The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

Abstract

Some algae are rich sources of various useful lipids and fatty acids. In recent years, several studies have been conducted on the quantity and quality of lipids in algae. The present study was conducted to investigate the amount of total lipid, fatty acid profile and omega 3, 6 and 9 levels in *Sargassum bovianum* algae. Lipid extraction was performed using the Blay and Dyer method. The factors of acid number (AV), peroxide number (PV) and refractive index (RI) of lipids were performed according to ISO standard methods numbered 660 (2009), 3960 (2017) and 6320 (2017), respectively. Methyl esterification of the samples was done according to the standard method of 66-2-AOCS-Ce, and analysis of fatty acids was done by a gas chromatography device, equipped with a flame ionization detector (GC-FID). Lipid extraction was performed using the Blay and Dyer method. The factors of acid number (AV), peroxide number (PV) and refractive index (RI) of lipids were performed according to ISO standard methods numbered 660 (2009), 3960 (2017) and 6320 (2017), respectively. Methyl esterification of the samples was done according to the standard method of 66-2-AOCS-Ce, and analysis of fatty acids was done by a gas chromatography device, equipped with a flame ionization detector (GC-FID). The amount of fat in this macroalgae was 2.67±0.047. GC-FID analysis showed the number of 17 types of fatty acids in this macroalgae. Among saturated and unsaturated fatty acids, palmitic acid and seronic acid showed the highest amount, respectively. The findings of this study can be expanded to achieve targeted mechanisms and conditions that increase specific fatty acids.

Key words: fatty acid, Sargassum bovianum, lipid, macroalgae

بیوسنتز ترکیبات فنلی در گیاهان

زهرا سوری*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه رازی، کرمانشاه

چکیده

تنوع ترکیبات ثانویه در قلمرو گیاهی بسیار زیاد است. حدود ۲۰۰۰۰۰ ترکیب شناخته شده است که به آمین ها، اسیدهای آمینه غیر پروتئینی، پپتیدها، آلکالوئیدها، گلوکوزینولات ها، گلوکوزیدهای سیانوژنیک، اسیدهای آلی، ترپنوئیدها، کینون ها، پلی استیلن ها و فنولیک ها گروه بندی می شوند. با توجه به اهمیت ترکیبات ثانویه از جمله فنل ها، این بررسی به نحوه بیو سنتز ترکیبات فنلی پرداخته است. بیوسنتز ترکیبات فنلی ها از طریق دو مسیر مختلف بیولوژیکی صورت می گیرد. عمده فنلی ها از طریق Shikimate acid pathway تولید می گردند، در این مسیر اسید آمینه فنیل آلانین (Phe) ترکیب حدواسط اغلب فنل های گیاهی است که از Phenyl- propane مشتق می شود.

کلمات کلیدی: ترکیبات ثانویه، فنل ها، فنیل آلانین و Shikimate acid pathway

۱. مقدمه

تنوع ترکیبات ثانویه در قلمرو گیاهی بسیار زیاد است. حدود ۲۰۰۰۰۰ ترکیب شناخته شده است که به آمین ها، اسیدهای آمینه غیر پروتئینی، پپتیدها، آلکالوئیدها، گلوکوزینولات ها، گلوکوزیدهای سیانوژنیک، اسیدهای آلی، ترپنوئیدها، کینون ها، پلی استیلن ها و فنولیک ها گروه بندی می شوند. گروه ترکیبات فنلی شامل پلی فنل ها، الیگوفنول ها و مونوفنول ها یا ترکیبات فنلی ساده مانند اسیدهای بنزوئیک و سینامیک و مشتقات هیدروکسیله آنها می باشد (Marchiosi et al., 2020).

فنل یک ترکیب شیمیایی است که مشخصه اصلی آن داشتن حداقل یک گروه OH است که بر روی یک حلقه آروماتیک قرار دارد.بیشتر فنلی ها در طی واکنش های Condensation ساخته می شوند. بیش از هزار ترکیب فنلی متنوع در گیاهان تا

* z_souri89@yahoo.com

کنون معرفی شده است (Marchiosi et al., 2020). با در نظر گرفتن تنوع ساختار شیمیایی فنلی ها ما شاهد نقش های متفاوت آنها در گیاهان هستیم. از جمله نقش های فنلی ها می توان به دفاع در برابر عوامل بیماری زا و گیاهخواران، حفاظت مکانیکی، جلب گرده افشان ها،کاهش رشد گیاهان رقیب (Alleopathy) وجذب اشعه uv اشاره کرد (Parvin et al., 2022).

۲. بیو سنتز ترکیبات فنلی:

تولید ترکیبات فنلی ها از طریق دو مسیر مختلف بیولوژیکی صورت می گیرد (Marchiosi et al., 2020):

- Shikimate acid pathway: عمده فنلی ها از طریق این مسیر تولید می گردند، در این مسیر اسید آمینه فنیل آلانین (Phe) ترکیب حدواسط اغلب فنل های گیاهی است که از Phenyl- propane مشتق می شود.

برخی فنلی ها توسط حدواسط های مسیر Shikimate acid تشکیل می شوند که می توان به تشکیل Hydroxy benzoat Gallat از Dehydro shikimate و تشکیل برخی Qoiunones از Chorismate اشاره کرد.

- Acetate /malonate pathway (Polyketid pathway): این مسیر منجر به تولید برخی از Qoiunones در گیاه می شود ،همچنین Phenyl- propanoids و گروه بزرگی از Flavonoids از این مسیر تولید می شوند.

مسیرهای Shikimate acid و Polyketid مسیرهای مهمی برای آغاز بیوسنتز در گیاهان هستند.

بیوسنتز اکثر فنلی ها از مسیر Shikimate acid صورت می گیرد .در حالی که مسیر Malonic acid نیز منبع مهمی از فرآورده های فنلی در قارچ ها و باکتری ها را تامین می کند ولی در گیاهان عالی اهمیت چندانی ندارد.

۲-۱ مسیر Shikimate acid

مسیر Shikimate acid نتیجه بیوسنتز Chorismate است که طی آن اسیدهای آمینه آروماتیک Phe، تایروزین (Tyr) و تریپتوفان (Trp) تولید می شوند. این اسیدهای آمینه پیش سازهای مهمی برای تولید انواع ترکیبات ثانویه شامل Phenyl propanoids هستند (Herrmann, 1995).

این مسیر با دو واکنش مهم Condensation شروع می شود:

۱- واکنش بین Erythrose 4-phosphate و فسفو انول پیروات (PEP)، توسط آنزیم DAHP synthase و تولید 2-dehydro-3-deoxy arabino heptulosonate-7-phosphate(DAHP)

۲- تبدیل DAHP به 3-dehydro quinate توسط آنزیم 3-dehydro quinate syntase سپس ترکیب اخیر توسط یک آنزیم رودکتاز وابسته به NADPH به صورت فرم سیس دهیدراته درآمده واین فرم توسط آنزیم 3-dehydro quinate dehydratase به 3-dehydro shikimate تبدیل می شود. و بعد این ترکیب توسط Shikimate dehydrogenase وابسته

به NADPH به Shikimate تبدیل می شود. در ادامه Shikimate به وسیله آنزیم Shikimate Kinase به Shikimate 3-phosphate تبدیل می گردد. پس از آن Shikimate 3-phosphate توسط EPSP synthase تبدیل به 5-enol pyruvyl shikimate 3-phosphate (EPSP) می شود (Herrmann, 1995;Marchiosi et al., 2020).

Chorismate نقطه انشعاب بیوسنتز اسیدهای آمینه آروماتیک است:

۱- واکنش Anthranilate synthase که منجر به انشعاب Trp synthase می شود.

۲- واکنش Chorismate mutase که منجر به انشعاب Phe و Tyr synthase می شود.

در مرحله بعد Chorismate توسط Chorismate mutase به Prephenate تبدیل می شود. سپس Prephenate در حضور Glutamate به وسیله Prephenate amino transferase وابسته به PLP تبدیل می شود به Arogenate. در ادامه دو انشعاب از Arogenate کنترل می شوند به وسیله آنزیم های Arogenate dehydrogenase و Arogenate dehydratase که هر کدام به ترتیب کاتالیز می کنند تشکیل Tyr و Phe. تداخل بین Phe و متابولیسم Phenyl propanoids توسط آنزیم Phenyl alanin amonia lyase (PAL) کنترل می گردد (Herrmann, 1995;Marchiosi et al., 2020).

در مسیر عمومی Phenyl propanoids برخی از ترکیبات ثانویه گیاهی که اغلب خاصیت دارویی دارند شامل Flavonoids، Monolignols، Hydroxy cinnamic acids، Sinapoyl esters، Caffeic acids و Coumarins تولید می شوند (Marchiosi et al., 2020).

References

Parvin, K., Nahar, K., Mohsin, S.M., Al Mahmud, J., Fujita, M., Hasanuzzaman, M. (2022). Plant Phenolic Compounds for Abiotic Stress Tolerance. In: Hasanuzzaman, M., Ahammed, G.J., Nahar, K. (eds) Managing Plant Production Under Changing Environment. Springer, Singapore. doi.org/10.1007/978-981-16-5059-8_8.

Marchiosi, R., dos Santos, W.D., Constantin, R.P. et al.(2020) Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. Phytochem Rev 19: 865–906. doi.org/10.1007/s11101-020-09689-2.

Herrmann KM (1995) The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. Plant Cell 7:907–919.

Biosynthesis of phenolic compounds in plants

[*]Zahra Souri

Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah

Abstract

The diversity of secondary compounds in the plant kingdom is huge. About 200,000 compounds are known, which are grouped into amines, non-protein amino acids, peptides, alkaloids, glucosinolates, cyanogenic glucosides, organic acids, terpenoids, quinones, polyacetylenes, and phenolics. The group of phenolic compounds consists of polyphenols, oligophenols and monophenols or simple phenolic compounds. Considering the importance of secondary compounds including phenols, this minireview has focused on the metabolism and biosynthesis of phenolic compounds. The biosynthesis of phenolic compounds takes place through two different biological pathways. Most phenols are produced through the Shikimate acid pathway, in this pathway phenylalanine (Phe) is the intermediate compound of most plant phenols derived from Phenyl-propane.

Keywords: Secondary compounds, phenols, phenylalanine

* z_souri89@yahoo.com

پاسخ ژنوتیپ‌های گشنیز (*Coriandrum sativum* L) به منابع کود نیتروژن در شرایط رقابت با علف هرز

فاطمه سادات علائی*[۱]، سعیده ملکی فراهانی[۱]، حسن حبیبی[۱]، محمد حسین فتوکیان[۱]، مصطفی خدادادی[۲]

[۱] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران

[۲] موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

چکیده

به منظور بررسی تأثیر منبع کود نیتروژن بر خصوصیات روغن ژنوتیپ‌های گشنیز در شرایط رقابت با علف هرز، آزمایشی در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد در سال ۱۳۹۹ انجام شد. آزمایش در سه تکرار به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. فاکتور اول، ژنوتیپ (نهاوندی، پیشگام، اتیوپی)، فاکتور دوم کود نیتروژن (اوره، اوره با پوشش گوگردی، شاهد) و فاکتور سوم وجین (با و بدون وجین) بود. نتایج نشان داد، محتوای روغن ژنوتیپ ها در رقابت با علف هرز کاهش یافت. در کرت‌های وجین شده، نیتروژن موجب افزایش درصد روغن و ژنوتیپ نهاوندی، تیمار شده با کود اوره در شرایط بدون علف هرز بالاترین درصد روغن را نشان داد. در ارتباط با ترکیبات اسید چرب، اسید پتروسلنیک، اسید پالمیتیک و اسید لینولئیک به عنوان اسیدهای چرب اصلی شناسایی شدند. در تیمارهای کودی، کود اوره بالاترین درصد اسید پالمتیک را نشان داد. همچنین نتایج نشان داد ژنوتیپ اتیوپی به طور معنی‌داری بالاترین درصد اسید لینولئیک را دارا بود.

واژگان کلیدی: اسید چرب، اوره، اوره با پوشش گوگردی، علف هرز،گشنیز

* e-mail: fa.s.alaei@gmail.com

۱. مقدمه

گشنیز با نام علمی *Coriandrum sativum L* متعلق به خانواده Apiaceae گیاه علفی یک‌ساله است (Abdelkader et al., 2018). اسیدهای چرب (گلیسریدهای اسید اولئیک، اسید پالمتیک، اسید پتروسلینیک و اسید لینولئیک) حدود ۱۳ تا ۲۰ درصد از ترکیبات تشکیل‌دهنده بذر گشنیز می‌باشد که باعث شده در صنایع مورد توجه باشد (سلیمانی فر و همکاران، ۱۳۹۶). از آنجائی که عدم وجود بقایای شیمیایی در مراحل تولید، فراوری و عرضه گیاهان دارویی بسیار حائز اهمیت می‌باشد، لذا مدیریت علف‌های هرز و عناصر غذایی از جمله راهکارهای کارآمد و همسو با سیاست‌های کشاورزی پایدار می‌باشد (معصومی و همکاران، ۱۳۹۲). با توجه به تمایل روزافزون جهت افزایش کمی گیاه گشنیز و ارتقا کیفی آن و همچنین شناسایی بهترین ژنوتیپ مورد مطالعه، پژوهشی در این زمینه با هدف بررسی تأثیر منابع مختلف کود نیتروژن و رقابت علف‌های هرز موجود در منطقه، روی خصوصیات روغن ژنوتیپ های مختلف گشنیز در شرایط مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد- تهران اجرا شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. منطقه مورد مطالعه

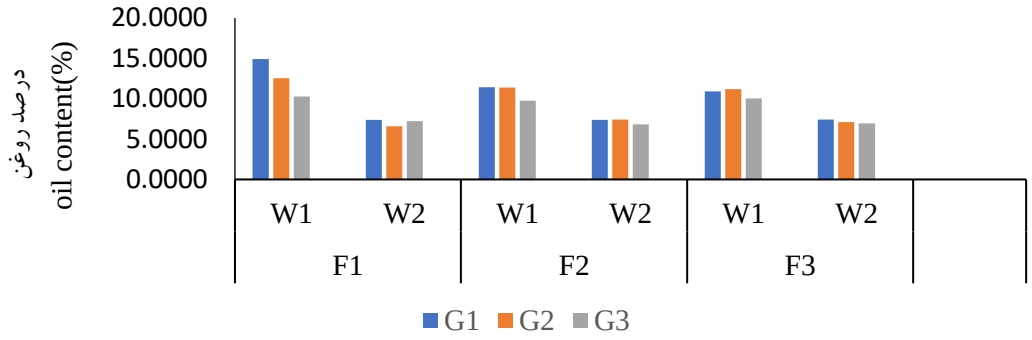
این آزمایش در مزرعه آموزشی و پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد - تهران با عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۳۳ دقیقه و طول جغرافیایی ۵۱ دقیقه و ۲۰ درجه شرقی و ارتفاع ۱۰۵۰ متر از سطح دریا و بارش سالیانه ۲۳۸/۹ میلی‌متر در آبان ماه ۱۳۹۹ اجرا شد.

۲.۲. روش تحقیق

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. فاکتور اول ژنوتیپ: (اکوتیپ نهاوندی، رقم پیشگام و اکوتیپ اتیوپی)، فاکتور دوم منابع مختلف کود نیتروژن (کود اوره، کود اوره با پوشش گوگردی و عدم استفاده از کود نیتروژن به عنوان شاهد) و فاکتور سوم، رقابت گیاه زراعی با علف هرز (در دو سطح وجین و عدم وجین) اجرا شد. کاشت بذور به صورت دستی و در عمق ۳ سانتی‌متری خاک و مقدار کود اوره (۴۶ درصد نیتروژن خالص) و اوره با پوشش گوگردی (۳۱ درصد نیتروژن خالص) مورد استفاده در این آزمایش بر اساس آنالیز نیتروژن موجود در خاک و میزان نیتروژن توصیه شده در گیاه گشنیز به میزان ۷۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار انجام شد. به منظور ارزیابی درصد روغن و پروفیل اسیدهای چرب بذرهای گیاه گشنیز، ۱۰ گرم بذر از هر تیمار جداسازی و آسیاب شد. سپس با استفاده از دستگاه سوکسوله و با حلال هگزان به مدت ۶ ساعت از بذور روغن‌گیری انجام شد. جهت انجام عملیات جداسازی هگزان از نمونه‌های روغن از دستگاه روتاری استفاده شد. پس از اندازه‌گیری درصد روغن از تیمارهای آزمایش، جهت شناسایی ترکیبات اسید چرب بذور هر تیمار، عمل مشتق سازی با روش متاکلف روی هر نمونه انجام شد. شناسایی ترکیبات اسید چرب بذور برای هر تیمار با دستگاه کروماتوگرافی گازی یونیکام مدل ۴۶۰۰ انجام شد. به منظور شناسایی اسیدهای چرب، زمان بازداری هر یک از نمونه‌ها با زمان بازداری استانداردهای مربوطه، تحت شرایط آزمایشی یکسان مقایسه و درصد هر یک از اسیدهای چرب مشخص گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SPSS (Ver. 26) صورت گرفت. به منظور مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد و برای ترسیم نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده گردید.

۳. نتایج

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثرات متقابل سه‌گانه ژنوتیپ، کود و علف هرز روی درصد روغن تأثیر معنی‌داری داشت. ژنوتیپ‌های مختلف واکنش‌های مختلف از خود نشان دادند ولی به‌طورکلی محتوای روغن در تمام ژنوتیپ ها تحت رقابت با علف هرز کاهش یافت. همچنین نتایج نشان داد که در کرت‌های وجین شده، کود نیتروژن درصد روغن را افزایش داد و ژنوتیپ نهاوندی، تیمار شده با کود اوره در شرایط عاری از علف هرز بالاترین درصد روغن را نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱. اثر متقابل منابع کودی (F1: اوره، F2: اوره با پوشش گوگردی، F3: شاهد) و رقابت علف هرز (W1: وجین شده، W2: عدم وجین) بر درصد روغن دانه ژنوتیپ‌های مختلف گشنیز (G1: نهاوندی،G2: پیشگام، G3: اتیوپی)

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، از نظر آماری با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند.

در ارتباط با ترکیبات اسید چرب بذور گشنیز، اسید پترسولنیک (۷۸٪)، اسید لینولئیک (۱۵٪) و اسید پالمتیک (۴٪)، اصلی‌ترین ترکیبات اسید چرب گشنیز بودند (جدول ۲) که با نتایج (Uitterhaegen et al., 2016) مطابقت دارد. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است در ارتباط با تیمارهای کودی، کود اوره بالاترین درصد اسید پالمتیک در بذور گشنیز را نشان داد و در دیگر ترکیبات اسید چرب گشنیز، اگرچه کود نیتروژن موجب افزایش درصد ترکیبات شد اما تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد. ژنوتیپ‌های مختلف نیز در این بررسی، واکنش‌های مختلفی را ایجاد کردند که ژنوتیپ اتیوپی به‌طور معنی‌داری اسید لینولئیک را به خود اختصاص داد.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

اسیدهای چرب از اجزا اصلی غشای سلولی و دارای نقش ساختاری و عملکردی مهم می‌باشد و به عنوان منبع مهم تأمین انرژی به حساب می‌آید (Amiripour et al., 2021). در بین سه ترکیب اصلی شناسایی در گشنیز، اسید پترسولنیک و اسید لینولئیک

جدول ۱. اثر ژنوتیپ و منابع مختلف کود نیتروژن بر ترکیبات اسید چرب گشنیز در شرایط رقابت با علف هرز

تیمار	C16:0(%)	C18:1(%)	C18:2(%)

ژنوتیپ			
نهاوندی	۳/۸۶a	۷۹/۲۰a	۱۴/۸۰b
پیشگام	۳/۴۳a	۷۹/۲۰a	۱۴/۹۳a
اتیوپی	۳/۶۱a	۷۸/۹۹a	۱۵/۰۵a
کود			
اوره	۳/۷۱a	۷۹/۱۶a	۱۴/۹۵a
اوره با پوشش گوگردی	۳/۶۶bc	۷۹/۱۳a	۱۴/۹۶a
شاهد	۳/۵۳c	۷۹/۱۰a	۱۴/۸۶a
علف هرز			
وجین	۳/۶۷a	۷۹/۲a	۱۴/۹۳a
بدون وجین	۳/۵۹a	۷۹/۰۶a	۱۴/۹۲a

حروف متفاوت در هر سطر بر اساس آزمون دانکن بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد ($P<0/05$).

C16:0: اسید پالمتیک، C18:1 : اسید پتروسلینیک، C18:2 : اسید لینولئیک

از اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشند که در تنظیم فعالیت‌های فیزیولوژیکی بدن انسان و جلوگیری از برخی بیماری‌ها ضروری می‌باشد و ترکیب اصلی دیگر، اسید پالمیتیک می‌باشد که از جمله اسیدهای چرب اشباع بوده و در تهیه صابون و صنایع آرایشی و بهداشتی کاربرد دارد (حمزه لو و همکاران،۱۴۰۰). مطالعات مختلف تأثیر عوامل مختلف محیطی را

روی اسیدهای چرب تائید کرده اند. حضور علف‌های هرز از چالش‌های مهم و تأثیرگذار بخش کشاورزی است که عملکرد کمی و کیفی گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد؛ که به دلیل تداخل رشدی که علف هرز با گیاه زراعی ایجاد می‌کند و رقابت بر سر منابع مورد نیاز و مشترک موجود، بر رشد کمی و کیفی گیاه اثر نامطلوب ایجاد می‌کند (Seyyedi et al., 2016). از چالش‌های دیگر بخش کشاورزی مدیریت عناصر غذایی به خصوص کودهای نیتروژن به دلیل آبشویی بالای این کود می‌باشد. نیتروژن از عناصر ماکرو و تأثیرگذار بر کیفیت روغن گزارش شده است و اعمال آن به مقدار کافی برای گیاه موجب رشد مناسب و بهبود خصوصیات کیفی گیاه می‌شود (Moradzadeh et al., 2021). با توجه به افزایش تقاضا و استفاده روزافزون از گیاهان دارویی، ضرورت ارتقا سطح کمی و کیفی این گیاهان به خصوص عاری بودن آن‌ها از بقایای مواد شیمیایی ضروری به نظر می‌رسد. لذا اجرای راهکارهای مدیریتی از جمله مدیریت صحیح تغذیه‌ای و مدیریت علف‌های هرز جایگزین از بین بردن آن‌ها و مصرف بی‌رویه علف‌کش‌ها در راستای اهداف کشاورزی پایدار و افزایش سطح سلامت تغذیه بشر می‌تواند راهگشا و مؤثر باشد.

منابع

سلیمانی فر، م.، نیازمند، ر.، شهیدی نوقابی، م. ۱۳۹۶. ارزیابی و مقایسه خصوصیات فیزیکوشیمیایی، ساختار اسید چرب و پایداری اکسایشی روغن بذر گشنیز و شوید. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. ۶۲(۱۴)،۱۲۳-۱۳۳.

حمزه لو، م.، اردانه، ا.، مهدیقلی، ک.، نیکنام، و.، عطار، ف.۱۴۰۰. بررسی و مقایسه ترکیب اسیدهای چرب در اندام‌های مختلف گونه‌ای از گیاه سریش (*Eremurus inderiensis*). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران). ۳۴(۱)،۱-۸.

معصومی، ا.، اصغری، ح.، توکلی، ا.، مکاریان، ح.۱۳۹۲. تأثیر منبع تأمین نیتروژن بر تراکم، تولید ماده خشک علف هرز و عملکرد دو توده بومی گشنیز (*Coriandum sativum* L.). نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار.۲۳(۲)،۱۱۴-۱۲۷.

Abdelkader, M., Gendy, A., Bardisi, I., Elakkad, H. 2018. The impact of NPK fertilization level and Lithovit concentration on productivity and active ingredients of *Coriandrum sativum* plants. Journal of Applied Sciences. 8(3): 827-836.

Amiripour, A., Jahromi, M.G., Soori, M.K., Torkashvand, A.M. 2021. Changes in essential oil composition and fatty acid profile of coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves under salinity and foliar-applied silicon. Industrial Crops and Products. 168: 1-8.

Moradzadeh, S., Siavash Moghaddam, S., Rahimi, A., Pourakbar, L., El Enshasy, H.A., Sayyed, R.Z. 2021. Bio-chemical fertilizer improves the oil yield, fatty acid compositions, and macro-nutrient contents in *Nigella sativa* L. Horticulturae. 7(345): 1-15.

Seyyedi, S.M., Rezvani Moghaddam, P., Nassiri Mahallati, M. 2016. Weed Competition Periods Affect Grain Yield and Nutrient Uptake of Black Seed (*Nigella Sativa* L.). Horticultural Plant Journal. 2(3): 172-180.

Uitterhaegen, E., Sampaio, K.A., Delbeke, E.I.P., De Greyt, W., Cerny, M., Evon, P., Merah, O., Talou, T., Stevens, C.V. 2016. Characterization of French coriander oil as source of petroselinic acid. Molecules. 21(1202): 1-13.

Response of Coriander (*Coriandrum sativum L.)* to nitrogen fertilizer sources in competition with weeds

Fatemeh Alaei[1*], Saeideh Maleki[1], Hassan Habibi[1], Mohammad Hosein Fotokian[1], Mostafa Khodadadi[2]

[1] Department of Crop production and Plant Breeding, Faculty of Agriculture / Shahed University, Tehran, Iran
[2] Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran

Abstract

In this study the aim was to specify the effects of different sources of nitrogen and weed competitive on the yield and quality properties of coriander. Randomized complete block design with three replications was conducted at the research farm of the Agricultural College of Shahed University, Tehran, in November 2020. The experiment consisted of three factors: 1) three N fertilizer sources: Control (without N fertilizer); SCU and urea. Another treatment (2): was three genotypes consist of Nahavandi, Pishgam and Ethiopia containing two levels of weeding (3): (without weeding and hand weeding). The results showed that the oil content of genotypes decreased on weedy plots. Also results showed that N fertilizer improved oil content on weeded plots and Nahavandi genotyped treated by Urea fertilizer in weeded polots had the highest oil content. Related to oil component of fruit coriander Petroselinic acid, Linoleic acid and Palmitic acid were the main components. In fertilizer treatment, Urea fertilizer increased Palmitic acid. Also results showed that Ethiopia genotype significantly had the highest percent of Linoleic acid.

Keywords: coriander, fatty oil, sulfur coated urea, urea, weed

[*] e-mail: fa.s.alaei@gmail.com

پتانسیل‌های دارویی گیاه بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium*)

فاطمه کاتبی[1]*

گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جیرفت، نویسنده مسئول

چکیده

بابونه کبیر گیاهی است که از لحاظ طب سنتی شناخته شد است و گزارش‌های درخوری در زمینه فعالیت‌های بیولوژیک ماده مؤثره آن وجو دارد، اما بصورت محصول‌محور در زمینه پتانسیل‌های دارویی این گیاه گزارشی صورت نگرفته است. این مطالعه با هدف معرفی پتانسیل تولیدات داوریی بابونه کبیر بصورت مروری انجام شد. تحقیقات صورت گرفته حاکی از این است که بابونه کبیر سرشار از سزکویی‌ترپن لاکتون‌ها و همچنین فلاونوئیدهاست و بیشترین حضور این ترکیبات در برگ‌ها و گل‌های آن است. برگ و گل‌های این گیاه به دلیل ترکیبات مذکور بویژه ترکیب سزکویی‌ترپن‌لاکتونی از نوع پارتنولیدها دارای فعالیت آرامبخشی، ضد التهابی و تب‌بری قوی است که تاییدکننده استفاده‌های سنتی آن در درمان سردرد میگرنی، تب، سرماخوردگی و آرتروز می‌باشد. فعالیت تحریک‌کنندگی رحم بابونه کبیر نیز تأیید کننده کاربردهای سنتی آن بعنوان سقط جنین و قاعده‌آوری است و همچنین دلیل منع مصرف آن در دوران بارداری است. بر اساس گزارش‌های متعدد کارآزمایی‌های بالینی، مصرف روزانه برگ خشک بابونه کبیر به میزان ۳۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم برای حداکثر ۴ بار در روز درمان مناسبی برای سردردهای میگرنی است و عامل اصلی آن ترکیب سزکویی‌ترپن‌لاکتونی Parthenolide می‌باشد. بنابراین با توجه به کاربردها و فعالیت‌های بیولوژیکی بابونه کبیر بویژه در درمان سردرد میگرنی، با انجام تحقیقات بیشتر می‌توان از آن در تولیدات دارویی در زمینه درمان سردرد میگرنی استفاده کرد.

واژه‌گان کلیدی: بابونه کبیر، سردرد میگرنی، *Tanacetum parthenium*

[1] fateme.afz779@gmail.com

۱. مقدمه

بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium* (L.) Sch.Bip.) گیاهی از خانواده کاسنی (Astraceae) به ارتفاع آن ۱-۰/۳ متر و با برگ‌های سبز متمایل به زرد با طول حدود ۸ سانتیمتر است. بابونه کبیر از جمله گیاهان دارویی معطر است که دارای رایحه تند و تلخ است (Jain et al, 1999؛ Chavez et al., 1999). این گیاه بومی منطقه بالکان است، اما در حال حاضر در آمریکا، اروپا، آفریقا، استرالیا و آسیا ازجمله ایران پراکنش دارد (Pareek et al., 2011). بابونه کبیر در طب سنتی بعنوان تب‌بر استفاده رایجی داشته است و به همین دلیل به Feverfew نیز نامیده می‌شود (Jackson et al., 1096). از لحاظ فیتوشیمیایی بابونه کبیر گیاهی است که سرشار از ترکیبات اسانسی بویژه سزکویی‌ترپن لاکتون‌ها می‌باشد. علاوه بر این ترکیبات فلاونوئیدی نیز در ماده مؤثره این گیاه حضور قابل ملاحظه‌ای دارند. پارتنولید، آرتیکانین و سانتامارین از جمله مهمترین سزکویی‌ترپن‌لاکتون‌های شناسایی شده در ماده مؤثره بابونه کبیر هستند. کامفر، سینئول و تویون تعدادی دیگر از ترکیبات ترپنی گزارش شده از ماده مؤثره آن هستند. فلاونول‌ها و فلاون‌هایی از قبیل کوئرستین، کمپفرول و آپیزنین نیز ترکیبات فلاونوئیدی ماده مؤثره بابونه کبیر را تشکیل می‌دهند (Pourianezhad et al., 2016).

از منظر فعالیت بیولوژیکی، فعالیت‌هایی از قبیل ضد التهابی، ضد سرطانی، ضد سردرد میگرنی، ضد انگلی و آرامبخشی ماده مؤثره این گیاه گزارش شده است و گزارش‌های متعدد بالینی حاکی از فعالیت ضد سردرد میگرنی بابونه کبیر است (Pareek et al., 2010 ؛Tiuman et al., 2005). بطور کلی گزارش‌های صورت گرفته مبین این است که بابونه کبیر گیاهی است که به دلیل محتوی ماده مؤثره خود بویژه ترکیبات سزکویی‌ترپن‌لاکتونی مانند پارتنولیدها دارای خواص بیولوژیکی مختلفی بویژه فعالیت ضد میگرنی مناسبی است و در صورت انجام تحقیقات بیشتر می‌تواند به تولیدات دارویی با کارایی بالا منتج گردد. لذا این مطالعه با هدف معرفی گیاه بابونه کبیر به صورت مروری صورت پذیرفت.

۲. مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر به صورت مروری در منابع فارسی و لاتین تا پایان سال ۲۰۲۲ انجام شد. بدین صورت که با استفاده از کلید واژه‌هایی از قبیل گیاه بابونه کبیر، عصاره، پارتنولیدها، فعالیت بیولوژیک، طب سنتی، تداخلات و عوارض جانبی و ... جستجوها در پایگاه‌های علمی صورت گرفت و منابع و مقالات مربوطه به دقت مورد بررسی و مطالب مورد نیاز استخراج شد.

۳. نتایج

۱،۳. استفاده‌های اتنوفارماکولوژیکی و طب سنتی (Pourianezhad et al., 2016)

بابونه کبیر بعنوان ضدالتهاب، ضد انگل و در درمان میگرن، سر درد، ضخم معده و اختلالات گوارشی کاربرد دارد. همچنین این گیاه بعنوان تب‌بر، قاعده‌آور و در درمان روماتیسم، آرتروز و اختلالات گوارشی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۲،۳. اندام مورد استفاده

سرشاخه‌های گلدار، برگ و اندام‌های هوایی گیاه

۳،۳. ترکیبات ماده مؤثره (Pareek et al., 2010 ؛ Awang et al., 1991 ؛Pourianezhad et al., 2016):

۱،۳،۳. ترکیبات سزکویی‌ترپن‌لاکتونی (بیش از ۳۰ ترکیب)

بیش از ۳۰ سزکویی‌ترپن لاکتون از سه نوع eudesmanolides، germacranolides و guaianolides مانند parthenolide، 1-beta- ،epoxyartemorin ،10-epicanin ،artecanin ،artemorin ،balchanin ،canin ،costunolide ،artecanin 3-beta- ،3-beta-hydroxycostunolide ،8-alpha-hydroxyestagiatin ،8-betahydroxyreynosinn ،hydroxyarbusculin reynosin ،santamarine ،epoxysantamarine ،secotanaparthenolide A ،manolialide ،hydroxyparthenolide secotanaparthenolide B و tanaparthin-alpha-peroxide از ماده مؤثره جداسازی و شناسایی شده است. همچنین دیگر ترکیبات اسانسی شامل ترکیبات مونوترپن‌ها مانند کامفور، کامفن و آلفا و بتا پینن و کومارین‌ها مانند isofraxidin و 9- epipectachol B در ماده مؤثره بابونه کبیر شناسایی شده است.

۲،۳،۳. ترکیبات فلاونوئیدی

شامل فلاونولی مانند کمپفرول، کوئرستین، centaureidin، jaceidin و santin، فلاونی مانند لوتئولین، آپیژنین و chrysoeriol

٤،۳. فعالیت بیولوژیک مواد مؤثره (Tiuman et al., 2005 ؛Pourianezhad et al., 2016)

فعالیت ضد التهابی (عامل مؤثر: ترکیب سزکویی‌ترپن لاکتونی parthenolide)، مهار سنتز پروستاگلاندین‌ها، مؤثر بر عملکرد عظله صاف عروقی (ازجمله عوامل مؤثر parthenolide)، مؤثر بر روی فعالیت پلاکت‌ها (عامل مؤثر: ترکیبات سزکویی- ترپن‌لاکتونی)، مهارکنندگی ترشح هیستامین، محافظت‌کنندگی در برابر آسیب‌های شیمی درمانی (عامل مؤثر parthenolide) ضد سرطان (عامل مؤثر: parthenolide و سایر ترکیبات سزکویی‌ترپن‌لاکتونی)، ضد سردرد میگرنی و پتانسیل پیشگیری از بروز آن، ضد انگل لیشمانیا (عامل: Parthenolide) و آرامبخشی (عامل احتمالی: ترکیب مونوترپنی آلفاپینن)، ضد حشره (عامل: ترکیبات مونوترپنی) ماده مؤثره بابونه کبیر گزارش شده است.

۵،۳. کارآزایی بالینی (Pareek et al., 2010): بر اساس گزارش‌های متعدد بالینی بابونه کبیر دارای فعالیت مناسب در درمان سردرد میگرنی دارد.

٦،۳. تداخلات دارویی/ عوارض جانبی (Pattrick et al., 1989، Smith and Liu, 2001، Palevitch, 1997، Pareek et al., 2010)

دوز روزانه مصرف برگ بابونه کبیر جهت درمان میگرن ۱۲۵ میلی‌گرم از برگ خشک آن توصیه شده است و میزان Parthenolide موجود در این مقدار ماده خشک به منظور درمان میگرن باید حداقل ۲ درصد باشد. در کودکان زیر دوسال نباید استفاده شود. در کودکان بزرگتر از ۲ سال دوز تنظیم‌شده بزرگسالان را باید متناسب با وزن آنها تنظیم کرد. دوز تعیین شده بر

اساس فرد بزرگسال با وزن ۷۰ کیلوگرم است و بنابراین اگر وزن بچه ۲۵-۲۰ کیلوگرم باشد، دوز مناسب بابونه کبیر برای او یک‌سوم دوز فرد بزرگسال خواهد بود. دوز برای افراد بزرگسال: ۳۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم برای حداکثر ۴ بار در روز تعیین شده است و این دوز می‌تواند حاوی ۰/۴-۰/۲ درصد Parthenolide باشد. برای بیماری‌های التهابی (مانند آرتروز) ۱۲۰-۶۰ قطره عصاره به تکرار دو بار در روز و به نسبت ۱:۱ وزنی/حجمی یا ۱۲۰-۶۰ قطر یا ۱۲۰-۶۰ قطره تنور دو بار در روز و به نسبت ۱:۵ وزنی/حجمی توصیه شده است. مهمترین عوارض جانبی مصرف بابونه کبیر زحم و التهاب مخاط دهان و زبان، تورم لب و درماتیت است (Pareek et al., 2010). توسط زنان باردار نباید استفاده شود چون برگ‌های این گیاه موجب القاء قاعدگی می‌شوند. همچنین مصرف آن برای مادران شیرده و کودکان توصیه نمی‌شود (Awang, 1993). یک گزارش بالینی بر روی ۳۰ بیمار مبتلا به میگرن به مدت ۱۱ ماه نشان داد که استفاده بابونه کبیر فاقد اثر ژنوتوکسیک است و اختلالات کروموزومی را القاء نمی‌کند (Anderson et al., 1988).

٤. بحث و نتیجه‌گیری

بطور کلی از مطالعات و گزارش‌های صورت گرفته در زمینه گیاه بابونه کبیر چنین برداشت می‌شود که ماده مؤثره این گیاه به دلیل وجود سزکویی‌ترپن‌لاکتون‌ها بویژه پارتنولیدها دارای فعالیت‌های بیولوژیکی قوی می‌باشد و بارزترین این اثرات، خاصیت ضد میگرنی این ترکیبات می‌باشد که در صورت انجام تحقیقات بیشتر می‌تواند در تولید داروهایی در این زمینه کمک شایانی نماید.

منابع

Pourianezhad, F., Tahmasebi, S., Abdusi, V., Nikfar, S., Mirhoseini, M. 2016. Review on feverfew, a valuable medicinal plant. J HerbMed Pharmacol. 5(2):45-49.

Shafaghat, A., Salimi, F. 2008. Extraction and Determining of Chemical Structure of Flavonoids in Tanacetum parthenium (L.) Schultz. Bip. from Iran. J. Sci. I. A. U (JSIAU). 18, 68: 39-42.

Tiuman, T.S., Nakamura, T.U., Cortez, D.A.G, et al. 2005. Antileishmanial Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from Tanacetum parthenium. antimicrobial agents and chemotherapy. 176–182.

Awang, D.V.C., Dawson, B.A., Kindack, D. 1991. Parthenolide Content of Feverfew (*Tanacetum parthenium*) Assessed by Hplc and 1H-nmr Spectroscopy. Journal of Natural Products. 54, 6: 1516-1421.

Pattrick, M., Heptinstall, S., Doherty, M. 1989. Feverfew in rheumatoid arthritis: A double blind, placebo controlled study. Ann Rheum Dis. 48:547-9.

Smith, T.H., Liu, X. 2001. Feverfew extracts and the sesquiterpene lactone parthenolide inhibit intercellular adhesion molecule-1 expression in human synovial fibroblasts. Cell Immunol. 209: 89-96.

Palevitch, D. 1997. Feverfew (*Tanacetum parthenium*) as prophylactic treatment for migraine: A double-blind placebo-controlled study. Phytother Res. 11: 508-11.

Pareek, A., Suthar, M., Rathore, G.S., Bansal, V. 2010. Feverfew (Tanacetum parthenium L.): A systematic review, Pharmacognosy Reviews. 5, 9, 10.4103/0973-7847.79105.

Awang, D.V. 1993. Fever few: A headache for the consumer. Herbal Gram. 29: 34-5.

Anderson, D., Jenkinson, P.C., Dewdney, R.S., Blowers, S.D., Johnson, E.S., Kadam, NP. 1988. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in lymphocytes and urine mutagenicity of migraine patients: A comparison of chronic feverfew users and matched non-users. Hum Toxicol. 7: 145-52.

Chavez, M., Chavez, P., Feverfew. 1999. Hosp Pharm. 34: 436-61.

Jackson, B., McDonald, R.L. 1986. In: Dobelis IN, editor. Magic and Medicine of Plants. Pleasantville, NY: Reader's Digest Assoc.; 1986.

تأثیر الیسیتور زیستی کیتوسان بر محتوا برخی مشتقات فنلی کلپوره در شرایط کشت کالوس

فهیمه قرائی، منیره چنیانی[1]، علی گنجعلی

[1] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

کلپوره (*Teucrium polium* L.) یکی از گیاهان دارویی مهم است که بیش از هزار سال، در طب‌سنتی استفاده می‌شود. این گیاه غنی از متابولیت‌های ثانوی نظیر ترکیبات‌فنلی است. درحال‌حاضر تکنیک‌های بیوتکنولوژیکی از جمله کاربرد الیسیتورهای زیستی، برای افزایش بیوسنتز متابولیت‌ها در شرایط کشت بافت استفاده می‌شود. این پژوهش با هدف بررسی اثر هورمون‌های گیاهی BAP و NAA و الیسیتور زیستی کیتوسان برمحتوا برخی مشتقات فنلی کل(فنل، فلاونوئید و اسیدهای فنلی) کالوس-کلپوره انجام شد. ریزنمونه برگ در محیط‌کشتMS دارای هورمون‌های گیاهی کشت شدند و سپس با ۳ غلظت الیسیتور کیتوسان (۵۰، ۱۰۰و ۱۵۰ میلی‌گرم درلیتر) تیماردهی شدند و درنهایت، محتوا برخی مشتقات‌فنلی در کالوس‌های هشت هفته‌ای سنجش شدند. نتایج نشان داد که میزان مشتقات فنلی (فنل‌کل، فلاونوئید و اسیدهای‌فنلی) در کالوس‌های تیمارشده با غلظت ۱۰۰میلی‌گرم درلیتر کیتوسان به بیشینه مقدار می‌رسد. از این‌رو این غلظت پیشنهادی کیتوسان به‌عنوان یک محرک توانمند می‌تواند موجب بالابردن محتوا ترکیبات‌فنلی درکالوس کلپوره گردد.

واژگان کلیدی: الیسیتور، کشت بافت، کلپوره، کیتوسان، متابولیت‌های ثانوی

[1] ایمیل نویسنده مسئول
Email: Cheninay@um.ac.ir

۱. مقدمه

گیاهان دارویی و کاربرد این دسته از گیاهان در درمان، سابقه‌ای به قدمت خود بشر دارد. امروزه به‌دلیل کاهش کارایی داروهای شیمیایی و افزایش منع مصرف آن‌ها علیه بیماری‌ها، انسان را وادار به کسب آگاهی از گیاهان دارویی نمود به‌طوری‌که داروسازی مدرن، طیف‌وسیعی از داروهای با منشاء گیاهی را در خود گنجانده است (Petrovska, 2012). هر چند تاثیرات گیاهان دارویی اساسا وابسته به ترکیبات فیتوشیمیایی و نقش آن‌ها در فرآیندهای متابولیسم است اما متابولیت‌های‌ثانوی گیاهی، هم مسئول فعالیت‌های زیستی مهم در گیاهان بوده و هم نقش مهمی در علم پزشکی و مصارف انسان دارند (Hussein and Ansar, 2019). متابولیت‌های‌ثانوی ترکیبات آلی هستند که مستقیماً در مراحل رشدونمو یا تولیدمثل یک موجود زنده شرکت نمی‌کنند، اما فعالیت‌زیستی متنوع از جمله فعالیت‌های آنتی اکسیدان، ضدمیکروبی و ضد التهاب آن‌ها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده است (Oksman-Caldentey and Inzé, 2004). ساخت متابولیت‌های ثانوی با روش‌های شیمیایی مقرون به صرفه نیست لذا تولید آن‌ها ازطریق به‌کارگیری روش‌های زیست‌فناوری و کشت‌گیاهی به‌عنوان یک روش کارآمد جایگزین مدنظرقرار گرفته است (Kumar and Loh, 2012).

کلپوره گیاهی علفی، گلدار، وحشی و چندساله از تیره نعناع است که ارزش‌های دارویی زیادی مانند اثر ضدتشنج، ضددرد، کاهش‌دهنده چربی و قندخون دارد (Rabba *et al*., 2012). یکی از راه‌های افزایش تولید متابولیت‌های‌ثانوی در شرایط کشت درون شیشه استفاده از الیسیتور است (Patel *et al*., 2020). الیسیتورها ترکیباتی با وزن مولکولی پائین هستند که فعالیت‌شان منجر به فعال‌سازی دسته‌ای از مکانیسم‌های دفاعی و بیوسنتز مواد شیمیایی مفید می‌شوند. کابرد الیسیتورها در کشاورزی در جهت بهبود سلامت گیاه و افزایش عملکرد محصول می باشد. مطالعات نشان داده است که الیسیتورها می‌توانند سنتز متابولیت‌های‌ثانوی در محیط‌کشت سلول‌های گیاهی را افزایش دهند. حضور الیسیتورها در محیط‌کشت از طریق القاء تنش و فعال‌کردن سیستم‌دفاعی گیاه باعث افزایش تولید ROS ها می‌شود و این افزایش موجب تغییر بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز مشتقات فنلی و نهایتا افزایش محتوا آن‌ها می گردد. از این رو استفاده از محیط‌کشتMS به همراه الیسیتورها، از طریق فعال‌کردن مکانیسم‌های دفاعی باعث القاء تشکیل متابولیت‌های‌ثانوی می‌گردد (Patel and Krishnamurthy, 2013). از این‌رو در تحقیق حاضر در صدد برآمدیم تا تولید متابولیت‌های‌ثانوی کلپوره را در شرایط تیمار با الیسیتور زیستی کیتوسان و در بستر کشت‌کالوس ارزیابی نماییم.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. روش تحقیق

بذر جوانه‌زده کلپوره پس از سبز شدن بخش‌هوایی، به محیط هیدروپونیک محتوی محلول‌غذایی هوگلند انتقال یافت. سپس ریزنمونه برگ در محیط‌کشتMS دارای تیمار دو هورمونBAP و NAA (BAP۱، $BAP_{۱/۵}$ و $BAP_{۱/۵}$ + $NAA_{.۰/۵}$ میلی‌گرم درلیتر) قرار گرفت و اجازه داده شد تا کالوس تشکیل گردد. کالوس ها در پایان هفته ششم، با الیسیتور کیتوسان (غلظت های ۵۰، ۱۰۰و ۱۵۰ میلی‌گرم درلیتر) تیماردهی شدند. پس از دو هفته از تیمار الیسیتور، وزن‌تر و خشک کالوس‌ها به‌عنوان معیار

رشد اندازه‌گیری شد. عصاره‌گیری کالوس به‌روشAnnegowda همکاران (۲۰۱۲)، سنجش محتوا فنل‌کل به‌روش Marinova و همکاران (۲۰۰۵) و محتوا ترکیبات فلاونوئید برمبنای روشZhishen و همکاران (۱۹۹۹) انجام شد. از روش Matkowski و همکاران (۲۰۰۸) برای ارزیابی محتوا اسیدهای فنلی‌کل استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و برای مقایسه میانگین داده ها از آزمون چنددامنه ای دانکن، در سطح احتمال خطا یک درصد استفاده شد و نمودارها، به وسیله نرم افزار EXCEL رسم شدند.

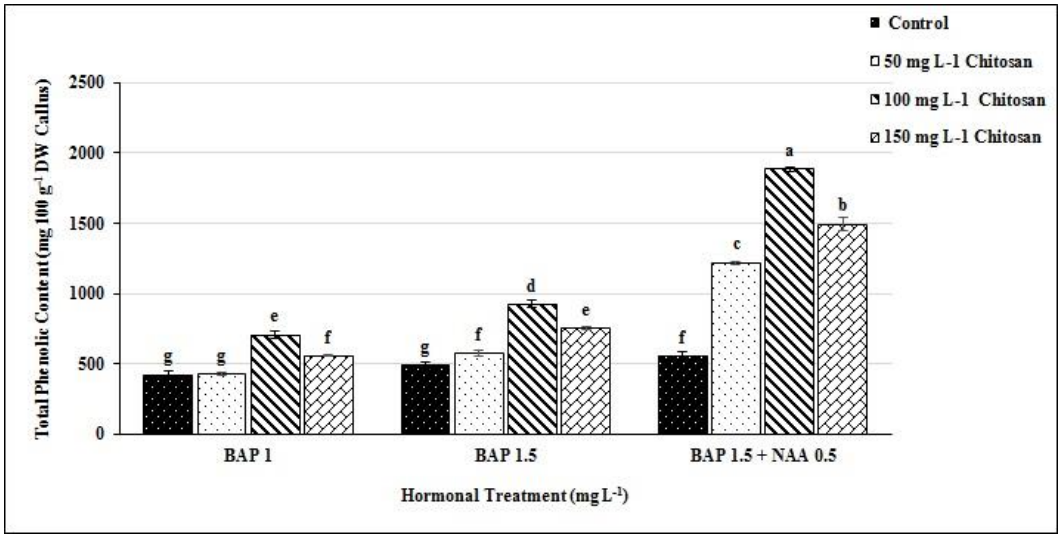
۳. نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که الیسیتورکیتوسان به‌تنهایی و نیز اثر متقابل الیسیتور و هورمون تاثیر معنی‌داری بر محتوا کل ترکیبات فنلی، فلاونوئید و اسیدهای‌فنلی سنجش شده در کالوس‌ها داشتند (جدول۱).

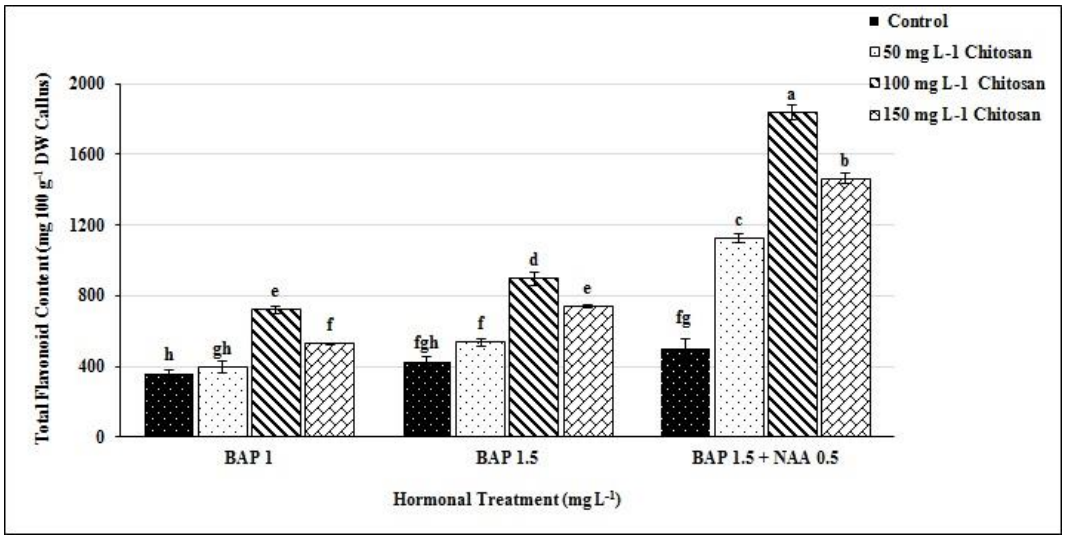
جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در کالوس کلپوره در سطح احتمال خطای یک درصد.

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات فنل کل	میانگین مربعات فلاونوئید	میانگین مربعات اسیدهای فنلی
هورمون	۲	۶۶۷۶. ۲۶۱	۱۷۸۸۹۰۶.۱۳۲	۲۱۲۰۲۲.۱۵۱
الیسیتور	۳	۱۴۷۲۲۸۱.۱۹۵	۸۵۵۶۰۷. ۸۲۲	۹۶۶۴۳.۷۰۶
هورمون×الیسیتور	۶	۶۴۰۸.۳۲۹	۱۵۹۷۵۶.۱۵	۱۹۷۸۹.۸۳۳
خطا	۲۴	۲۳۷۹.۳۷۶	۲۷۷۸. ۶۷۷	۱۰۷۱.۲۶۳
کل	۳۶	---------	---------	---------

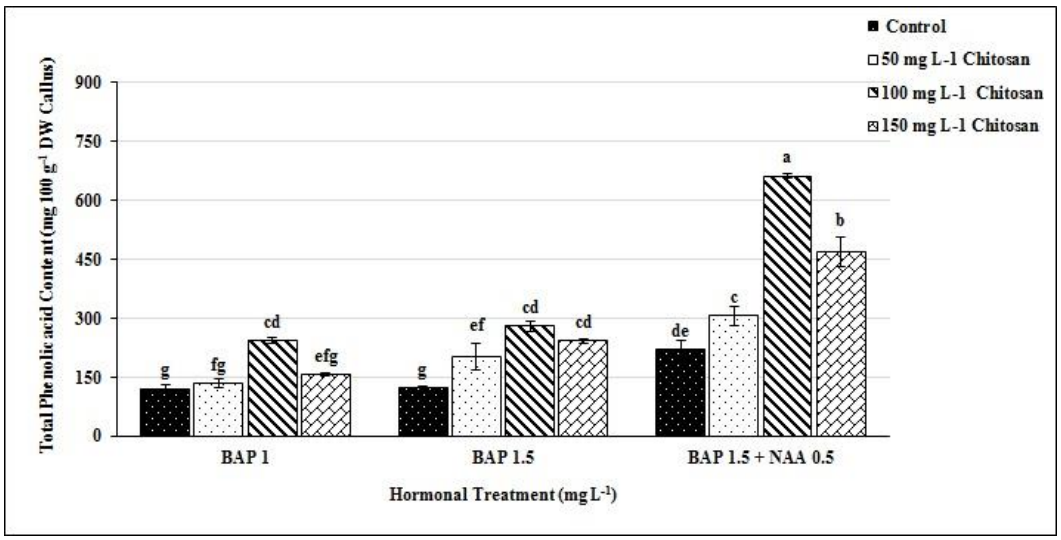
نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (شکل۱) نشان داد که بیشترین محتوا فنل‌کل در محیط‌کشت دارای تیمار هورمونی" ۰/۵ $BAP_{1/5}$+NAA میلی‌گرم درلیتر" به‌همراه کاربرد غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم درلیتر کیتوسان مشاهده شد. مقایسه میانگین داده‌های فلاونوئیدکل (شکل۲) و اسیدهای‌فنلی (شکل۳) نیز نشان داد که کاربرد کیتوسان در غلظت ۱۰۰میلی‌گرم درلیتر موجب بیشینه محتوا فلاونوئید و اسیدهای‌فنلی در تیمارهورمونی " ۰/۵ NAA+ $BAP_{1/5}$ میلی‌گرم درلیتر" گردید.



شکل۱. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌های حاصل از محتوا فنل‌کل کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره در محیط‌کشت حاصل از تاثیر متقابل هورمون و کیتوسان.



شکل۲. نتایج مقایسه میانگین داده‌های حاصل از محتوا فلاونوئیدکل کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره در محیط‌کشت حاصل از تاثیر متقابل هورمون و کیتوسان.



شکل۳. نتایج مقایسه میانگین داده‌های حاصل از محتوا اسیدهای‌فنلی کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ کلپوره در محیط‌کشت حاصل از تاثیر متقابل هورمون و کیتوسان.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

در بررسی‌های انجام شده بر روی گیاهان مختلف مشخص شده است که ترکیبات‌فنلی جز متابولیت‌های مهم تولیدی در گیاهان محسوب می شوند. نوع و غلظت هورمون‌ها و سایر عوامل در شرایط‌کشت، بر فرآیندهای متابولیسمی و تغییر سطح متابولیت‌های ثانوی موجود در کالوس موثر است (Serrano *et al.*, 2007). برپایه مطالعات، عوامل مختلفی شامل عوامل ژنتیکی و محیطی می‌توانند محتوا ترکیبات‌ثانوی موجود در بافت‌های گیاهی را تحت‌تاثیر قرار دهند (Faleer and Fialho, 2009). در این پژوهش برهم‌کنش و تاثیر هورمون و الیسیتور کیتوسان بر میزان ترکیبات فنلی مختلف در کشت‌کالوس ارزیابی شد و نتایج

نشان داد که بهترین شرایط هورمونی در جهت افزایش تولید فنل‌ها، تیمار هورمونی"۰/۵ NAA+ ۱/۵BAP میلی‌گرم درلیتر" و بهترین غلظت الیسیتور کیتوسان، تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم درلیتر آن است. تلفیق این دو تیمار در کنار، هم موجب افزایش قابل‌توجه و معنی‌دار محتوا مشتقات فنلی کالوس گردید. در این راستا نتایج Mahdavian fard و همکاران (۲۰۲۰) بر روی گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) نشان داد که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم درلیتر محرک کیتوسان پس از گذشت ۵ روز، سبب افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و افزایش محتوا فنل کل و اسیدرزمارینیک شد. درادامه، پژوهش Ayyobi و همکاران (۲۰۱۶) بر روی گیاه بادرنجبویه‌دنایی (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.) نشان داد که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم درلیتر الیسیتور کیتوسان باعث افزایش بیوسنتز ترکیبات ثانوی-فنلی (فنل، فلاونوئید و اسیدهای فنلی) و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش میزان اسیدرزمارینیک گردید. Shabani و همکاران (۲۰۱۹)، به‌مطالعه اثر کیتوسان بروی شاخه‌های گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) پرداختند و بیان داشتند که تیمار شاخه‌ها توسط غلظت‌های افزایشی کیتوسان (غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم درلیتر) موجب تشدید فعالیت آنزیم PAL و به‌دنبال‌آن تولید بیشتر ترکیبات فنلی در شاخه ها می‌گردد. کیتوسان به‌عنوان یک محرک زیستی فعالیت آنزیم‌های مسیر فنیل‌پروپانوئیدی وتولید متابولیت‌های‌ثانوی را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد. یکی از آنزیم‌های کلیدی در شروع مسیر فنیل‌پروپانوئید، آنزیم PAL است که سبب تولید متابولیت‌های‌ثانوی در گیاهان می‌شود. به‌عبارتی نقطه تنظیمی مهم در ارتباط با تولید متابولیت‌های‌ثانوی از متابولیت‌های‌اولیه است. این آنزیم با دآمیناسیون فنیل‌آلانین و سنتز اسیدسینامیک پیش‌ماده مشترک برای بیوسنتز مشتقات‌فنلی را فراهم می‌کند. تحقیقات بسیاری نشان داده است که کیتوسان به‌عنوان محرک سلولی باعث افزایش رونویسی mRNA آنزیم PAL شده و سبب فعال‌سازی مسیر فنیل‌پروپانوئید و به‌دنبال‌آن افزایش تولید مشتقات‌فنلی می‌گردد (Anterola *et al*., 2002). نتایج تحقیقات مختلف یک ارتباط مثبت بین فعالیت آنزیم PAL و تجمع ترکیبات فنل‌کل را نشان داده است. به‌عبارتی قرارگرفتن در معرض محرک به افزایش تجمع ترکیبات‌فنلی از طریق تحریک فعالیت این آنزیم منجر می‌شود.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بابت تأمین هزینه‌های پژوهش حاضر از محل اعتبارات متمرکز این معاونت (کد طرح به شماره۳/۵۵۰۸۷) سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

Anterola, AM., Jeon, JH., Davin, LB., et al. 2002. Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*. Jornal of Biological Chemistry. 277(21): 18272- 18280.

Annegowda, H.V., Bhat, R., Min-Tze, L., Karim, A.A., Mansor, S. M. 2012. Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits. Journal of Food Science and Technology. 49(4): 510-514.

Ayyobi, N., Fattahi, M. 2017. Induction effects of colchicine and chitosan on rosmarinic acid production in hairy root cultures of Zarrin-Giah (*Dracocephalum kotschyi* Boiss). Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology). 30(1): 1-13.

Faller, A.L.K., Fialho, E. 2009. The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking. Food Research International. 42(1): 210-215.

Hussein, R.A., El-Anssary, A.A. 2019. Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. Herbal Medicine 1(3): 12-26.

Kumar, P. Loh, C.S. 2012. Plant tissue culture for biotechnology. In Plant biotechnology and agriculture. Academic Press.131-138.

Mahdavianfard, A., Dahajipour Heidarabadi, M., Malekzadeh, K., Ahhafi, S. 2021. The effect of chitosan on phenolic compounds, rosmarinic acid and expression of key genes involved in rosmarinic acid biosynthesis in cell suspension culture of *Melissa officinalis* L. Journal of Cell & Tissue. 11(4): 243-261.

Marinova, D., Ribarova, F., Atanassova, M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy. 40(3): 255-26.

Matkowski, A. 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants. Biotechnology Advances. 26(6): 548–560.

Oksman-Caldentey, K.M., Inzé, D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. Trends in Plant Science. 9(9): 433-440.

Patel, H., Krishnamurthy, R. 2013. Elicitors in plant tissue culture. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2(2): 60-65.

Patel, Z.M., Mahapatra, R., Jampala, S.S.M. 2020. Role of fungal elicitors in plant defense mechanism. In Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture. Academic Press. 4(3):143-158.

Petrovska, B.B. 2012. Historical review of medicinal plants' usage. Pharmacognosy Reviews. 6(11): 1.

Rabba'a, M.M., Shibli, R. Shatnawi, M. 2012. Cryopreservation of *Teucrium polium* L. shoot tips by vitrification and encapsulation dehydration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 110(3): 371-382.

Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F. 2007. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. Food Research International. 40(1): 15-21.

Shabani, L., Razavizadeh. R. 2019. Chitosan enhances rosmarinic acid production in shoot cultures of *Melissa officinalis* L. through the induction of methyl jasmonate. Botanical Studies. 60(1): 1-10.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry. 64(4): 555–559.

The effect of Chitosan bio-elicitor on the amount of some phenolic derivatives of *Teucrium polium* callus

Fahimeh Gharaei [1], Monireh Gheniany [2*], Ali Ganjeali [3]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad
[2]*Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad
[3]Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad

Abstract

Teucrium polium L. is one of the most important medicinal plants that has been used in traditional medicine for more than a thousand years. This plant is rich in secondary metabolites such as phenolic compounds. Currently, biotechnological techniques, including the use of biological elicitors, are used to increase the biosynthesis of metabolites in tissue culture. In this research, the effect of BAP and NAA and bio-elicitor chitosan was investigated on (phenol, flavonoid, phenolic acids) of *T. polium*. Leaf explant was cultured on the MS medium with plant growth regulators. Then the chitosan with three concentrations (50, 100, and 150 mg L^{-1}) was added to cultures, and finally, the phenolic derivatives were measured in eight-week calli. The results showed that the amount of phenol, flavonoid and phenolic acid had the maximum in calli treated with 100 mg L^{-1} chitosan. Therefore, chitosan at 100 mg per Liter as a powerful stimuli can increase the synthesis of phenolic compounds in callus of *T. polium*.

Keywords: Elicitor, Tissue culture, *Teucrium polium*, Chitosan, Secondary metabolites

*Cheniany@um.ac.ir

تأثیر باکتری *Pseudomonas chlororaphis* بر رشد و میزان اسیدرزمارینیک در گیاه بادرنجبویه تحت شرایط کنترل شده

معظمه حسینی عباس‌آبادی[۱]، مریم دهجی‌پور حیدرآبادی[۲*]، روح‌اله صابری ریسه[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان
[۲] استادیار گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان
[۳]استادگروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان

چکیده

با توجه به نقش مهم باکتری‌های محرک رشد در عملکرد گیاهان، در این پژوهش تأثیر جمعیت‌های مختلف باکتری *Pseudomonas chlororaphis* بر رشد گیاه بادرنجبویه در کشت درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور آزمایشی با استفاده از جمعیت‌های مختلف باکتری (۰ به‌عنوان شاهد، $۱۰^{۸}$، $۱۰^{۹}$ و $۱۰^{۱۰}$) در قالب طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرار انجام شد. نتایج این پژوهش رشد مناسب گیاه بادرنجبویه را در محیط‌های حاوی باکتری نشان داد. تعداد برگ و تعداد گره در گیاهان رشد یافته در حضور باکتری نسبت به گیاهان شاهد کاهش نشان داد. هرچند طول بلندترین وکوتاهترین میانگره با اضافه کردن باکتری به محیط کشت بادرنجبویه تحت تأثیر قرار نگرفت. هم‌چنین میزان اسیدرزمارینیک در گیاهان رشدیافته در حضور باکتری نسبت به شاهد ۲۳٪ افزایش یافت. براساس نتایج این پژوهش، استفاده از باکتری محرک رشد در تولید متابولیت ثانویه در گیاه دارویی بادرنجبویه نقش بسزایی داشته است.

واژگان کلیدی: اسید رزمارینیک، بادرنجبویه، *Pseudomonas chlororaphis*، محرک زیستی

ایمیل نویسنده مسئول
* m.dahaji@vru.ac.ir

۱. مقدمه

استفاده بیش از حد از کودهای شیمیایی برای بهبود عملکرد و کیفیت گونه‌های گیاهی در حال تبدیل شدن به یک تهدید جدی برای اکوسیستم‌های طبیعی است و اثرات منفی زیست محیطی بالایی دارد (Wang et al., 2018). کاربرد طولانی مدت کودهای شیمیایی باعث بدتر شدنpH، وضعیت تغذیه، جامعه میکروبی و افزایش واکنش پذیری فلزات سنگین در خاک می‌شود (Lin et al., 2019). علاوه بر این، کود شیمیایی باعث تخریب مداوم منابع آب شده و تأثیر منفی بر سلامت انسان و دام دارد (Prashar and Shah, 2016). رویکردهای نوآورانه بیوتکنولوژی مانند استفاده از ارتباطات مفید بین گیاهان و باکتری‌ها به نام باکتری‌های محرک رشد گیاه اخیراً به عنوان روش‌های پایدار و قابل احترام برای محیط‌زیست پیشنهاد شده‌اند که ضمن اجتناب یا به حداقل رساندن استفاده از کودهای مصنوعی و آفت‌کش‌ها بر کودهای زیستی نیز تکیه می‌کنند (Tennakoon et al., 2019). بررسی‌ها نشان داده شده است که باکتری‌های محرک رشد با افزایش جذب مواد مغذی و تقویت رشد گیاه و محافظت گیاه در برابر پاتوژن‌های موجود در خاک، ابزارهای بیوتکنولوژیکی جایگزین موثر و امیدوارکننده‌ای را ارائه می‌کنند (Pagnani et al., 2018). هم‌چنین باکتری‌های محرک رشد می تواند رشد گیاه را از طریق طیف وسیعی از مکانیسم ها مانند سنتز مواد قابل جذب به‌طور مستقیم توسط گیاهان (Syed-Ab-Rahman et al., 2018)، تولید مواد مغذی، ایجاد مقاومت و پیشگیری از بیماری‌های گیاهی تحریک کند (Köhl et al., 2019) . تأثیر مثبت کاربرد باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه بر پارامترهای رشدی، بهبود تولید مواد زیست فعال و هم‌چنین کیفیت گیاهان دارویی به‌عنوان یک روش نوین زیستی و دوستدار محیط زیست به اثبات رسیده است. گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) متعلق به خانواده نعناعیان به‌دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه مهم به‌ویژه اسیدرزمازینیک در زمینه‌های پزشکی، صنایع آرایشی-بهداشتی و صنایع غذایی مورد توجه می‌باشد (Papoti et al., 2019). لذا در این پژوهش اثر جمعیت‌های مختلف باکتری *Pseudomonas chlororaphis* درکشت درون شیشه‌ای گیاه بادرنجبویه بر رشد و تولید اسیدرزمارینیک مورد مطالعه قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

کشت جامد باکتری *P. chlororaphis* در محیط کشت KB[1] و سپس محیط کشت مایع با استفاده از شیکر جهت رشد باکتری انجام شد. جوانه زنی بذرها بعد از ضدعفونی نمودن سطحی آن‌ها در تاریکی و دمای ۲۲°C در محیط کشت حاوی آب و آگار انجام شد. پس از ظهور برگ‌های لپه‌ای گیاهچه‌های یکنواخت انتخاب و به محیط MS دارای جمعیت‌های مختلف باکتری (۰ به عنوان شاهد، 10^8، 10^9 و 10^{10} باکتری در میلی‌لیتر) با اسیدیته معادل ۵/۷ منتقل و به مدت ۵۰ روز در اتاقک‌های رشد با شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲۵°C قرار داده شدند. در پایان آزمایش صفات رشدی مانند تعداد برگ در گیاه، تعداد گره در گیاه، طول بلندترین میانگره و طول کوتاه‌ترین میانگره در گیاه با خط‌کش میلی‌متری اندازه-گیری شد. سنجش اسید رزمارینیک پس از عصاره‌گیری نمونه‌های برگی خشک با استفاده از متانول انجام شد. مخلوط آزمایش شامل ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره، ۳ میلی‌لیتر اتانول و زیرکونیوم اکسی‌کلراید $ZrOCl_2$ در غلظت نهایی ۰/۵ مولار بود. مخلوط

[1] King's B

حاصل به‌مدت ۵ دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۶۲ نانومتر اندازه‌گیری شد (Ozturk et al., 2010). این آزمایشدر قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام شد. آنالیز واریانس و مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن و با استفاده از نرم‌افزار SPSS و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار EXCEL صورت گرفت.

۳. نتایج

با انتقال گیاهچه‌ها به محیط کشت شاهد و محیط کشت‌های دارای جمعیت مختلف باکتری، گیاهچه‌های بادرنجبویه با گذشت ۵۰ روز از زمان انتقال، رشد رویشی مناسبی از خود نشان دادند (شکل ۱).



د ج ب الف

شکل ۱. رشد گیاهچه‌های بادرنجبویه در محیط حاوی جمعیت‌های مختلف باکتری. الف) شاهد ب) جمعیت 10^8 ج) جمعیت 10^9 د) جمعیت 10^{10}

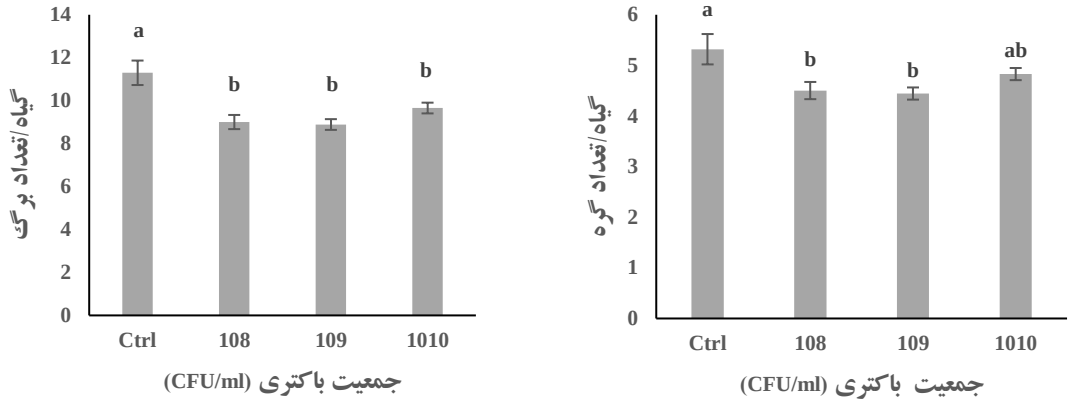
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر جمعیت‌های مختلف باکتری *P. chlororaphis* بر تعدادبرگ در سطح احتمال ۱٪ و تعداد گره در گیاهچه‌های بادرنجبویه در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود. در حالی‌که اثر جمعیت‌های مختلف باکتری بر طول بلندترین میانگره و طول کوتاه‌ترین میانگره در گیاهچه‌های بادرنجبویه از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (جدول ۱).

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر جمعیت‌های مختلف باکتری *Pseudomonas chlororaphis* بر تعدادبرگ، تعداد گره، طول بلندترین میانگره و طول کوتاه‌ترین میانگره در کشت درون شیشه‌ای بادرنجبویه

		میانگین مربعات			
منابع تغییر	درجه آزادی	تعدادبرگ	تعداد گره	طول بلندترین میانگره	طول کوتاه‌ترین میانگره
تیمار	۳	۶/۱۵۷ **	۰/۸۰۵ *	۰/۲۸۲ ns	۰/۰۱۲ ns
خطا	۱۶	۰/۶۹۵	۰/۱۸۸	۰/۱۱۳	۰/۰۱۴
درصد ضریب تغییرات		۸/۶	۹/۰۸	۱۴/۵۲	۱۸/۰۲

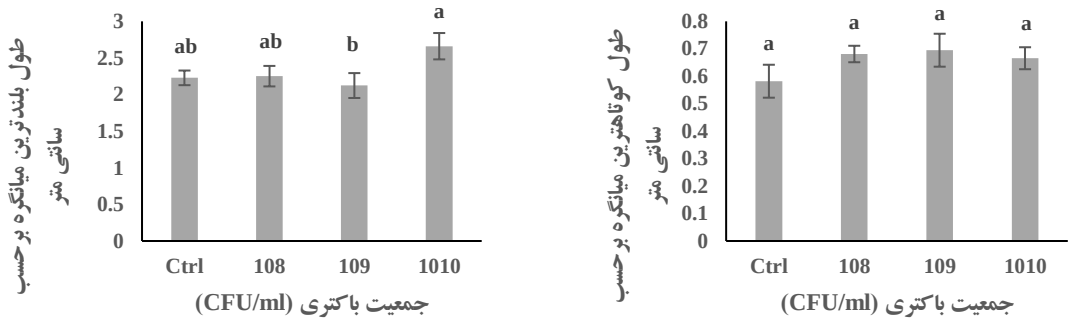
***، ** و ns به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد، ۱ درصد و عدم تفاوت معنی‌دار**

همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است با حضور باکتری محرک رشد در محیط کشت بادرنجبویه تعداد برگ نسبت به شاهد کاهش یافته است. اگرچه کاهش در تعداد برگ گیاه بادرنجبویه، درجمعیت‌های مورد استفاده باکتری نسبت به یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشت. کاهش در تعداد گره نیز در گیاهان رشد یافته در محیط‌های حاوی جمعیت‌های 10^8 و 10^9 باکتری *P. chlororaphis* به ترتیب به میزان ۲۰٪ و ۲۱٪، نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۲).



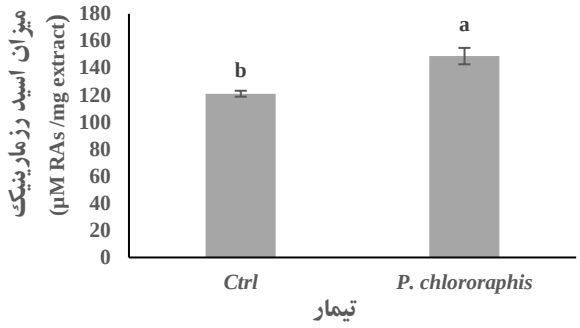
شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف متابولیت‌های باکتری بر تعداد برگ و تعداد گره در گیاه بادرنجبویه. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال $p \leq ۰/۰۵$ اختلاف معنی‌داری ندارند.

بر اساس نتایج به دست آمده طول بلندترین میانگره و کوتاهترین میانگره در گیاهان رشد یافته در حضور جمعیت‌های مختلف باکتری نسبت به گیاهان شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل۳).



شکل ۳. تأثیر جمعیت‌های مختلف باکتری بر بر طول بلندترین میانگره و طول کوتاهترین میانگره در گیاه بادرنجبویه. میانگین-هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال $p \leq ۰/۰۵$ اختلاف معنی‌داری ندارند.

چنانچه در شکل ۴ نشان داده شده است میزان اسیدرزمارینیک در گیاهان رشد یافته در حضور باکتری نسبت به گیاهان شاهد به‌طورمعنی‌داری ($p \leq ۰/۰۵$) افزایش یافته است.



شکل ٤. تأثیر حضور باکتری *P. chlororaphis* بر میزان اسیدرزمارینیک در گیاه بادرنجبویه.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

از آنجایی‌که کشت گیاهان دارویی به شدت توسط تنش‌های غیرزیستی و استفاده از مواد شیمیایی در کشاورزی تهدید می‌شود استفاده از باکتری‌های محرک رشد در این راستا راه حل‌هایی ارزان و دوستدار محیط زیست جهت افزایش رشد، عملکرد و کیفیت ترکیبات زیستی گیاهان دارویی ارائه کرده است. مطالعه ریاحی و همکاران (۲۰۲۰) با استفاده از سه باکتری محرک رشد *P. rhizophila*، *Halomonas desertis* و *Oceanobacillus iheyensis* در گیاه سداب افزایش رشد، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و متابولیت‌های ثانویه مانند ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را نشان داد.هم‌چنین استفاده از باکتری محرک رشد *P. fluorescens* در گیاه بذرالبنج افزایش میزان تروپان آلکالوئید هیوسیامین را به دنبال داشت (*Ghorbanpour and Hatami, 2014*). براساس نتایج این پژوهش استفاده از باکتری *P. chlororaphis* می‌تواند با تأثیر بر تولید اسیدرزمارینیک در گیاه بادرنجبویه، تولید ترکیبات زیستی فعال را نیز در شرایط کنترل شده افزایش دهد و به عنوان یک محرک زیستی جهت افزایش متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

Ab-Rahman, S.F., Singh, E., Pieterse, C.M., Schenk, P.M. 2018 .Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. Plant Science. 267: 102–111.

Ghorbanpour, M., Hatami. M. 2014. Biopriming of *Salvia officinalis* seed with growth promoting rhizobacteria affects invigoration and germination indices. Journal of Biological and Environmental Sciences. 8(22): 29-36.

Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W.J. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. Frontiers in Plant Science. 10: 845.

Lin, W., Lin, M., Zhou, H., Wu, H., Li, Z., Lin, W., 2019. The effects of chemical and organic fertilizer usage on rhizosphere soil in tea orchards. PLoS One 14: e0217018

Liu, W., Yang, C., Shi, S., Shu, W., 2014. Effects of plant growth-promoting bacteria isolated from copper tailings on plants in sterilized and non-sterilized tailings. Chemosphere. 97: 47–53.

Öztürk, M., Duru, M. E., Ince, B., Harmandar, M., and Topçu, G. (2010). A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts. Food Chemistry. 123(4): 1352-1356.

Pagnani, G., Pellegrini, M., Galieni, A., D'Egidio, S., Matteucci, F., Ricci, A., Stagnari, F., Sergia, M., Lo Sterzoa, C., Pisantea, M., Del Gallo, M., 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in *Cannabis sativa* 'Finola' cultivation: an alternative fertilization strategy to improve plant growth and quality characteristics. Industrial crops and products. 123: 75–83.

Papoti, V. T., Totomis. N, Atmatzidou. A, Zinoviadou. K, Androulaki. A, Petridis. D and Ritzoulis. C .2019. Phytochemical content of *Melissa officinalis* L. herbal preparations appropriate for consumption. Processes. 7(2): 88.

Prashar, P., Shah, S., 2016. Impact of fertilizers and pesticides on soil microflora in agriculture. Sustainable Agriculture Reviews. 19: 331-361.

Riahi, L., Cherif. H., Miladi, S., Neifar, M., Bejaoui, B., Chouchane, H., Masmoudi, A.S., Cherif, A .2020. Use of plant growth promoting bacteria as an efficient biotechnological tool to enhance the biomass and secondary metabolites production of the industrial crop *Pelargonium graveolens* L'Hér. under semi-controlled conditions. Industrial Crops and Products. 154: 112721.

Tennakoon, P.L.K., Rajapaksha, R.M.C.P., Hettiarachchi, L.S.K., 2019. Tea yield maintained in PGPR inoculated field plants despite significant reduction in fertilizer application. Rhizosphere. 10: 100146.

Wang, Y., Zhu, Y., Zhang, S., Wang, Y., 2018. What could promote farmers to replace chemical fertilizers with organic fertilizers? Journal of Cleaner Production. 199: 882–890.

Effect of *Pseudomonas chlororaphis* bacteria on lemon balm growth and rosmarinic acid content under controlled conditions

M. Hosseini Abasabadi[1], M. Dahajipour Heidarabadi[1*], R. Saberi riseh[2]

[1] Department of Genetics and Plant Production, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

[2] Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

Abstract

In regard to growth promoting bacteria role in plant performance, in this research, the effect of different populations of *Pseudomonas chlororaphis* bacteria on growth of lemon balm was investigated *in vitro*. For this purpose, an experiment using different populations of bacteria (0 as a control, 10^8, 10^9 and 10^{10} CFU/ml) was done in a completely randomized design with five replications. The results of this research showed the proper growth of lemon balm in environments containing bacteria. The number of leaves and nodes in the plants grown in the presence of bacteria decreased compared with the control plants. However, the length of the longest and the shortest internode was not affected by the addition of bacteria to the lemon balm culture medium. Also, rosmarinic acid content increased in plants grown in bacteria medium compared with the control plants by 23%. According to the results of this research, the use of growth promoting bacteria plays an important role in the production of secondary metabolites in lemon balm medicinal plants.

Keywords: Bio-elicitor, Lemon balm, *Pseudomonas chlororaphis*, Rosmarinic acid

* m.dahaji@vru.ac.ir

تاثیر اسانس روغنی (*Origanum vulgare* L.) بر فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز

مریم مهاجرانی*، حورا ایزدی کاهکش

گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

چکیده

آنزیم های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز از آنزیم های کلیدی به شمار می آیند که مهار آنها در درمان بیماری دیابت نقش بسزایی دارد. استفاده از منابع طبیعی به عنوان مهار کننده برای این دو آنزیم، به علت وجود عوارض جانبی کمتر نسبت به مهار کننده های شیمیایی، از اهداف جدید به شمار می آید. گیاهان متعلق به تیره نعنائیان از مهمترین تیره های دارای اسانس شناخته شده اند که بررسی های متعددی بر روی پتانسیل عملکرد ضد دیابتی آنها انجام شده است. در این مطالعه آنزیم آلفا گلوکوزیداز پس از هموژنیزاسیون و سانتریفیوژ از غدد گوارشی حلزون قهوه ای مرکبات استخراج شده و مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز با سوبسترای پارانیتروفنیل آلفا-دی-گلوکوپیرانوزید مطالعه شد. اسانس گیری مرزنگوش (*Origanum vulgare* L.) به روش کلونجر انجام شد و فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز در مجاورت مقادیر مختلف اسانس استخراج شده اندازه گیری شد. میزان پروتئین موجود در عصاره آنزیمی استخراج شده ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر به دست آورده شد. همچنین مقادیر Km و Vmax برای آلفا گلوکوزیداز به ترتیب ۱/۵ میلی مولار و ۰/۰۲۸ میلی مولار بر دقیقه محاسبه شد. اسانس مرزنگوش با کاهش مقدار جذب موجب مهارآنزیم شد. برای آنزیم آلفا گلوکوزیداز IC_{50} برای این گیاه ۱/۶۶۸ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آورده شد. نتایج بدست آمده نشان داد که اسانس اندام هوایی مرزنگوش می تواند به عنوان منبع طبیعی، کم هزینه و دردسترس برای تولید مهار کننده هایی با عوارض جانبی بسیار پایین در درمان دیابت مورد پیشنهاد قرار گیرند.

واژگان کلیدی: اسانس روغنی، آلفا گلوکوزیداز، گیاهان دارویی، مرزنگوش

* * Email: m.mohajerani@umz.ac.ir

۱.مقدمه

گیاه مرزنگوش از خانواده ی نعنائیان گیاهی علفی وچند ساله و خود رو در ایران است و در نواحی شمال و شمال غرب می روید و به نام های مرزنگوش وحشی و پونه کوهی نیز شناخته میشود. این گیاه بر حسب آب و هوای مختلف عمر یک یا دو ساله دارد و گلهای کوچک آن به رنگ گلی یا سفید می باشد. اعضای هوایی مرزنگوش دارای بوی معطر و طعم پسندیده است. ساقه های این گیاه به صورت برافراشته بوده که در مراحل نهایی بلوغ گیاه به طول ۱/۵ متر می رسد. برگ های آن به صورت ساده و چسبیده به ساقه (بدون پایه) می باشد. پروفایل ترکیبات موثره اسانس روغنی این گیاه به طور عمده شامل کارواکرول، سیمن، گاما-ترپینن و تیمول است (یادگاری، ۲۰۱۵). این گیاه شامل مولکول هایی است که فعالیت زیستی بر روی فیزیولوژی حیوان و متابولیسم آن دارد(حاجی پور و همکاران، ۱۳۹۴) مطالعات متعددی توصیف کرده اند که اسانس روغنی بدست آمده از این گیاه فعالیت های بیولوژیکی گسترده ای از قبیل ضد قارچ، ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد دیابتی، حشره کش و سمیت سلولی را نشان می دهد(Ibáñez and Blázquez, 2017).

اسانس ها ترکیبات معطری می باشند که در سلول های گیاهی ویژه، غده ها، کرک های ترشحی و مجاری روغنی و رزینی نگهداری شده و در بخشی از گیاه یا تراوش های آن وجود دارند. این روغن ها مسئول رایحه ی مشخص مربوط به گونه های گیاهی می باشند. از آنجایی که اسانس ها تحت تاثیر گرما تبخیر می شوند، روغن های فرار نیز نامیده می شوند(مهاجرانی و توکلی،۱۳۹۴). اسانسها جزء متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی هستند. ترکیبات فعال دارویی در گیاهان شامل آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، صمغ‌ها، ترپنوئیدها و غیره می‌باشند. اسانس‌ها در بسیاری از گیاهان وجود دارند که از مهمترین تیره‌های دارای اسانس می‌توان به تیره‌های نعنائیان، چتریان، کاج، برگ بو و بعضی از گیاهان خانواده روزاسه، کاسنی و غیره اشاره کرد (زرگری،۱۳۷۰). مهمترین اجزای فعال اسانس‌های گیاهی شامل ترپنوئیدها (مونوترپنوئیدها و سزکویی ترپنوئیدها) و فنیل پروپانوئیدها هستند که در موارد زیادی در پزشکی کاربرد دارند (Machado et al., 2011). اسانس های روغنی که به طور کلی از افزودنی های خوراکی ایمن شناخته می شوند به عنوان جایگزینی ایمن برای آنتی بیوتیک ها پیشنهاد شده اند. اسانس های روغنی، متابولیت های ثانویه گیاهی شامل ترکیبات معطر و فراری هستند که از طریق تقطیر با بخار آب از برخی گیاهان بدست می آیند (چاشنی دل و شهابی، ۲۰۱۴). موارد مصرف اسانس ها در صنعت داروسازی عبارتند از: ضد حساسیت های پوستی، ضد حساسیت های موضعی، آنتی هیستامین ها، خلط آور ها، ضد ویروس، ضد باکتری، ضد عفونی کننده ها، ضد کرم ها، ضد میکروب ها و دیوریتیک ها (زارع زاده و همکاران، ۱۳۹۳). تقطیر با بخار و بخار/آب از پرکاربرد ترین روش های استخراج اسانس ها می باشد. روش های دیگر شامل استخراج با حلال، فشار سرد، دم کردن، افلورج و تقطیر با آب می باشد. تقطیر روشی است که تبخیر و سپس تراکم را شامل شامل میشود تا در عوض اسانس های خالص و غلیظ را تولید کند. اسانس های با کیفیت بالا تنها یک بار تقطیر می شوند، در حالی که برخی اسانس های تجاری با دو یا سه بار تقطیر خالص می شوند.

آلفا گلوکوزیداز ها اگزوکربوهیدراز هایی هستند که می توانند تجزیه دنباله های آلفا گلوکوزیل را از انتهای غیر احیا کننده ی سوبسترا کاتالیز کنند و باعث آزاد سازی آلفا گلوکز شوند، همچنین می توانند واکنش های ترانس گلیکوزیلاسیون را برای سنتز اجزا آلفا گلیکوزیله شده کاتالیز کنند (Kato et al., 2002). این آنزیم بر اساس ساختار اولیه و مشخصات سوبسترای خود به ترتیب به دو خانواده آلفا گلوکوزیداز I و II و سه نوع I ، II و III تقسیم می شود (Soro et al., 2007). دو خانواده اصلی آلفا گلوکوزیداز ها شامل آنزیم های معکوس کننده که پیوند های گلیکوزیدی را با وارونه سازی ساختار اصلی هیدرولیز می کنند و آنزیم های نگهدارنده که هیدرولیز را با حفظ ساختار اصلی آنومر انجام می دهند، می باشند. این نتایج مختلف، مکانیسم های کاتالیزوری کاملا متفاوتی را می طلبد (Withers and Aebersold,1995). عملکرد اختصاصی آلفا گلوکوزیداز ها در رابطه با سوبسترا بسته به منبع آنزیم ها بسیار متفاوت است. با توجه به عملکرد اختصاصی، گلوکوزیداز ها به سه نوع تقسیم می شوند: آنزیم های نوع اول سوبسترا های ناهمگن مانند ساکارز و پارانیتروفنیل آلفا-دی-گلوکوپیرانوزید را به سوبسترا های همگن مانند مالتوالیگوساکارید ها ترجیح می دهند در حالی که آنزیم های نوع دوم سوبسترا های همگن را به سوبسترا های ناهمگن ترجیح می دهند. آنزیم های نوع سوم همانند آنزیم های نوع دو، سوبسترا های همگن را ترجیح می دهند اما دارای فعالیت بالایی نسبت به سوبسترا های زنجیره بلند می باشند(Shen et al., 2015).

مهار کننده های آلفا گلوکوزیداز، یک گروه منحصر به فرد از دارو های ضد دیابت هستند و از روش های درمانی برای دیابت نوع II به شمار می آیند. این دارو های خوراکی که از باکتری گرفته شده اند باز دارنده های آنزیمی هستند که مکانیسم عملکرد پانکراس- محور ندارند. این مهار کننده های برگشت پذیر جذب کربوهیدرات های پیچیده را به تاخیر می اندازند و در نتیجه هیپرگلیسمی پس از غذا را کنترل می کنند. در حال حاضر مهار کننده های پر مصرف برای آلفا گلوکوزیداز شامل آکاربوز، میگلیتول و وگلیبوز می باشند که از بین این مهار کننده ها آکاربوز بیشترین داروی تجویز شده می باشد (Laar et al., 2005). آکاربوز و وگلیبوز از طریق روده جذب نمی شوند و از نظر زیست پذیری ضعیف هستند، برعکس میگلیتول تقریبا به طور کامل از قسمت بالایی روده جذب می شود. همچنین آکاربوز و وگلیبوز از طریق مدفوع دفع می شوند در حالیکه میگلیتول از طریق کلیه دفع می شود. مطالعاتی که بر روی دیابت نوع ۱ انجام شده نشان داده است که آکاربوز در ترکیب با مداخلات غذایی و انسولین درمانی، می تواند یک روش مدیریتی مفید باشد که منجر به کاهش نوسانات گلوکز پس از غذا در دیابت نوع ۱ می شود (Kalra, 2014).

رویکردهای درمانی جدید در حال بررسی است تا سطح گلوکز بعد از غذا را به دلیل عوارض جانبی شدید داروهای ضد دیابت موجود در بازار تنظیم کند. داروهایی که برای درمان و کنترل دیابت استفاده می شود، مانند انسولین، بی گوانید، مهار کننده های آلدوز ردوکتاز، فاکتور رشد شبه انسولین، دارای اثرات جانبی مانند افزایش وزن و مشکلات گوارشی نیز هستند (Sales, 2012; Kim, 2011). آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز آنزیم های کلیدی در سیستم گوارش می باشند که باعث هیدرولیز کربوهیدرات های رژیم غذایی و تولید گلوکز قابل جذب در بدن می شوند ((Pantidos, 2014). در مطالعه روش های درمان برخی اختلالات مربوط به جذب کربوهیدرات

ها که منجر به بیماری هایی مانند دیابت، چاقی و پوسیدگی دندان می گردند مهار آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز یک استراتژی مهم محسوب می گردد. یک هدف جدید برای درمان دیابت استفاده از منابع طبیعی به عنوان مهارکننده ی آنزیم های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز می باشد زیرا در این روش عوارض جانبی کمتری مشاهده خواهد شد (Sales, 2012).

۲.مواد و روش ها

۲،۱.جمع آوری نمونه گیاهی

اندام های هوایی از گیاه مرزنگوش در منطقه شمال کشور از استان مازندران و اطراف شهرستان بابلسر در فصل بهار جمع آوری شدند و سپس در دمای اتاق و دور از نور خورشید خشک و توسط دستگاه آسیاب خانگی پودر شد.

۲،۲. تهیه اسانس روغنی

برای تهیه اسانس روغنی از روش تقطیر با بخار آب (دستگاه کلونجر) استفاده شد. مقدار ۶۰ گرم از پودر گیاه مرزنگوش در بالن شیشه ای ریخته شد و ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. پس از افزودن آب مقطر به مدت ۲ تا ۳ ساعت حرارت داده شد. آب و اسانس روغنی در قسمت سرد کننده، سرد شده و در لوله انتهایی جمع آوری شد. عمل تقطیر ادامه داده شد تا هنگامی که حجم اسانس روغنی ثابت بماند. با باز کردن شیر پایین لوله آب معطر و سپس اسانس روغنی بدست آورده شد. در پایان این مدت، برای جداسازی و استخراج اسانس مقدار ۰/۵ میلی لیتر حلال هگزان اضافه شد. فاز غیر قطبی شامل اسانس با سر ریز کردن از بخش قطبی که آب می باشد، جدا شد. برای آبگیری از سولفات سدیم استفاده شد. برای تعیین بازده اسانس، شیشه مخصوص اسانس توزین شد. پس از ریختن اسانس در شیشه، وزن ظرف دوباره اندازه گیری شده و پس از کم کردن وزن ظرف خالی از پر مقدار اسانس بدست آمد. سپس اسانس بدست آمده در بطری های کوچک تیره داخل یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی گراد جهت آزمایشات بعدی نگهداری شد (Miyazawa, 1998) .

۳،۲.تعیین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس روغنی مرزنگوش به کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی

اسانس استخراج شده از گیاه در کم ترین مقدار ممکن از حلال متانول که به علت سبک تر بودن نسبت به اتانول مورد استفاده قرار گرفت ، حل شده و برای تعیین ترکیبات تشکیل دهنده به ستون دستگاه GC-Mass تزریق شد. برای جدا سازی از گاز حامل هلیوم با سرعت ml/min ۱ استفاده شد. برنامه ریزی حرارتی ستون بدین صورت انجام گرفت که در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد برای ۴ دقیقه ثابت باشد و سپس با سرعت °C/min ۷ به دمای°C ۱۵۰ برسد و دوباره با سرعت °C/min ۵ به دمای°C ۲۴۰ برسد و در این دما نیز به مدت ۱۰ دقیقه ثابت بماند. برای شناسایی ترکیبات، از مقایسه طیف جرمی آنها با طیف های موجود در داده های کتاب خانه ای NIST, Wiley استفاده شد (Miyazawa, 1998).

٤،٢. تهیه نمونه آنزیمی

برای استخراج آنزیم آلفا گلوکوزیداز از حلزون قهوه ای مرکبات از باغات مرکبات استان مازندران، شهرستان بابلسر جمع آوری شدند و به مدت سه روز در حالت ناشتا قرار گرفتند تا هضم خود را کامل کنند و از پوسته هایشان آزاد شوند. به منظور تشریح جانور پس از جدا کردن صدف آن به وسیله یک قیچی تیز، غده گوارشی که در انتهای قسمت مارپیچ بدن قرار گرفته است با چند شیار عمودی جدا گردید. غدد گوارشی با استفاده از دستگاه هموژنایزر و در دمای چهار درجه سانتی گراد همراه با آب مقطر سرد هموژن گردید سپس محلول هموژن شده با سرعت ۱۶۰۰۰ xg و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. بعد از این مرحله محلول رویی به عنوان منبع آنزیمی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

٥،٢.سنجش فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز

تعیین فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز بر اساس روش سیگنلر و لوو با اندکی تغییر در آن روش ها انجام شد. در این روش ابتدا ۱۵ میکرولیتر محلول آنزیمی با ۶۵ میکرولیتر بافر یونیورسال با pH ۶ مخلوط و ۲۰ میکرولیتر سوبسترا (pNαG[1]) با غلظت ۱۰ میلی مولار به آن اضافه گردید و ۱۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. واکنش در نمونه ها پس از هر ۳ دقیقه با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید ۱ نرمال متوقف گردید و جذب نمونه ها در دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد. تمامی آزمون ها در۳ تکرار انجام شد. برای تهیه شاهد از همه ی ترکیبات بدون آنزیم استفاده شد (Low, 1986).

$$\text{فعالیت آنزیم} = \frac{\text{ضریب رقت} \times \text{حجم کل} \times \text{تغییرات جذب}}{\text{طول عبور نور} \times \text{حجم آنزیم} \times \text{ضریب خاموشی}}$$

٦،٢.بررسی پارامتر های سینتیکی آلفا گلوکوزیداز

برای تعیین پارامتر های سینتیک آنزیم از روش بیسونگر با اندکی تغییرات استفاده شد. ابتدا غلظت های (۰/۲ ,۰/۴ ,۰/۶ , ۰/۸ ,۱) میلی مولار از سوبسترا (pNαG) تهیه شد. بافر با pH بهینه ۲ به ۱۵ میکرولیتر نمونه ی آنزیمی اضافه و در هرکدام از غلظت های ذکر شده ی سوبسترا در بازه های زمانی ۳تا ۱۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد انکوباسیون شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید اضافه شد تا واکنش متوقف شود. تغییرات جذب در هر غلظت در بازه های زمانی ۳ تا ۱۵ دقیقه در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. حجم نهایی در این تست ۲۰۰ میکرولیتر می باشد (Bisswanger, 2017).

٧،٢.بررسی اثر اسانس روغنی گیاه مرزنگوش بر آلفا گلوکوزیداز

[1] 4-Nitrophenyl α-D-glucopyranoside

ابتدا غلظت های مختلف اسانس روغنی با نسبت ۱ به ۵۰ در مخلوط ۱ به ۱۰ از اتانول و بافر فسفات رقیق شدند و در حجم های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میکرولیتر مرزنگوش بر روی آلفا گلوکوزیداز اثر داده شدند، هر حجم از اسانس با ۱۵ میکرولیتر آنزیم به مدت ۱۰ تا ۱۲ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد و سپس بافر و ۲۰ میکرولیتر سوبسترا pNαG به لوله آزمایش اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه انکوباسیون صورت گرفت و سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول سدیم هیدروکسید ۱ نرمال به هر لوله اضافه شد تا واکنش متوقف شود. جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. هر تست با ۳ تکرار انجام شد و جذب بلانک از جذب نمونه ها کسر شد. حجم نهایی در این تست ۲۰۰ میکرولیتر می باشد. درصد مهار آنزیم از طریق فرمول زیر در هر مرحله بدست آمد.

$$\text{درصد مهار} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}}$$

۸،۲. اثر مهارکنندگی آکاربوز بر فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز

مقدار ۵ میلی گرم آکاربوز در ۲ میلی لیتر حلال DMF حل شد و در پایان ۳ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید، مخلوط حاصل در حمام اولتراسونیک قرار داده شد تا کاملا حل گردید. برای مشاهده اثر بهتر بر روی آنزیم استوک نهایی با آب مقطر رقیق شده و به ۳۵ میلی لیتر رسید. جهت بررسی اثر آکاربوز از پنج حجم ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرولیتر استفاده و با سه مرتبه تکرار انجام شد. پس از افزودن ۱۵ میکرولیتر آنزیم، بافر به مقدار لازم و ۲۰ میکرولیتر سوبسترا (pNαG) تمامی نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از انکوباسیون ۱۰۰ میکرولیتر محلول سدیم هیدروکسید ۱ نرمال به هر نمونه اضافه شد تا واکنش متوقف شود. جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. هر تست با ۳ تکرار انجام شد و جذب بلانک از جذب نمونه ها کسر شد. حجم نهایی در این تست ۲۰۰ میکرولیتر می باشد. درصد مهار از طریق فرمول ذکر شده در بخش۷،۲ بدست آمد.

۹،۲.اثر اسانس روغنی گیاه مرزنگوش بر آنزیم آلفا گلوکوزیداز

مقدار ۶ میکرولیتر از استوک اسانس روغنی گیاه مرزنگوش برداشته و با ۱۵ میکرولیتر آنزیم آلفا آمیلاز به مدت ۵ دقیقه انکوبه و همانند روش۵،۲ غلظت های مختلف سوبسترا (pNαG) به این دو اضافه گردید و با بافر به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد، در هرکدام از غلظت های ذکر شده ی سوبسترا در بازه های زمانی ۳تا ۱۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد انکوباسیون شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید اضافه شد تا واکنش متوقف شود. تغییرات جذب در هر غلظت در بازه های زمانی ۳ تا ۱۵ دقیقه در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. حجم نهایی در این تست ۲۰۰ میکرولیتر می باشد.

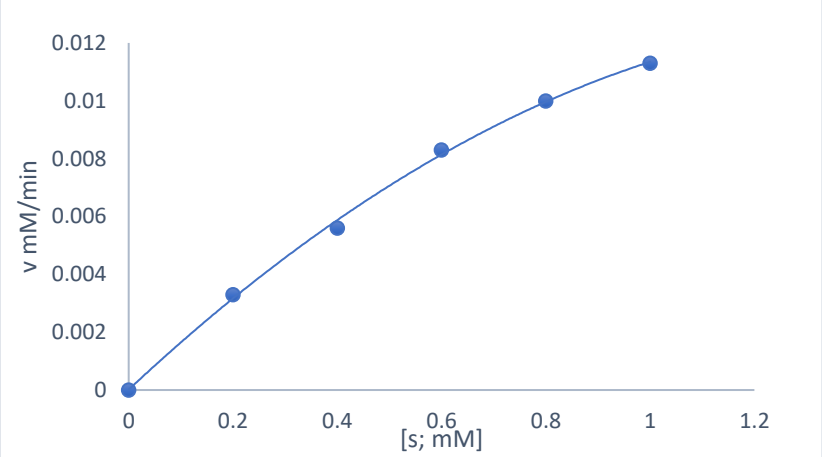
۳. نتایج

۱،۳.سنجش فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز

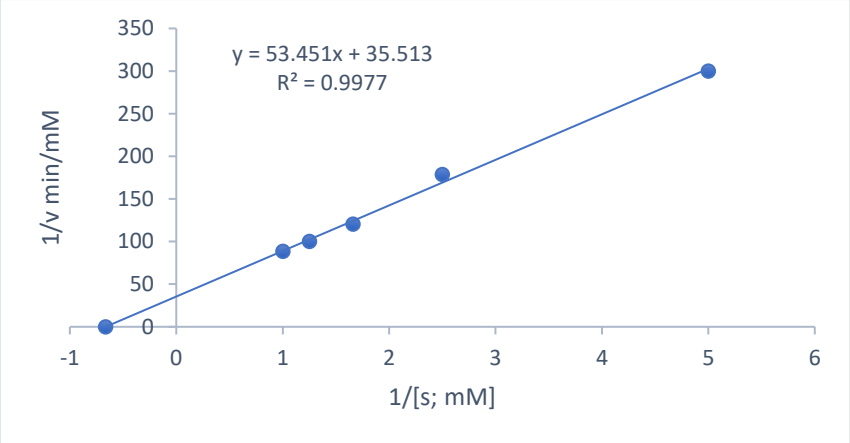
تعیین فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز بر اساس روش سیگنلر و لوو با اندکی تغییر در آن روش ها انجام شد. فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز در غلظت ثابت از سوبسترا (pNαG) طبق معادله ی زیر اندازه گیری شد و مقدار فعالیت آنزیم U/ml۰/۴ و فعالیت ویژه آن U/mg ۲ گزارش شد.

۲،۳. بررسی پارامتر های سینتیکی آنزیم آلفا گلوکوزیداز

درشکل ۱و۲ نمودار رفتار سینتیکی آنزیم آلفا گلوکوزیداز استخراج شده از حلزون قهوه ای را نشان می دهد. نمودار میکائیلیس منتن و لاینویور- برک بر اساس سرعت واکنش نسبت به تغییرات غلظت سوبسترا رسم گردید. مقدار Vmax برای آنزیم آلفا گلوکوزیداز برابر با ۰/۰۲۸ میلی مولار بر دقیقه و مقدار Km برای آلفا گلوکوزیداز ۱/۵ میلی مولار اندازه گیری شد.



شکل ۱: نمودار میکائیلس-منتن برای آنزیم آلفا گلوکوزیداز



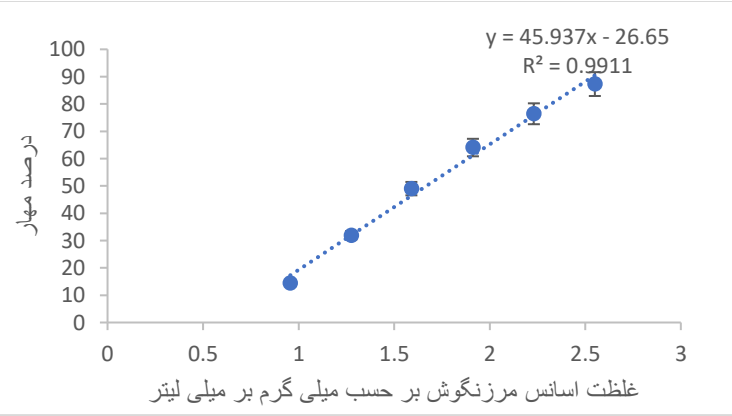
نشکل ۲ : نمودار لاینویور-برک آنزیم آلفا گلوکوزیداز. (S: پارانیتروفنیل آلفا-دی-گلوکوزید)

۳،۳.تعیین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس روغنی گیاهان به وسیله GC-Mass

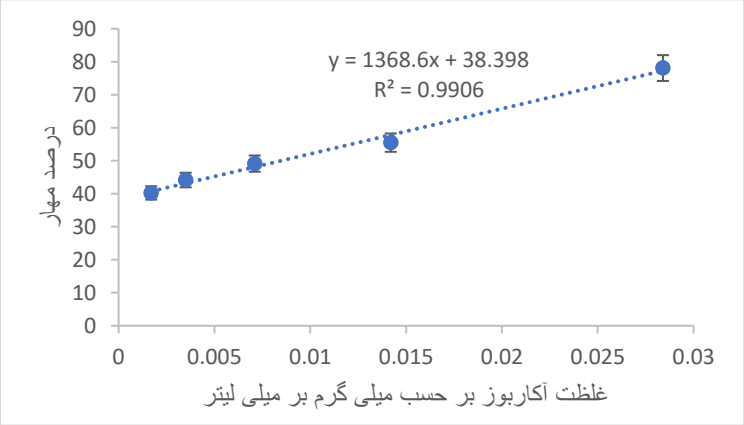
جدول ۱: ترکیبات شناسایی شده اسانس روغنی گیاه مرزنگوش

اسانس استخراج شده از اندام هوایی مرزنگوش در کم ترین مقدار ممکن از حلال متانول مورد استفاده قرار گرفت و برای تعیین ترکیبات تشکیل دهنده به ستون دستگاه GC-Mass تزریق شد. نتایج در جدول ۱ درج شده است.

شماره	ترکیب	R.T.	درصد
۱	Terpineol-4	۲۲/۲۸۴	۳۲/۹۷
۲	Gamma- terpinene	۱۹/۲۴	۱۸/۹۳
۳	Alpha- terpinene	۱۸/۱۶۴	۱۴/۶۹
٤	(+)-4-carene	۱۹/۹۹۹	۵/۹۴
۵	Alpha- terpineol	۲۲/۴۷۷	۴/۸۲
٦	Cis-beta-terpineol	۲۰/۱۹۱	۴/۱۳
۷	Beta-phellandrene	۱۸/۴۸۷	۲/۷۵
۸	Beta-thujene	۱۶/۹۶۳	۲/۲۹
۹	Carvacrol	۲۴/۸۵۹	۲/۱۶
۱۰	Thymol	۲۴/۹۴۱	۲/۱۲
۱۱	1R-alpha-pinene	۱۹/۴۰۳	۲/۰۶
۱۲	Caryophyllene	۲۸/۲۸۵	۱/۷۳
۱۳	Trans-para-2-menthen	۲۰/۷۸۲	۱/۶
١٤	Dihydrocarveol	۲۱/۲۱۶	۱/۲۵
۱۵	Linalyl anthranilate	۲۳/۷۳۴	۰/۸
١٦	Bicyclogermacrene	۲۹/۹۲۵	۰/۶۹
۱۷	Alpha-phellandrene	۱۷/۸۰۵	۰/۶۲
۱۸	Beta- myrcene	۱۷/۳۰۳	۰/۵۹
۱۹	(-)-spathulenol	۳۱/۶۳۳	۰/۵۷
۲۰	(z)-piperitol	۲۲/۸۵	۰/۵۳

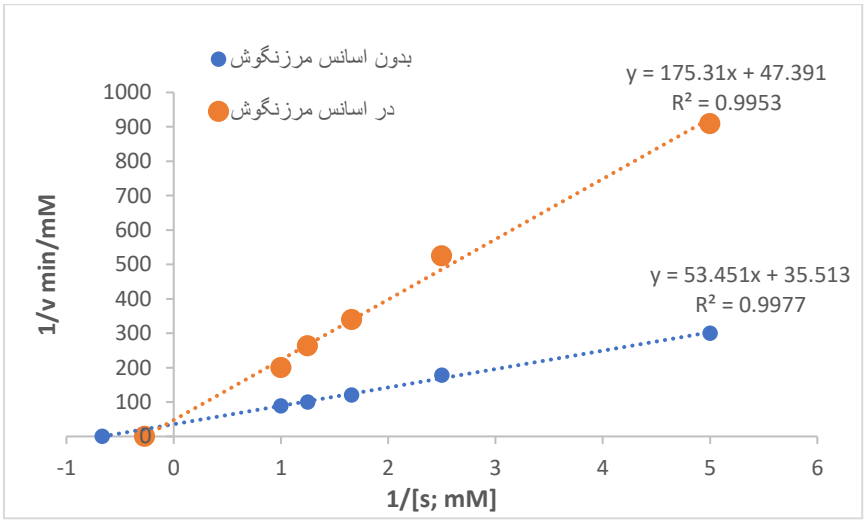


شکل ۳: درصد مهار آنزیم در غلظت های مختلف اسانس روغنی گیاه مرزنگوش.



شکل٤: درصد مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز در غلظت های مختلف آکاربوز.

با توجه به نمودار شکل ۳ و معادله خط نمودار ۴در شکل مقدار IC50 آلفا گلوکوزیداز در مجاورت آکاربوز در برابر با ۰/۰۰۸۴ میلی گرم بر میلی لیتر و برای اسانس مرزنگوش ۱/۶۶۸ میلی گرم بر میلی لیتر می باشد.



شکل ٥: نمودار لاین ویور- برک آنزیم آلفا گلوکوزیداز در حضور اسانس روغنی گیاه مرزنگوش.

با توجه به نمودارهای ۵ و با استفاده از معادله خط مقادیر Km و Vmax برای آنزیم بدون مهار کننده به ترتیب ۱/۵ و ۰/۰۲۸؛ آنزیم در حضور اسانس روغنی مرزنگوش ۳/۷ و ۰/۰۲۱ می باشد. بنابراین در رابطه با گیاه مرزنگوش افزایش مقدار Km و عدم تغییر در Vmax ($p>0.05$) نشان داد که مکانیسم مهار در مجاورت این اسانس از نوع رقابتی می باشد.

٤. بحث و نتیجه گیری

طبق مطالعات و آزمایشاتی که توسط مهدیه بی غم و همکاران بر روی حلزون قهوه ای مرکبات صورت گرفت بهینه فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز در pH های ۴و ۵ مشخص گردید و دمای بهینه برای آلفا گلوکوزیداز ۳۵ درجه سانتی گراد بدست آمد (بی غم و همکاران ۱۳۸۹). همچنین بررسی انجام شده بر روی *Limicolria Flammea* نشان داد که آنزیم آلفاگلوکوزیداز در این گونه حلزون دارای پایداری pH بین ۴ تا ۷/۵ و pH بهینه ۶/۵ می باشد و همچنین دمای بهینه این آنزیم استخراج شده از غده گوارشی حلزون ۴۵ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد و پایداری دمایی آن ۳۷ تا ۴۰ درجه سانتی گراد بود(Justin, 2013) . تاثیر دما بر فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز روده میانی حشرات نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. دمای بهینه این آنزیم برای روده میانی سن سبز پسته ۳۰ درجه سانتی گراد بدست آمد در حالی که در سن گندم فعالیت آلفا گلوکوزیداز در محدوده دمایی ۲۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد تخمین زده شد (Barker, 2004; Bisswanger, 2017). مقدار Km برای آلفا گلوکوزیداز در حشرات بسیار متنوع می باشد. این موضوع با توجه به نوع سوبسترا یک دامنه وسیع از Km را به نمایش در می آورد. مقدار Km برای آلفا گلوکوزیداز در سن گندم برابر با ۱۱/۲۲ میلی مولار و مقدار Vmax برابر با ۱/۸۴۴ میلی مولار بر دقیقه محاسبه گردید و همچنین مقادیر Km و Vmax در *B.germeri* برای آنزیم آلفا گلوکوزیداز به ترتیب برابر با ۲/۰۷۵ میلی مولار و ۰/۰۳۶۱ میلی مولار بر دقیقه بدست آمد (Kazzazi, 2007; Shirai et al., 2008). در خصوص پارامتر های سنتیکی آنزیم آلفا گلوکوزیداز در شیره گوارشی حلزون *Limicolria Flammea* مقدار Km و Vmax به ترتیب ۲/۱۷ میلی گرم بر میلی لیتر و ۰/۵۱ میلی گرم بر دقیقه گزارش شده است(Justin, 2013). در این پژوهش، اندازه گیری سرعت واکنش آنزیم آلفا گلوکوزیداز مقدار Km و Vmax برای آنزیم آلفا گلوکوزیداز به ترتیب ۱/۵ میلی مولار و ۰/۰۲۸ میلی مولار بر دقیقه و فعالیت آنزیم در غلظت ثابت از سوبسترا (۰/۴ U/ml و فعالیت ویژه آن U/mg ۲ بدست آورده شد. در سال ۲۰۱۷، مطالعات انجام شده بر روی گیاه آویشن نشان داد که این گیاه دارای اثر ضد قند خون و ضد چربی و بهبود عملکرد کلیه است که ممکن است در درمان دیابت و سایر عوارض مربوط به دیابت مفید باشد. اسانس *Thymus Vulgaris* یکی از روغنهای اسانسی است که بیشتر در صنایع غذایی و مواد آرایشی به عنوان مواد نگهدارنده و آنتی اکسیدان استفاده می شود (Dauqan and Abdullah, 2017). در سال ۲۰۱۸، اثر اسانس نعنای وحشی بر آنزیم های آمیلاز و گلوکوزیداز بررسی شد. ترکیبات اصلی شناسایی شده در اسانس این گیاه شامل: ۱و۸-سینئول ، لینالول ، منتون ، ترانس-پیپریتون اکسید ، پولگون و پیپریتنون اکسید هستند. مونوترپن‌های اکسیژنه عامل اصلی در مهار آنزیم ها می‌باشد. آنها خواص آنتی اکسیدانی و پتانسیل مهار برخی آنزیم های مهم در بیماری هایی از قبیل دیابت، آلزایمر و اختلالات پوستی را اندازه گیری کردند و نتیجه گیری نمودند که اسانس این گونه نعنا دارای ترکیبات با ارزش زیست فعال بوده و پتانسیل بالایی برای استفاده در

صنایع داروسازی، آرایشی و غذایی دارد (Asghari et al, 2018). تحقیقات انجام شده بر روی اسانس روغنی دو گیاه مرزنجوش و پونه کوهی نشان داد که هفتاد و هفت ترکیب با استفاده از طیف سنجی جرمی - کروماتوگرافی گازی شناسایی شدند که ۹۷/۳٪ و ۹۹/۴٪ از کل اسانس ها را متشکل می شدند. کارواکرول (۰/۰۷٪ ± ۶۰/۴۲) ، p-سیمن (۰/۰۲٪ ± ۱۵/۵۲) و گاما

ترپینن (۰/۰۲٪ ± ۵/۱۹) ترکیبات اصلی در اسانس روغنی گیاه پونه کوهی بودند ، در حالی که مقادیر زیادی ۱و۸-سینئول(۵۹/۵۹±۰/۸۵٪ ، ۴۹/۴۹±۰/۳۷٪) ، لینالول (۱۳/۰۵±۰/۰۴٪ , ۵/۶۶±۰/۰۱٪) و آلفا ترپینول (۳/۳۶±۰/۰۱٪ , ۵/۵۹±۰/۰۱٪) در اسانس روغنی گیاه مرزنجوش یافت شد (Ibáñez and Blázquez, 2017). در سال ۲۰۱۵ اسانس روغنی گیاه مرزنگوش از نظر فعالیت های آنتی اکسیدانی، خواص ضد میکروبی و مهار کنندگی در برابر استیل کولین استراز، تیروزیناز، آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز مورد بررسی قرار گرفت. تیمول و لینالول دو ترکیب اصلی در اسانس روغنی استخراج شده از این گونه شناخته شد و مشاهده شد که اسانس روغنی گیاه دارای خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی می باشد و همچنین مهار کننده ای قوی برای آنزیم های استیل کولین استراز، تیروزیناز، آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز می باشد (Sarikurkcu et al, 2015). تحقیقات دیگری در سال ۲۰۲۰ نشان داد که ۴۰ ترکیب در اسانس روغنی گیاه مرزنگوش قابل شناسایی می باشد. اسانس روغنی و عصاره متانولی استخراج شده از این گیاه همانند عصاره آبی و اتانولی پتانسیل بالایی برای تخریب جایگاه نشاسته در آنزیم آلفا آمیلاز را نشان دادند. علاوه بر این نتایج نشان دادند که نوع حلال استفاده شده در استخراج به شدت بر خواص آنتی اکسیدانی عصاره های بدست آمده تأثیر می گذارد (Béjaoui et al., 2013). نتایج بدست آمده نشان می دهد که در اسانس گیاه مرزنگوش ۲۰ ترکیب شیمیایی شناسایی شد که از فراوان ترین آنها می توان از ترکیب های ۴- ترپینئول ، گاما ترپینن و آلفا ترپینن نام برد که به ترتیب ۳۲/۹۷ ، ۱۸/۹۳ و ۱۴/۶۹ درصد از اسانش استخراج شده را تشکیل می دهند. فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز در حضور اسانس روغنی گیاه مرزنگوش بررسی شد و مهار آنزیم که با کاهش مقدار جذب همراه بود مورد سنجش قرار گرفت. IC_{50} آلفا گلوکوزیداز برای گیاه مرزنگوش ۱/۶۶۸ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. نتایج بدست آمده برای مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز مشخص کرد که اسانس گیاه مرزنگوش در غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر ۸۷ درصد فعالیت آلفا گلوکوزیداز را مهار کرد. از طرفی از آنجایی که در بیماری دیابت آنزیم آلفا گلوکوزیداز نقش بسزایی دارد، مهار این آنزیم توسط اسانس روغنی گیاه مرزنگوش برای آزمایش های بیشتر پیشنهاد می گردد. از طرفی با مطالعات و انجام تحقیقات بیشتر بر روی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس مرزنگوش و جداسازی آنها با کروماتوگرافی باکارآیی بالا می توان، مهار کننده های طبیعی به صورت انبوه تولید و جایگزین مهار کننده های شیمیایی گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه مازندران که حمایت های مالی این تحقیق را تقبل نمودند کمال تشکر را دارند.

منابع

بی غم، م.، حسینی نوه احمدآبادیان، و.، حسینی نوه، ف.، نوذری، ج. ۱۳۸۹ . بررسی فعالیت گلوکوزیدآزها و آلفا آمیلاز غده گوارشی حلزون قهوه ای مرکبات (Stylommatophora: Helicidae), *Caucasotachea lencoranea* . دانش گیاهپزشکی ایران ۴۱ (۲), ۲۷۱-۲۸۱.

چاشنی دل, ی.، شهابی،ح.۲۰۱۴. اثر روغن کانولا و اسانس پونه کوهی بر عملکرد، فراسنجه های خونی و خصوصیات شیمیایی لاشه بره‌های پرواری دالاق. پژوهش در نشخوارکنندگان, ۲(۱), ۳۳-۵۰.

حاجی پور ده‌بالایی، ش.، افشارمنش، م.، سامی، م.۱۳۹۴. تأثیر اسانس آویشن، پونه کوهی و مخلوط آن‌ها بر کیفیت گوشت بلدرچین در مقایسه با آنتی‌بیوتیک ویرجینیامایسین. بهداشت مواد غذایی, ۵(۴), ۴۵-۵۴.

زارع زاده، ع.، میرحسینی،ع.، میرزا، م.، عرب زاده، م.ر.۱۳۹۳. استخراج و تجزیه کمی و کیفی اسانس گونه های مختلف آویشن (Thymus spp) کشت شده در یزد. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۳۰ (۴)، ۶۴۹-۶۳۴.

زرگری، ع. ۱۳۷۰. گیاهان دارویی، جلدچهارم، انتشارات دانشگاه تهران.

مهاجرانی، م. و توکلی ر.۱۳۹۴. ترکیبات سازنده گیاهان دارویی(مقدمه ای بر شیمی و خواص درمانی گیاهان دارویی). انتشارات دانشگاه مازندران.

یادگاری، ش.، ملکی، م.، زمانی، پ.، دهقان بنادکی، م.۲۰۱۵. مطالعهٔ آزمایشگاهی تأثیرات اسانس روغنی پونهٔ کوهی (*Origanum vulgare*) در سطوح مختلف بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای، متان تولیدی و کنترل اسیدوز شکمبه‌ای القاشده. علوم دامی ایران, ۴۶(۳), ۲۳۵-۲۴۶.

Asghari, B., Zengin, G., Bahadori, M. B., Abbas-Mohammadi, M., Dinparast, L. 2018. Amylase, glucosidase, tyrosinase, and cholinesterases inhibitory, antioxidant effects, and GC-MS analysis of wild mint (*Mentha longifolia* var. calliantha) essential oil: A natural remedy. European Journal of Integrative Medicine, *22*, 44-49.

Barker, G. M. (Ed.). 2004. The biology of terrestrial molluscs. CABI ,pp1-24.

Béjaoui, A., Boulila, A., Boussaid, M. 2013. Chemical composition and biological activities of essential oils and solvent extracts of *Origanum vulgare* subsp. glandulosum Desf. from Tunisia. Journal of Medicinal Plants Research. 7(32), 2429-2435.

Bisswanger, H. 2017. Enzyme kinetics: principles and methods. John Wiley & Sons. pp 10-26.

Dauqan, E. M., Abdullah, A. 2017. Medicinal and functional values of thyme (*Thymus vulgaris* L.) herb. Journal of Applied Biology & Biotechnology. 5(2), 17-22.

Ibáñez, M. D., Blázquez, M. A. 2017. Herbicidal value of essential oils from oregano-like flavour species. Food and Agricultural Immunology. 28(6): 1168-1180.

Justin, S.S. 2014. Purification and physicochemical characterization of the α-glucosidase of the digestive juice of the snail *limicolria flammea* (Müller 1774). International Journal of Plant Animal Environmental Science. 4: 376-388.

Kalra, S. 2014. Alpha glucosidase inhibitors. The Journal of the Pakistan Medical Association. 64(4): 474.

Kato, N., Suyama, S., Shirokane, M., Kato, M., Kobayashi, T., Tsukagoshi, N. 2002. Novel α-glucosidase from *Aspergillus nidulans* with strong transglycosylation activity. Applied and environmental microbiology. 68(3): 1250-1256.

Kazzazi, M. 2007. Study of digestive amylase and glucosidase in Eurygaster integriceps (Hemiptera: Scutelleridae) and of alpha-amylase inhibitor in wheat dominant. Ph. D. dissertation. Faculty of Horticulture Science and Plant Protection, University of Tehran. pp 142. (In Farsi).

Kim, J. S., Hyun, T. K., Kim, M. J. 2011. The inhibitory effects of ethanol extracts from sorghum, foxtail millet and proso millet on α-glucosidase and α-amylase activities. Food Chemistry. 124(4): 1647-1651.

Low, N. H., Va Vong, K., Sporns, P. 1986. A new enzyme, β-glucosidase, in honey. Journal of Apicultural Research. 25(3): 178-181.

Machado, M., Dinis, A. M., Salgueiro, L., Custódio, J. B., Cavaleiro, C., Sousa, M. C. 2011. Anti-Giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. Experimental Parasitology. 127(4): 732-739.

Miyazawa, M., Watanabe, H., Umemoto, K., Kameoka, H. 1998. Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of Mentha species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46(9): 3431-3434.

Pantidos, N., Boath, A., Lund, V., Conner, S., McDougall, G. J. 2014. Phenolic-rich extracts from the edible seaweed, *ascophyllum nodosum*, inhibit α-amylase and α-glucosidase: Potential anti-hyperglycemic effects. Journal of Functional Foods. 10: 201-209.

Sales, P. M., Souza, P. M., Simeoni, L. A., Magalhães, P. O., Silveira, D. 2012. α-Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences. 15(1): 141-183.

Sarikurkcu, C., Zengin, G., Oskay, M., Uysal, S., Ceylan, R., Aktumsek, A. 2015. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. vulgare and subsp. hirtum) essential oils. Industrial Crops and Products. 70: 178-184.

Shen, X., Saburi, W., Gai, Z., Kato, K., Ojima-Kato, T., Yu, J., Yao, M. 2015. Structural analysis of the α-glucosidase HaG provides new insights into substrate specificity and catalytic mechanism. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 71(6): 1382-1391.

Shirai, T., Hung, V. S., Morinaka, K., Kobayashi, T., Ito, S. 2008. Crystal structure of GH13 α-glucosidase GSJ from one of the deepest sea bacteria. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 73(1): 126-133.

Soro, R. Y., Diopoh, J. K., Willemot, R. M., Combes, D. 2007. Enzymatic synthesis of polyglucosylfructosides from sucrose alone by a novel α-glucosidase isolated from the digestive juice of *Archachatina ventricosa* (Achatinideae). Enzyme and microbial technology. 42(1): 44-51.

Van de Laar, F.A., Lucassen, P.L., Akkermans, R.P., Van de Lisdonk, E.H., Rutten, G. E., Van Weel, C. 2005. Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus. Cochrane database of systematic reviews. 28(1): 154-163.

Withers, S. G., Aebersold, R. 1995. Approaches to labeling and identification of active site residues in glycosidases. Protein Science. 4(3): 361-372.

The effect of essential oil of *Origanum vulgare* L. on alpha glucosidase enzyme activity

Maryam Mohadjerani * and Hoora Izadi Kahkesh

Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Abstract

Alpha-amylase and alpha-glucosidase enzymes are key enzymes whose inhibition plays a significant role in the treatment of diabetes. The use of natural sources as inhibitors for these two enzymes is one of the new goals due to the presence of fewer side effects than chemical inhibitors. Plants belonging to the mint family are known as one of the most important families with essential oils, and many studies have been conducted on their anti-diabetic potential. In this study, after homogenization and centrifugation, alpha-glucosidase enzyme was extracted from the digestive glands of brown citrus snail and analyzed. Alpha glucosidase enzyme was studied with the substrate para-nitrophenyl alpha-di-glucopyranoside. Essential oil extraction of *Origanum vulgare* L. was done by Clevenger's method and the activity of alpha-glucosidase enzyme was measured in the presence of essential oil. The amount of protein in the extracted enzyme extract was 0.2 mg/ml. Also, Km and Vmax values for alpha-glucosidase were calculated as 1.5 mM and 0.028 mM/min, respectively. Marjoram essential oil inhibited the enzyme by reducing the amount of absorption. For alpha-glucosidase enzyme, IC50 for the essential oil was 1.668 mg/ml. The obtained results showed that the essential oil of marjoram aerial parts can be proposed as a natural, low-cost and available source for the production of inhibitors with very low side effects in the treatment of diabetes.

Keywords: alpha glucosidase, medicinal plants, *Origanum vulgare* L., essential oil

*Email: m.mohajerani@umz.ac.ir

تاثیر آلکالوئیدهای *Nerium oleander* L. بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز گاو در شرایط *in vitro*

مریم مهاجرانی[1*] و یگانه صادقی[2]

[1و2] گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

چکیده

گیاهان دارویی منبع غنی از متابولیت های ثانویه هستندکه از مهم ترین این ترکیبات می توان آلکالوئید ها را نام برد. آلکالوئیدها تاثیرات قابل توجهی روی سیستم اعصاب انسان دارند. متابولیت های ثانویه ای مانند مورفین، کدئین و بتائین از طریق مهارآنزیم استیل کولین استراز(AchE) و افزایش سطح پیام رسان عصبی استیل کولین در مغز به بهبودی آلزایمر و یا بیماری های دیگر کمک می کنند. گالانتامین ، آلکالوئیدی مشتق شده ازخانواده نرگسیان به عنوان داروی مهارکننده استیل کولین استراز مورد استفاده قرار میگیرد. خرزهره *Nerium oleander* L. گیاهی است چند ساله، پرشاخه و سمی از راسته گل سپاسی سانان و تیره خرزهرگان که به صورت بوته ای یا درختچه ای می روید. در مطالعات اخیر اثرهای درمانی این گیاه همچون اثرهای ضد سرطانی، ضد التهاب، ضد درد، تعدیل کنندگی سیستم ایمنی و هم چنین اثر روی مراحل اسپرماتوژنز مشاهده شده است. در این پژوهش آنزیم استیل کولین استراز از مغزتازه گاو با استفاده ازهموژنیزاسیون، سانتریفیوژ،رسوبدهی با آمونیم سولفات و دیالیزدر دمای ۴ درجه سانتیگراد به صورت نسبی جداسازی شد. تاثیر عصاره غنی آلکالوئیدی برگ گیاه خرزهره در غلظت های مختلف بر فعالیت استیل کولین استراز اندازه گیری شد. مقادیر Km وVmax آنزیم اندازه گیری شد. این عصاره آلکالوئیدی در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر ۵۳/۵ درصد مهارکنندگی از نوع نارقابتی نشان داد. لذا جداسازی و خالص سازی اجزای فعال عصاره آلکالوئیدی گیاه خرزهره و مطالعه اثر آنها بر آنزیم استیل کولین استراز برای مطالعات آینده پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: آلکالوئیدها، گیاه خرزهره، آنزیم استیل کولین استراز، مهارکننده ها.

E-mail: m.mohajerani@umz.ac.ir

۱. مقدمه

بیماری آلزایمر یکی از شایع‌ترین بیماری های تحلیل برنده اعصاب در سنین پیری می‌باشد که با اختلالات پیشرونده عصبی غیر قابل‌برگشت همراه می‌باشد. این بیماری با زوال عقلی و از دست دادن عملکرد ادراکی مثل حافظه، مهارت های ارتباطی، قضاوت و منطق نمود پیدا می کند (Stuchbury, 2005). میزان شیوع این بیماری با افزایش سن افزایش می یابد، بطوریکه میزان شیوع آن در سنین ۷۰ تا ۸۰ سال، ۶درصد ودر سنین ۸۰ تا۸۵ سال، ۱۲ درصد و در سنین بالای ۸۵ سال حدود ۲۵ درصد است (Maczurek, 2008). بیماری آلزایمر یک بیماری چند جانبه می باشد که هم فاکتورهای ژنتیکی و هم فاکتورهای محیطی در بروز بیماری نقش دارند (Sugimoto et al.,2000). یکی از مهمترین علل آن اختلالات ادراکی، نقایص شناختی و زوال عقلی در اثر فقدان یا کاهش ناقل عصبی استیل‌کولین در قشر مغز و هیپوکامپ است. بنابراین یکی از راهکارهای اساسی در درمان آلزایمر تقویت سیستم عصبی کولینرژیک است. استفاده از پیش‌سازهای استیل‌کولین مثل کولین، استفاده از آزادکننده‌های استیل‌کولین مثل ۴-آمینوپیریدین، افزایش بازجذب استیل‌کولین با فعال کردن گیرنده‌های کولینرژیک (موسکارینی یا نیکوتینی) توسط آگونیست های گیرنده کولینرژیک و اخیراً جلوگیری از تجزیه و تخریب استیل‌کولین با مهار استیل‌کولین‌استراز استراتژی‌های مختلف مورد توجه محققین می باشند. مهارکننده‌های آنزیم استیل‌کولین‌استراز از مهمترین ترکیباتی هستند که در درمان علایم ادراکی و شناختی بیماری آلزایمر تایید شده اند. تاکنون ۴ دارو از آنها برای بهبود علایم ملایم تا متوسط بیماری آلزایمر تایید شده اند که شامل تاکرین (آمینوآکریدین)، ریواستیگمین (کاربامات)، گالانتامین (آلکالوئید گیاهی) و دونپزیل (بنزیل پیپریدین) می باشند (Liston et al., 2000). فیزوستیگمین و گالانتامین دو ترکیب با ساختار آلکالوئیدی هستند که از گیاهان جداسازی شده اند. فیزوستیگمین، تاکرین، گالانتامین و ریواستیگمین از مهارکننده‌های قدیمی آنزیم استیل‌کولین‌استراز می‌باشند، ولی کاربرد بالینی آنها به خاطر عوارض جانبی محدود شده است. اخیراً دونپزیل و مشتقات آن بعنوان کلاس جدیدی از مهارکننده‌های آنزیم استیل‌کولین‌استراز در درمان بیماری آلزایمر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که انتخابی‌تر و دارای اثرات طولانی‌تری می‌باشند و عوارض سیستمیک کمتری دارند(Sugimoto, et al.,2000). گزارش هایی در مورد استخراج و خالص سازی این آنزیم بیشتر از گلبول های قرمز خون، کبد و مغز جاندارانی از جمله مارماهی، موش، خرگوش و گوسفند انجام شده است. در این مطالعات اثرگذاری ترکیبات و داروهای مختلف بر فعالیت آنزیم مورد مطالعه قرار گرفته است. لذا در زمینه استخراج کولین استراز از قشر مغز گاو و بررسی اثر بازدارندگی و یا فعال کنندگی عصاره ها ی گیاهی بر روی آن مطالعات محدودتری در منابع یافت می گردد.

اثرات جانبی جدی ایجاد شده توسط داروهای دارای مجوز که برای درمان آلزایمر بکار رفته اند، محققان را ملزم به بررسی مهارکننده های استیل کولین استراز از منابع طبیعی کرده است.گیاهان متعدد و ترکیبات آنها در شیوه های طب سنتی وجود دارند که منجر به بهبود عملکرد شناختی و کاهش سایر علائم AD از جمله افسردگی می شوند (Talic, 2014).

اثرگذاری چند خانواده گیاهی مختلف بر فعالیت استیل کولین استراز جداسازی شده از مارماهی الکتریکی، با روش اسپکتوفتومتری المن مورد مطالعه قرار گرفت. عصاره گیاهان از خانواده های Asteraceae, Euphorbiaceae, Melastomataceae, Rubiaceae, Solanaceae تهیه شد که بیشترین اثرگذاری مربوط به عصاره Solanum و Witheringia بوده است (Nino et al., 2006).

آلکالوئیدها قادر به جلوگیری از شروع بیماری های مختلف از طریق تخلیه رادیکال آزاد یا اتصال به کاتالیزور واکنش اکسیداتیو هستند.آلکالوئیدها توسط انواع زیادی از ارگانیسم ها تولید می شوند که شامل باکتریها،قارچ ها،گیاهان و حیوانات می باشد.در حال حاضر ۵۵۰۰ آلکالوئید شناخته شده است.بسیاری از آلکالوئیدها چند صد سال در پزشکی مورد استفاده قرار گرفتند.مردم باستان عصاره های گیاهی حاوی آلکالوئیدها را برا درمان بسیاری از بیماری ها از جمله مارگزیدگی،تب و جنون استفاده می کردند.به طور کلی آلکالوئیدها بسیار سمی هستند هر چند که در مقادیر کم اثر درمانی دارند.آلکالوئیدها گیاه را در برابر میکروارگانیسم ها،حشرات و سایر گیاهان مقاوم می کنند و به همین دلیل از آن ها برای اهداف دارویی استفاده می شود.آلکالوئیدها طعم تلخ دارند و اغلب بی رنگ،کریستالی یا مایع در دمای اتاق هستند مثل کوینین که یکی از مواد تلخ مزه شناخته شده است. آلکالوئید گیاهی خالص و مشتقات مصنوعی آن به عنوان داروهای اساسی در سراسر جهان برای اثرات ضددرد،ضداسپاسم و ضدباکتریایی استفاده می شود.در انسان اکثر آلکالوئیدها بر سیستم عصبی تاثیر می گذارد به ویژه بر انتقال دهنده های شیمیایی مثل استیل کولین،اپی نفرین،نور اپی نفرین،گاما آمینو بوتریک اسید،دوپامین و سروتونین. بعضی از آلکالوئیدها هم به دلیل خواص آنتی بیوتیکی به عنوان ضدعفونی کننده مورد استفاده قرار می گیرند(Roy, 2017). خرزهره درختچه‌ای همیشه سبز حاوی شیره چسبنده و آدامس مانند می‌باشد. این گیاه که بومی مناطق مدیترانه‌ای است، به عنوان گیاه زینتی در بسیاری از نقاط دنیا می‌روید و برگ‌های آن سبز تیره با قوامی چرم مانند و رگبرگ‌های واضح، باریک، نیزه‌ای، کشیده، به طول ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متر می‌باشند. تمام قسمت‌های گیاه سمی بوده و حاوی گلیکوزیدهای قلبی[1] می‌باشد. عصاره برگ این گیاه برای کاهش ورم، درمان گال و هم‌چنین برای افرادی که بیماری‌های تنفسی دارند مؤثر است. در مطالعات اخیر اثرهای درمانی این گیاه هم چون اثرهای ضد سرطانی، ضد التهاب، ضد درد، تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی و هم‌چنین اثر روی مراحل اسپرماتوژنز مشاهده شده است (Mokri, et al. 2018).امروزه محققین زیادی به دنبال یافتن عصاره‌ها و آلکالوئیدهای جدیدی از منابع گیاهی مختلف می‌باشند که علاوه بر داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی به عنوان مهارکننده‌های آنزیم استیل کولین استراز در بهبود بیماری‌هایی نظیر آلزایمر مؤثر قرار گیرند، لذا در این پژوهش هدف جداسازی عصاره آلکالوئیدی گیاه خرزهره و اندازه گیری اثر این عصاره غنی آلکالوئیدی بر آنزیم استیل کولین استراز جداسازی شده از مغز تازه گاو درنظر گرفته شده است.

۲. مواد و روش‌ها

[1] Cardiac glycoside

۱.۲. تهیه عصاره غنی آلکالوئیدی از گیاه خرزهره

در این پژوهش برگ گیاه خرزهره در تیر ماه از درختان سالم جمع‌آوری شده و پس از شستشو با آب و آب مقطر به منظور پاک‌سازی از هر گونه آلودگی در دمای اتاق و به دور از نور خورشید خشک شدند. برگ‌های خشک شده به وسیله آسیاب برقی معمولی پودر شده و در فریزر نگه‌داری شدند. ۲گرم از پودر گیاه در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر روی شیکر افقی قرار داده شد. پس از گذشت دو ساعت و نیم مخلوط گیاه و آب مقطر را از کاغذ صافی عبور داده و ته مانده‌ی گیاه روی کاغذ صافی، با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده شد. سپس به محلول صاف شده به مقدار خیلی کم و به صورت قطره قطره سولفوریک اسید ۲ درصد اضافه شد تا pH آن به ۳ تا ۴ برسد. در مرحله بعد، به محلول اسیدی حاصل، ۳ میلی‌لیتر معرف مایر اضافه شد. سپس ۴ تا ۵ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۵ درصد اضافه شد به این محلول در قیف دکانتور ۱۵ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه شد. سپس فاز کلروفرمی را با باز کردن شیر دکانتور خارج کرده و به باقی‌مانده محلول به طور مجدد ۱۵ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه شد و دوباره فاز کلروفرمی جدا شد؛ این عمل تا ۵ بار تکرار شد. پس از جداسازی کامل فاز کلروفرمی، به طور مجدد قیف را شسته و فاز کلروفرمی را درون آن ریخته و به آن ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد تا فاز کلروفرمی شسته شود. سپس با استفاده از کاغذ pH متر، pH آن تعیین شد. pH باید خنثی باشد و در غیر این صورت شستشو تکرار می‌شود. فاز کلروفرمی را در یک ارلن مایر ریخته و به آن نمک سولفات سدیم اضافه شد تا آبگیری کامل شود. در مرحله بعد محلول را از کاغذ صافی عبور داده و اجازه داده شد تا کلروفرم خارج شود؛ رسوب باقی‌مانده مجموعه‌ای از آلکالوئیدها را در بر می گیرد.

۲.۲. استخراج آنزیم استیل کولین استراز

مغز تازه گاو (۲۸۰ گرم) با ۶۰۰ میلی‌لیتر بافر ۳۰ میلی مولار سدیم فسفات، در pH=۷ با سرعت ۳۴۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه به‌وسیله دستگاه هموژنایزر هموژن گردید. سپس محلول توسط صافی فیلتر شد و به‌وسیله دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۷۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ محلول رویی جمع‌آوری و رسوب دور ریخته شد. به محلول رویی آمونیم سولفات تا ۳۰ درصد اشباع اضافه شد. سپس ۲۴ ساعت در یخچال نگه‌داری شد. بعد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۷۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به آرامی خارج و تعیین حجم شد؛ و رسوب حاصل از سانتریفیوژ در کمترین حجم ممکن از بافر سدیم فسفات ۳۰ میلی مولار با pH=۷ سوسپانسیون گردید. سپس به ازای هر لیتر از محلول رویی مرحله قبل، مقدار ۲۴۹ گرم سولفات آمونیوم اضافه شد تا به ۷۰ درصد اشباعی برسد و آنزیم رسوب دهد و محلول به مدت ۴۸ ساعت در یخچال نگه‌داری شد بعد به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۷۵۰۰ سانتریفیوژ شد. در نهایت محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل از سانتریفیوژ در کمترین حجم ممکن از بافر سدیم فسفات ۳۰ میلی مولار با pH=۷ سوسپانسیون گردید. رسوب‌های حاوی آنزیم به کیسه دیالیز منتقل شدند و به مدت ۴۸ ساعت در بافر سدیم فسفات ۳۰ میلی مولار باpH=۷ در یخچال قرار گرفت. در طول این مدت بافر ۲ بار تعویض شد و در نهایت سوسپانسیون آنزیمی از کیسه خارج شده و به میکروتیوپ منتقل شد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد (Silman and Sussman, 2005).

۳.۲. تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد

جهت تعیین غلظت آنزیم از معرف برادفورد (۵ میلی لیتر) و آنزیم جداسازی شده (۱۰ تا ۵۰ میکرو لیتر) استفاده شد وپس از هم زدن به مدت ۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند و جذب محلول‌ها در ۵۹۵ نانومتر به‌وسیله اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شدند. درنهایت نمودار جذب بر حسب غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برای پروتئین استاندارد BSA در غلظت های مختلف ترسیم شد و به کمک آن غلظت پروتئین نمونه بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آورده شد (نمونه های استاندارد و آنزیم سه بار تکرار داشتند).

٤.۲. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استیل کولین استراز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بر اساس روش المن انجام شد.برای تهیه محلول دی تیو دی نیترو دی بنزوئیک اسید، ۱۰ میلی مولار ، ۷/۹ میلی‌گرم از DTNB در ۲ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۳۰ میلی مولار با pH=۷/۵ حل گردید. برای تهیه محلول استیل تیو کولین یداید با غلظت ۷۵ میلی مولار ۴۳ میلی‌گرم از استیل تیو کولین یداید در ۲ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۳۰ میلی مولار با pH=۷/۵ حل گردید تا محلول سوبسترا با غلظت ۷۵ میلی مولار حاصل گردد.

۵.۲. سنجش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز

سنجش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز بر اساس روش پارک و همکاران انجام شد. نمونه آنزیمی از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد تا به دمای محیط آزمایشگاه برسد. سپس محلولی شامل ۴۰ میکرولیتر آنزیم، ۲۹۲۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات ۳۰ میلی مولار با pH=۷/۵ ، ۲۰ میکرولیتر از معرف DTNB (۱۰ میلی مولار) و ۲۰ میکرولیتر استیل تیوکولین یداید تهیه گردید و تغییرات جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۲ نانومتر به مدت ۵ دقیقه هر ۳۰ثانیه یک‌بار خوانده و ثبت شد. نمونه شاهد فاقد آنزیم بوده و شامل ۲۹۶۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات و ۲۰ میکرولیتر DTNB و ۲۰ میکرولیتر سوبسترا می‌باشد (Son et al., 2002).

٦.۲. پارامترهای سینتیکی آنزیم استیل کولین استراز

برای تعیین K_m و V_{max} ، استیل تیو کولین یداید در غلظت‌های ۵ تا ۱۱۵ میلی مولار در بافر سدیم فسفات ۰/۰۳ مولار با pH=۷/۵ تهیه شد. سپس نمونه آنزیمی با سوبسترا مخلوط گردید و سرعت واکنش اندازه‌گیری شد. با استفاده از نمودار تغییرات سرعت اولیه واکنش آنزیم به ازای غلظت‌های مختلف سوبسترا، نمودار میکائلیس- منتن رسم شد. سپس با رسم نمودار لاینویوربرگ مقدار K_m و V_{max} تعیین شد.

۷.۲. بررسی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در حضور عصاره آلکالوئیدی

د. ابتدا عصاره آلکالوئیدی در غلظت‌های ۱/۶، ۳/۳، ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شدند. استیل تیوکولین یداید در غلظت‌های ۰/۰۳۳ تا ۰/۶ میلی مولار آماده گردید. در هر بار سنجش، در کووت از ۴۰ میکرولیتر آنزیم استیل کولین استراز، بافر سدیم فسفات ۰/۰۳ مولار با pH=۷/۵ ، عصاره آلکالوئیدی در مقادیر ذکر شده، ۲۰ میکرولیتر DTNB ۱۰ میلی مولار و ۲۰ میکرولیتر استیل تیو کولین یداید اضافه گردید؛ و پس از ۱۰ دقیقه انکوبه، جذب هر نمونه در طول موج ۴۱۲ نانومتر ثبت شد. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه حاوی آنزیم می‌باشد با این تفاوت که نمونه شاهد فاقد آنزیم بوده و به جای آن از بافر استفاده شد. از محلول گالانتامین در متانول به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و در نهایت منحنی جذب در برابر غلظت‌های مختلف سوبسترا برای عصاره آلکالوئیدی و آنزیم ترسیم شد و نوع مهارکنندگی عصاره آلکالوئیدی بر آنزیم استیل کولین استراز مشخص ش

۳. نتایج

۱.۳. تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد

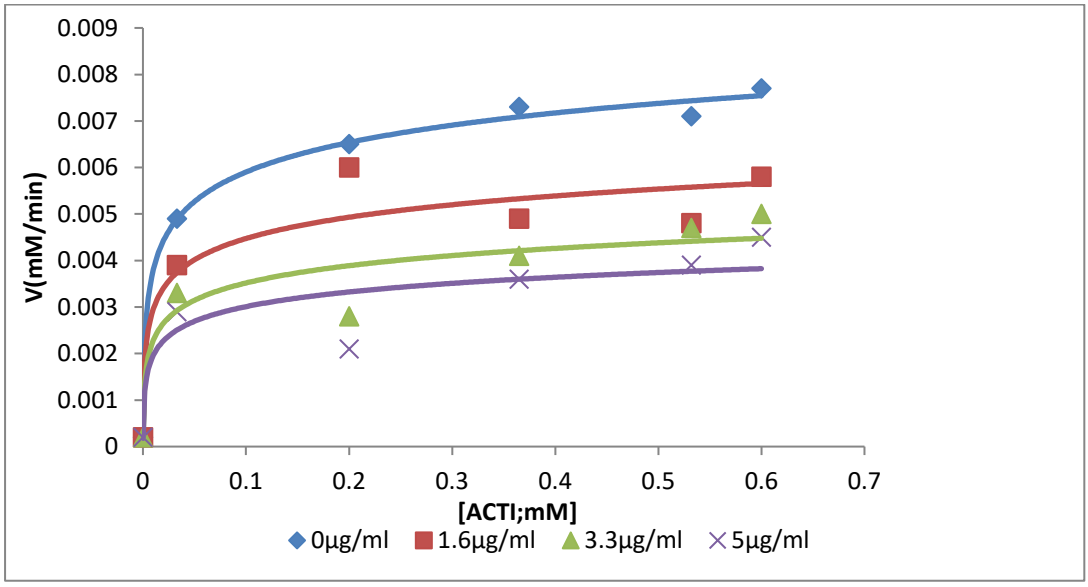
برای تعیین غلظت آنزیم استخراج شده از روش برادفورد استفاده شد. اساس واکنش برادفورد این گونه است که اتصال رنگ کوماسی بلو G-250 به پروتئین و تغییر رنگ آن از قهوه‌ای به آبی نسبت مستقیمی با غلظت پروتئین دارد و توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. در این اندازه‌گیری از پروتئین سرم آلبومین گاوی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان استاندارد استفاده شد. با رسم خط استاندارد و تعیین معادله آن، غلظت آنزیم استخراج شده در عصاره آنزیمی بعد از دیالیز ۷۰ درصد ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آورده شد.

۲.۳. راندمان عصاره گیری

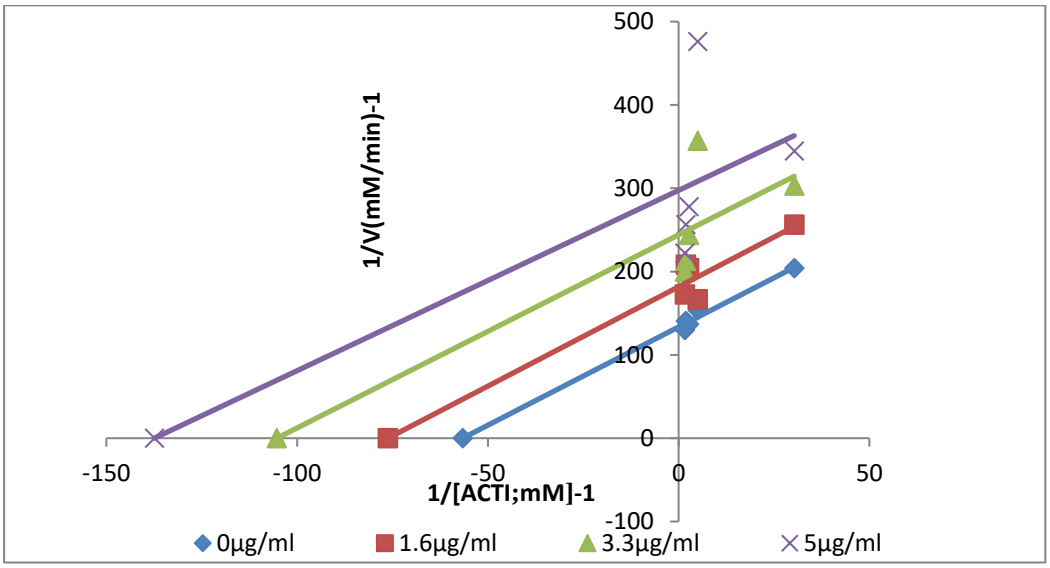
عصاره آلکالوئیدی استخراج شده پس از خشک شدن، تعیین مقدار شده و راندمان عصاره گیری به صورت درصد وزنی عصاره خشک شده به مقدار اولیه پودر گیاه ۲ درصد (وزنی/وزنی) بدست آورده شد.

۳.۳. تاثیر عصاره آلکالوئیدی گیاه خرزهره بر فعالیت استیل کولین استراز

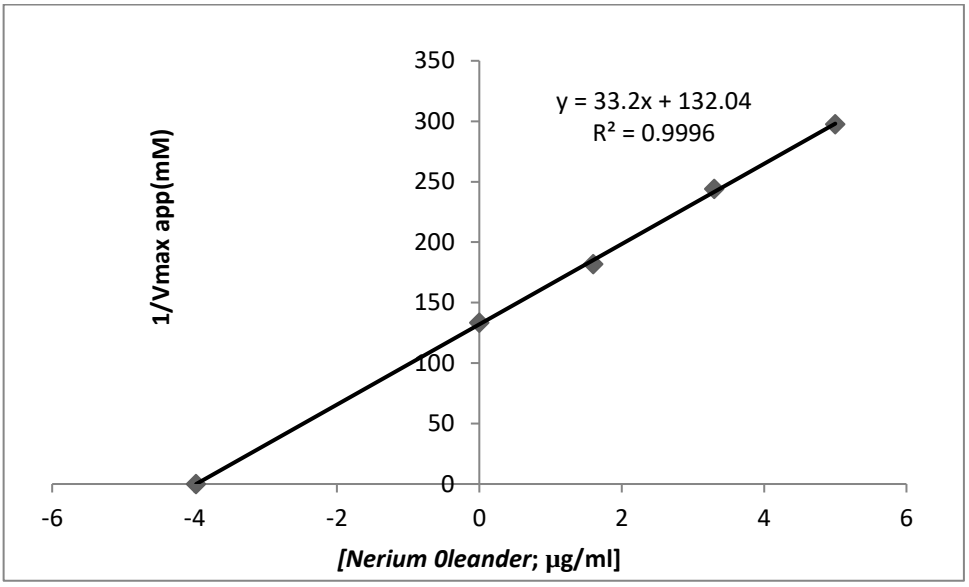
فعالیت آنزیم استیل کولین استراز استخراج شده از مغز گاو، در شرایط بدون عصاره آلکالوئیدی و در حضور غلظت‌های مختلف عصاره آلکالوئیدی گیاه خرزهره اندازه‌گیری شد و نمودارهای میکائلیس- منتن و لاینویوربرگ و K_iو هم‌چنین نمودارهای IC_{50} مهارکننده و درصد مهار آنزیم در غلظت‌های مختلف مهارکننده ترسیم شد (شکل ۴-۱) . با توجه به نمودارها و تغییرات K_m (کاهش) و V_{max} (کاهش) در جدول ۱ عصاره آلکالوئیدی گیاه خرزهره دارای اثر مهاری از نوع نا رقابتی بر روی آنزیم استیل کولین استراز می‌باشد.



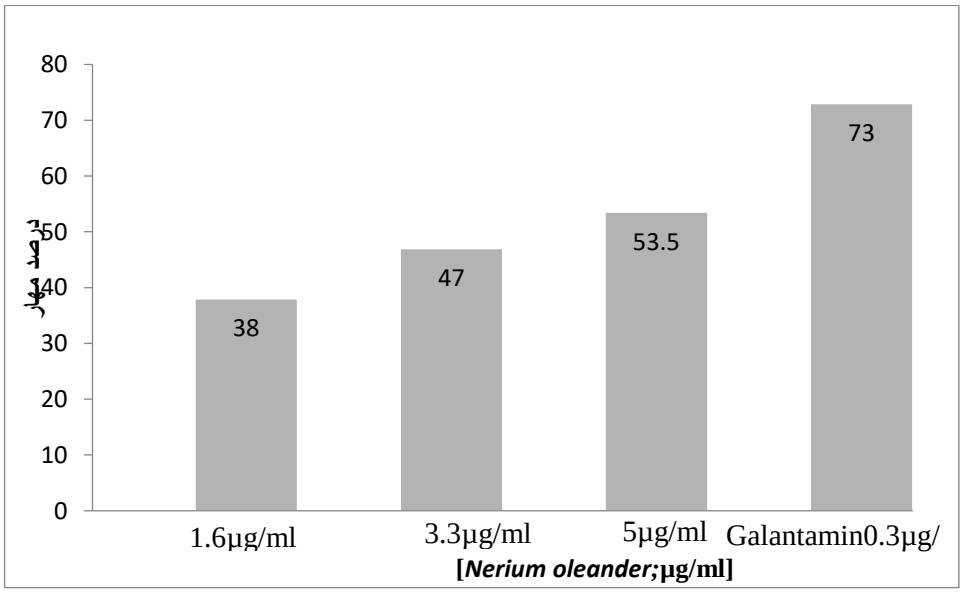
شکل ۱. نمودار میکائلیس- منتن سرعت واکنش استیل کولین استراز در مجاورت غلظت‌های مختلف عصاره آلکالوئیدی گیاه خرزهره



شکل ۲. نمودار لاینویوربرگ معکوس سرعت استیل کولین استراز در مجاورت غلظت‌های مختلف عصاره آلکالوئیدی گیاه خرزهره



شکل ۳. نمودار تغییرات 1/Vmax ظاهری آنزیم نسبت به غلظت عصاره آلکالوئیدی گیاه خرزهره



شکل ۴. نمودار بستگی میزان مهار آنزیم با افزایش مقدار عصاره آلکالوئیدی گیاه خرزهره در مقایسه با گالانتامین

٤. بحث و نتیجه‌گیری

از زمان معرفی اولین مهارکننده کولین استراز، اکثر پزشکان داروهای کولینرژیک شامل دونپزیل، ریواستیگمین و گالانتامین را تجویز می‌کنند. مهار استیل کولین استراز یکی از استراتژی‌های مورد استفاده برای درمان آلزایمر بوده و داروهای مذکور تنها در برابر نوع خفیف تا متوسط بیماری مؤثر هستند. از طرفی عوارض جانبی قابل توجه آن‌ها جستجوی منابع جدید مهارکننده استیل کولین استراز با عوارض جانبی کمتر را امری ضروری کرده است (Ranjan and Kumari, 2017). با توجه به عوارض داروهای سنتزی شیمیایی، استفاده از گیاهان مورد توجه می‌باشد و مشتقات آن منبع مناسبی جهت تولید داروهای بهبوددهنده حافظه می‌باشد (Germezgoli and Nasri, 2015). کاربردهای درمانی گیاهان شامل فعالیت‌های ضد تومور، ضدویروسی، ضد التهابی و ضد مالاریایی می‌باشد. گیاهان به عنوان منبع غنی از انواع مختلفی از ترکیبات با ارزش هستند؛ که می‌توانند برای توسعه داروها استفاده شوند. آلکالوئیدها از متابولیت‌های ثانویه مهم در گیاهان هستند که دارای خواص درمانی می‌باشند (Roy, 2017). آلکالوئیدها حدود ۲۰درصد از متابولیت‌های ثانویه گیاهی را تشکیل می‌دهند و بسته به پیش ساز و سیستم حلقه‌های هتروسیکل آن‌ها به دسته‌های مختلفی طبقه‌بندی می‌شوند (Kaur and Arora, 2015).

مهار استیل کولین استراز از اهداف مهم درمانی برای تقویت حافظه می‌باشد. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۱ توسط داس و همکارانش فعالیت نواحی مختلف مغز در موش‌های صحرایی نر و ماده بالغ (سه ماهه) و پیر (۲۲ تا ۲۸ ماهه) بررسی شد. فعالیت ویژه استیل کولین استراز در محلول نمک و محلول دترجنت، در مناطق مختلف مغز که به طور عمده از ایزوفرم‌های مولکولی G1 و G4 تشکیل شده است مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت استیل کولین استراز موش‌های نر پیر در مقایسه با موش‌های بالغ در قشر فرونتال، جسم مخطط و هیپوتالاموس در ارزیابی با محلول دترجنت کاهش ۵۵ درصدی داشته است ولی در ارزیابی با محلول نمک تغییری مشاهده نشده است. فعالیت استیل کولین استراز موش‌های ماده پیر در مقایسه با موش‌های بالغ در قشر فرونتال، قشر مغز، جسم مخطط، تالاموس، مخچه و مدولا در ارزیابی با محلول دترجنت کاهش یافته است؛ در حالی که در ارزیابی با محلول نمک فعالیت فقط در هیپوتالاموس کاهش یافته است. در نهایت با توجه به نتایج حاصل از فعالیت استیل کولین استراز در ارزیابی با محلول دترجنت، به نظر می‌رسد که سن در فعالیت استیل کولین استراز در مناطق مختلف مغز ایزوفرم‌های G4 را تغییر می‌دهد؛ بنابراین ایزوفرم G4 نقش غالبی در حافظه و یادگیری دارد و یک هدف مهم برای داروهای آنتی کولین استراز می‌باشد (Das et al., 2001).

در سال ۲۰۱۵ مطالعاتی توسط ویسلر و همکارانش انجام شد که نشان‌دهنده‌ی وابستگی استیل کولین استراز به pH می‌باشد. بر اساس این مطالعات pH بهینه برای آنزیم استیل کولین استراز بالاتر از ۷ می‌باشد و مقادیر پایین‌تر از ۶ منجر به غیر فعال شدن آنزیم استیل کولین استراز شده و مانع هیدرولیز استیل کولین می‌شوند (Ranjan and Kumari, 2017). آنزیم استخراج شده از مغز تازه گاو در این پژوهش دارای مقدار فعالیت کل آنزیم ۴/۴۵۵ U/mL و فعالیت ویژه آنزیم ۱/۱۷ U/mg اندازه گیری شد. مقدار K_m برای آنزیم ۰/۰۱۷ میلی مولار و V_{max} آنزیم ۰/۰۷۴ میلی مولار بر دقیقه به دست آورده شد (جدول ۱).

در انسان اکثر آلکالوئیدها بر سیستم عصبی، به ویژه بر انتقال‌دهنده‌های شیمیایی مثل استیل کولین، سروتونین، اپی نفرین و دوپامین اثر می‌گذارند (Roy, 2017). لذا امروزه محققین زیادی به دنبال عصاره‌ها و آلکالوئیدهای مختلفی از منابع گیاهی

می‌باشند که علاوه بر داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی به عنوان مهارکننده آنزیم استیل کولین استراز در بهبود بیماری‌های مرتبط با فعالیت استیل کولین استراز نظیر آلزایمر مورد استفاده قرار گیرند.

پژوهشی توسط مورگان و همکارانش در سال ۲۰۱۸ انجام شد که با توجه به اینکه فیزوستیگمین و گالانتامین از منابع طبیعی عوارض جانبی کمتری در بیماران مبتلا به آلزایمر ایجاد می‌نمایند؛ در این راستا و پس از تأیید گالانتامین به عنوان مهارکننده طولانی مدت استیل کولین استراز در سال ۲۰۰۱ چند گونه از نرگسیان[1] به عنوان منبع گالانتامین و دیگر آلکالوئیدها مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر این ۱۲ آلکالوئید دیگر توسط طیف‌سنجی جرمی- گاز کروماتوگرافی به عنوان مهارکننده استیل کولین استراز ارائه شد (Moraga et al., 2018).

بر اساس پژوهش‌های یانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۲ عصاره کل آلکالوئیدی از ۳۱ گیاه دارویی چین با روش المن مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که عصاره‌های کل آلکالوئیدی پنجه گربه[2] از خانواده روناسیان و لاله مردابی از خانواده نیلوفر آبی و فاخره[3] از خانواده سدابیان[4] و خرفه پر پهن[5] از خانواده خرفه ئیان[6] و پینه لیاترناتا[7] از خانواده گل شیپوریان[8] فعالیت‌های مهارکننده استیل کولین استراز قابل توجهی در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان دادند (Yang et al., 2012).

در سال ۲۰۱۵ پژوهشی توسط کورتس و همکارانش به منظور جدا کردن منابع جدید از مهارکننده‌های قوی استیل کولین استراز، روی عصاره‌های آلکالوئیدی نرگسیان که در کلمبیا رشد می‌کنند انجام شد. بر طبق نتایج حاصل ۵۷ آلکالوئید با استفاده از طیف‌سنجی جرمی- گاز کروماتوگرافی و ۲۱ مورد از آن‌ها با مقایسه الگوهای تقسیم طیف‌سنجی جرمی خود با طیف‌های مرجع استاندارد از بانک‌های اطلاعاتی شناسایی شدند. ترکیبات عصاره آلکالوئیدی گیاه سوسن باران[9] سطح بالایی از فعالیت مهاری را نشان دادند. مدل‌سازی مولکولی که با استفاده از ساختار برخی از آلکالوئیدهای موجود در این گیاه و ساختارهای کریستالی سه بعدی استیل کولین استراز به دست آمد؛ پیکربندی اتصال آن‌ها را در جایگاه فعال استیل کولین استراز نشان داد (Cortes et al., 2015). برای اولین بار پژوهشی با هدف مطالعه ترکیبات آلکالوئیدی چهار گونه از گیاه نرگسیان وحشی آرژانتینی و هم‌چنین فعالیت مهاری آن‌ها بر استیل کولین استراز توسط ارتیز و همکارانش در سال ۲۰۱۲ انجام شد. محتوای آلکالوئیدی با استفاده از تجزیه و تحلیل طیف‌سنجی- جرمی گاز کروماتوگرافی مشخص شد؛ و همگی حاوی گالانتامین و فعالیت مهاری قوی بر استیل کولین استراز نشان دادند (Ortiz et al., 2012).

بسیاری از آلکالوئیدهای جدا شده از منابع طبیعی مانند فیزوستیگمین در مطالعه ای مشخص شد که مدت‌هاست که به عنوان مهارکننده‌های استیل کولین استراز شناخته شده‌اند. از زمان تأثیر گالانتامین برای درمان بیماران مبتلا به آلزایمر، جستجو برای آلکالوئیدهای جدید آنتی کولین استراز افزایش یافته است. یافته‌هایی درباره آلکالوئیدهای طبیعی متعلق به کلاس‌های

[1] Amaryllidaceae
[2] Uncaria rhynchophylla
[3] Zanthyoxylum nitidum
[4] Rutaceae
[5] Portuiulaca oleracea
[6] Portuiulacaceae
[7] Pinellia ternata
[8] Araceae
[9] Zephyranthes carinata

استروئیدی، ترپنوئیدی، کینولیزیدین، ایزوکینولین و ایندول که به طور عمده در نرگسیان و شمشادیان[1] و پنجه گرگیان[2] توزیع شده‌اند؛ منابع مهم آلکالوئیدها با خاصیت ضد AChE محسوب می‌شوند. فعالیت آنتی کولین استراز آلکالوئیدها، همراه با تنوع ساختاری و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، آن‌ها را به عنوان کاندیدای خوب برای درمان بیماری آلزایمر می‌سازد (Konrath et al., 2013). با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش عصاره گیاه خرزهره دارای ترکیبات آلکالوئیدی بوده و اثرات مهارکنندگی استیل کولین استراز را نشان داده و می‌تواند در درمان بیماری آلزایمر مطرح شود. پارامترهای سینتیکی و مقادیر IC_{50} و درصد مهار عصاره آلکالوئیدی خرزهره در جدول ۱ آورده شد.

جدول ۱. تأثیر عصاره آلکالوئیدی گیاه خرزهره بر فعالیت استیل کولین استراز

نام گیاه	K_m(mM)	V_{max}(mM/min)	نوع مهار	درصد مهار در غلظت ۵µg/mL	IC_{50} (µg/mL)	K_i(mM)
خرزهره	۰/۰۰۷۰	۰/۰۰۳۳	نا رقابتی	۵۳/۵	۳/۶	۳/۹۷
کنترل بدون عصاره	۰/۰۱۷	۰/۰۷۴	–	–	–	–

پارامترهای سینتیکی آنزیم استیل کولین استراز در مجاورت عصاره غنی آلکالوئیدی استخراج شده از گیاه خرزهره در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر درصد مهار ۵۳/۵ را نشان داد و K_m و V_{max} به ترتیب ۰/۰۰۷۰ میلی مولار و ۰/۰۰۳۳ میلی مولار در دقیقه و از نوع مهار نا رقابتی بر روی آنزیم استیل کولین استراز مغز گاو نشان داده است و در غلظت ۳/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت آنزیم را به مقدار ۵۰ درصد کاهش داده و مقدار K_i آن ۳/۹۷ میلی مولار اندازه‌گیری شد. در مهار نا رقابتی میزان K_m و V_{max} کاهش می‌یابد بنابراین اثر عصاره آلکالوئیدی این گیاه بر استیل کولین استراز از نوع مهار نا رقابتی است. اندازه گیری ها نشان داد که هر چه مقدار IC_{50} و K_i کاهش یابد مهارکنندگی نیز افزایش می‌یابد.

۲.٤. نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نوع آلکالوئیدهایی که در عصاره غنی آلکالوئیدی این گیاه وجود دارند، نتیجه‌گیری می‌شود که ساختارهایی از این آلکالوئیدها در مهار نا رقابتی شرکت دارند که احتمالاً از یک خانواده یا گروه آلکالوئیدها هستند. بنابراین با درنظر گرفتن

[1] Buxaceae
[2] Lycopodiaceae

نتایج این مطالعه آزمایشات درون تنی در حیوانات آزمایشگاهی القاشده برای بیماری آلزایمر و مطالعه فعالیت آنزیم استیل کولین استراز پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه مازندران که حمایت های مالی این تحقیق را تقبل نمودند کمال تشکر را دارند.

منابع

Cortes, N., Alvarez, R., Osorio, E. H., Alzate, F., Berkov, S., Osorio, E. 2015. Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 102: 222-228.

Das, A., Dikshit, M., Nath, C. 2001. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. Life Sciences. 68(13): 1545-1555.

Germezgoli, S., Nasri, S. 2015. Evaluating the root extract of Cyperus rotundus L. on learning and memory in male rats. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences. 22(6): 34-43.

Kaur, R. A. J. B. I. R., Arora, S. A. R. O. J. 2015. Alkaloids-important therapeutic secondary metabolites of plant origin. Journal of Critical Reviews. 2(3), 1-8.

Konrath, E. L., Passos, C. D. S., Klein-Júnior, L. C., Henriques, A. T. 2013. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 65(12): 1701-1725.

Liston, DR., Nielsen, JA., Villalobs, A.,Chapin, D., Jones, B.,Shalaby, I., Hubbard, S., Ramirez, A., Nason, D., White,W. 2004. Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. European Journal of Pharmacology. 486: 9– 17.

Maczurek, A., Hager Kenklies, M., Sharman, M., Martins, M., Engel, J., Carlson, D., Munch, G. 2008. Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. Advanced Drug Delivery Reviews. 60: 1463–1470.

Mokri, F., Assmar, M., Zarrabi, S., Massiha, A. 2018. The Evaluation of Antibacterial effect of Aquatic and Ethanolic Extract of Nerium oleander against Standard strains of Salmonella Typhi and Listeria Monocytogenes in vitro condition. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 8(31): 75-85.

Moraga-Nicolás, F., Jara, C., Godoy, R., Iturriaga-Vásquez, P., Venthur, H., Quiroz, A. Hormazábal, E. 2018. Rhodolirium andicola: a new renewable source of alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity, a study from nature to molecular docking. Revista Brasileira de Farmacognosia. 28(1): 34-43.

Nino, J., Hernandez, J.A., Correa, Y.M., Mosquera, O. S. 2006. In vitro inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extracts from Colombian flora. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 101(7): 783-785.

Ortiz, J. E., Berkov, S., Pigni, N. B., Theoduloz, C., Roitman, G., Tapia, A., Feresin, G. E. 2012. Wild Argentinian Amaryllidaceae, a new renewable source of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine and other alkaloids. Molecules. 17(11): 13473-13482.

Ranjan, N., Kumari, M. 2017. Acetylcholinesterase inhibition by medicinal plants: A Review. Annals of Plant Sciences. 6(06): 1640-4.

Roy A. 2017. A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. International Journal of Plant Bitechnology. 2: 1-9.

Silman, I., & Sussman, J. L. 2005. Acetylcholinesterase:'classical'and 'non-classical'functions and pharmacology. Current Opinion in Pharmacology. 5(3): 293-302.

Son, J. Y., Shin, S., Choi, K. H., Park, I. K. 2002. Purification of soluble acetylcholinesterase from Japanese quail brain by affinity chromatography. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 34(2): 204-210.

Stuchbury, G., Münch, G. 2005. Alzheimer's associated inflammation, potential drug targets and future therapies. Journal of Neural Transmission. 112: 429–453.

Sugimoto, H., Yamanish, Y., Iimura, Y., Kawakami, Y. 2000. Donepezil hydrochloride (E2020) and other acetylcholinesterase inhibitors. Current Medicinal Chemistry. 7(3): 303-339.

Talic, S., Dragicevic, I., Corajevic, L., Martinovic Bevanda, A. 2014. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of extracts from medicinal plants. Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina. 43: 11-14.

Yang, Z., Zhang, D., Ren, J., Yang, M., Li, S. 2012. Acetylcholinesterase inhibitory activity of the total alkaloid from traditional Chinese herbal medicine for treating Alzheimer's disease. Medicinal Chemistry Research. 21(6): 734-738.

The Effect of *Nerium oleander* L. alkaloids on bovine acetylcholinesterase enzyme activity *in vitro*

Maryam Mohadjerani[1*] and Yeganeh Sadeghi[2]

[1, 2] Department of molecular and cell biology, Faculty of basic sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Abstract

Medicinal plants are a rich source of secondary metabolites, the most important of which are alkaloids. Alkaloids have significant effects on the human nervous system. Secondary metabolites such as morphine, codeine and betaine help to cure Alzheimer's and other diseases by inhibiting the enzyme acetylcholinesterase (AChE) and increasing the level of the neurotransmitter acetylcholine in the brain. Galantamine, an alkaloid derived from the narcissus family, is used as an acetylcholinesterase inhibitor. *Nerium oleander* L. is a perennial, branched and poisonous plant from the oleander family that grows as a bush or shrub. In recent studies, the therapeutic effects of this plant such as anti-cancer, anti-inflammatory, pain-relieving, modulating the immune system and also the effect on the stages of spermatogenesis have been observed. In this research, acetylcholinesterase enzyme was isolated from fresh brain of cow using homogenization, centrifugation, precipitation with ammonium sulfate and dialysis at 4°C. The effect of the rich alkaloid extract of the oleander plant in different concentrations on the activity of acetylcholinesterase was measured. Km and Vmax values of the enzyme were measured 0.21 mM and 0.021mM/min respectively. This alkaloid extract at a concentration of 5 micrograms/ml showed 53.5% inhibition of AChE by uncompetitive type. Therefore, the isolation and purification of the active components of the alkaloid extract of the oleander plant and the study of their effect on the acetylcholinesterase enzyme are suggested for future studies.

Key words: Acethylcholine Esterase, Alkaloids, Inhibitors, *Nerium oleander* L.

E-mail: m.mohajerani@umz.ac.ir

تاثیر روش‌های مختلف عصاره‌گیری بر میزان ترکیبات فنلی، تانن و فعالیت آنتی‌اکسیدانی شاخساره بادام کوهی (*Amygdalus scoparia*)

سعیده محتشمی[۱] *، ابوالفضل خوشی کته[۲]، امیرعلی غلام‌زاده[۲]

[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم

[۲] پژوهش سرای دکتر برنا، جهرم

چکیده

بادام کوهی با نام علمی *Amygdalus scoparia* یکی از گیاهان دارویی بومی مهم استان فارس می‌باشد که به دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی اثرات مثبتی بر سلامتی انسان دارد. به‌طور سنتی از عصاره آبی تهیه شده از شاخه‌های این گیاه دارویی برای درمان زخم‌های عمیق و کهنه و حتی زخم بستر استفاده می‌شود که تاثیر شگرفی دارد. در حالی که حلال‌ها و روش‌های مختلف عصاره‌گیری قابلیت‌های مختلفی در استخراج مواد موثره گیاهان دارویی دارند. لذا با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای درباره اثر نوع حلال و روش‌های مختلف عصاره‌گیری بر روی مواد موثره بادام کوهی انجام نشده است، در این پژوهش از حلال‌های مختلفی مانند آب، اتانول، متانول، ان-هگزان و دو روش خیساندن و سوکسله جهت عصاره‌گیری استفاده شد و برخی مواد موثره ساقه بادام کوهی شامل ترکیبات فنلی کل، میزان تانن و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شد. نتایج به وضوح نشان داد که بیشترین میزان ترکیبات فنلی کل (۴۷/۸۵ میلی‌گرم) و تانن (۸۴/۳۶ میلی‌گرم) در روش خیساندن و استفاده از حلال متانول بدست آمد. بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۹۵/۷۳ درصد) بعد از عصاره اتانولی در عصاره متانولی مشاهده شد. در حالی که کمترین میزان این مواد موثره در عصاره‌های آبی و ان-هگزانی و روش سوکسله مشاهده شد. بطور کلی در این پژوهش، روش خیساندن به عنوان موثرترین روش و حلال متانول به عنوان مناسب‌ترین حلال جهت استخراج مواد موثره بادام کوهی شناخته شد.

واژگان کلیدی: الوک، خیساندن، متانول، سوکسله،اتانول

E-mail: mohtashamis@yahoo.com

۱. مقدمه

ایران یکی از غنی‌ترین منابع گیاهان دارویی جهان به‌شمار می‌رود که دارای تنوع بسیار بالای شرایط زیست‌گاهی برای انواع این گیاهان است (فاضلی‌نسب و همکاران، ۱۳۹۸). گیاهان دارویی به گستره وسیعی از گیاهان (بوته، درختچه، درخت) اطلاق می‌شود که در درمان بیماری‌ها و یا در پیشگیری از بروز آن مورد استفاده قرار می‌گیرند و یکی از منابع بسیار ارزشمند در گستره وسیع منابع طبیعی ایران هستند که در صورت شناخت علمی کشت و توسعه و بهره‌برداری صحیح می‌توانند نقش مهمی در سلامت جامعه، اشتغال‌زایی و صادرات غیرنفتی داشته باشند. گونه‌های گیاهان دارویی در اندام‌های خود دارای یک‌سری ترکیبات شیمیایی به نام مواد موثره یا متابولیت‌های ثانویه هستند به‌طوری که خواص درمانی آن‌ها به این مواد موثره موجود در اسانس یا عصاره آن‌ها نسبت داده می‌شود که ممکن است در ترکیب با سایر مواد استخراج شده و یا به‌صورت انفرادی خاصیت درمانی خود را نشان دهند (باقری و همکاران، ۱۴۰۰). گیاه دارویی بادام کوهی با نام علمی *Amygdalus scoparia* یکی از گیاهان تیره گل سرخ (Rosaceae) می‌باشد که حتی در شرایط نامساعد خاک و با کمی رطوبت نیز توانایی رشد داشته و به حیات خود ادامه می‌دهد و این درخت در تمامی خاک‌ها رشد می‌کند، اما خاک‌های آهکی را ترجیح می‌دهد و از خاک‌های پررطوبت و بدون زهکش صدمه می‌خورد و با نام‌های دیگری از جمله ارژن، بادام تلخ، بادامک، بادامچه، بوخورک، ارجنک، الوک و ... نیز نامیده می‌شود. این گیاه در دامنه کوه‌ها می‌روید و نیازی به آبیاری و مراقبت خاصی ندارد و به دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه و مواد موثره فراوان، خاصیت‌های درمانی زیادی از جمله ویژگی‌های ضد التهاب، خاصیت نرم‌کنندگی، ضدعفونی کننده، مسکن درد و تقویت کننده چشم (با استفاده از سرمه تهیه شده از آن) داشته و در درمان مشکلات تنفسی، زخم‌های کهنه، و شوره سر بسیار موثر است. همچنین این گیاه به دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی اثرات مثبتی بر سلامتی انسان از جمله کاهش خطر سرطان کولون، دیابت نوع ۲، بیماری‌های قلبی، فشار خون بالا و چاقی دارد (Zahedi et al., 2020). به‌طور سنتی از عصاره آبی تهیه شده از شاخه‌های این گیاه دارویی برای درمان زخم‌های عمیق و کهنه و حتی زخم بستر استفاده می‌شود که تاثیر شگرفی دارد. این اثرات درمانی ناشی از مواد موثره موجود در این گیاه که عمدتا از گروه فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی موجود در آن که خاصیت ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند، می‌شود.

امروزه جهت استخراج مواد موثره گیاهی، از حلال‌های متفاوتی استفاد می‌شود که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارند. تهیه عصاره‌هایی با مواد موثره بالاتر منجر به اثربخشی بیشتر و صرفه اقتصادی بالاتر برای مصرف کنندگان آن‌ها می‌شود. تحقیقات زیادی پیرامون استخراج مواد موثره با استفاده از روش‌های مختلف عصاره‌گیری و حلال‌های مختلف در گیاهان دارویی انجام شده است ولی در رابطه با گیاه بادام کوهی یا الوک تاکنون تحقیقی انجام نشده است. از آن‌جا که مواد موثره تحت شرایط مختلف از جمله روش‌های مختلف عصاره‌گیری و استفاده از حلال‌های مختلف تغییر می‌یابد لذا هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر نوع حلال و روش‌های مختلف عصاره‌گیری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مواد موثره مهم موجود در عصاره بادام کوهی جهت تهیه عصاره‌ای با بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی بالا همراه با اثر بخشی بالاتر و کاربرد مقرون به صرفه‌تر در صنایع داروسازی و غذایی می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. منطقه مورد مطالعه

پژوهش حاضر در آزمایشگاه گیاهان دارویی دانشگاه جهرم در سال ۱۴۰۱-۱۴۰۰ انجام شد. ساقه‌های جوان و تازه رویش یافته گیاه الوک در فروردین ۱۴۰۱ از کوه سپیدار شهرستان خفر جمع‌آوری شد.

۲.۲. روش تحقیق

نمونه‌ها در دمای محیط و در شرایط سایه (دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت یک هفته قرار گرفتند تا کاملا خشک شوند. در این پژوهش تاثیر حلال‌های مختلف و روش عصاره‌گیری در قالب طرح کاملا تصادفی شامل ۵ تیمار مورد بررسی قرار گرفت. تیمارها شامل ۱- عصاره آبی (خالص) ۲-عصاره آبی-اتانولی (به نسبت ۳۰ به ۷۰ درصد) ۳- آبی-متانولی (به نسبت ۳۰ به ۷۰ درصد) ۴- عصاره آبی-هگزانی (ان-هگزان یا نرمال هگزان (به نسبت ۳۰ به ۷۰ درصد) با استفاده از روش خیساندن در حلال و ۵-روش سوکسله با استفاده از ان-هگزان خالص بر برخی از مواد موثره ساقه گیاه الوک بود. در ادامه روش‌های اشاره شده به تفصیل آورده شده است.

۳.۲. عصاره‌گیری به روش خیساندن (Maceration)

جهت عصاره‌گیری از روش وجدی‌لو و همکاران (۲۰۰۷) با مختصر تغییرات انجام شد. بدین منظور ساقه‌ها به قطعات کوچک ۱ تا ۲ سانتی‌متری خرد شده و درون آسیاب آزمایشگاهی ریخته شده و نمونه‌ها کاملا پودر شدند. سپس برای هر روش عصاره‌گیری میزان ۲۰ گرم نمونه پودر شده وزن شد و درون بالن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری انتقال یافت و به هر کدام حلال مورد نظر با غلظتی که در بالا به آن اشاره شد اضافه گردید (نسبت ۱۰ به ۱، حجمی- وزنی). بالن‌ها به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر با دور ۲۰۰ دور در دقیقه (rpm) نگهداری شدند و سپس عصاره به دست آمده جهت یکنواختی و پرهیز از ترکیبات جامد به مدت ۱۵ دقیقه داخل سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ قرار گرفت و بخش مایع رو شناور جدا شد و به عنوان عصاره جهت انجام آزمایش‌های بعدی در فریزر با دمای ۲۰- نگهداری شدند.

٤.۲. عصاره‌گیری به روش سوکسله (Soxhlet)

در این روش میزان ۲۰ گرم نمونه‌های پودر شده درون کارتوش مخصوص سوکسله ریخته شد و سپس میزان ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال ان-هگزان با خلوص ۹۸ درصد درون بالن ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و سپس به مدت دو ساعت تا روشن شدن کامل رنگ حلال عصاره‌گیری ادامه یافت. در روش عصاره‌گیری توسط سوکسله، حلال داخل بالن پس از به جوش آمدن تبخیر شده و در برخورد با مبرد به حالت مایع درآمده و بر روی کارتوش حاوی نمونه گیاهی ریخته شده و باعث عصاره‌گیری شده و پس از پر شدن محفظه کارتوش از حلال، بازگشت حلال به داخل بالن (سیرکوله) انجام می شود و این کار تا مرحله عصاره‌گیری کامل انجام می‌شود. برای این گیاه، دفعات برگشت حلال به مدت ۲۰ مرتبه انجام شد.

۵.۲. میزان ترکیبات فنلی کل

وجود ترکیبات فنلی در نمونه‌ها در واکنش با معرف فولین سیوکالتئو (Folin-Ciocalteu) باعث تشکیل رنگ آبی می‌شود که هر چقدر رنگ آبی پر رنگ‌تر باشد نشان دهنده مقدار بالای این ترکیبات می باشد. در این روش، از هر نمونه میزان ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره با ۲۰۰ میکرولیتر فولین ۵۰ درصد کاملا مخلوط شد و سپس میزان ۲۰۰۰ میکرو لیتر آب مقطر به محلول

اضافه شد و بعد از ۳ دقیقه، ۱۰۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد به محلول اضافه شد و بعد از ۱۰ ثانیه تکان شدید توسط دستگاه شیکر انگشتی (Shaker)، جهت انجام کامل واکنش و جدا شدن ترکیبات فنلی، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق و شرایط تاریکی نگهداری شدند. در نهایت عدد جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر انجام شد (وجدی لو و همکاران، ۲۰۰۷). تبدیل داده‌های حاصل از جذب به غلظت‌های مختلف گالیک اسید با رسم منحنی استاندارد گالیک اسید انجام شد و نتایج به صورت میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک بیان شد.

۶.۲. تعیین مقادیر تانن

تانن‌ها ترکیباتی هستند که ایجاد طعم گس می‌کنند و در طبیعت جهت بقای گیاهان و در امان ماندن از دست گیاهخواران نقش مهمی دارند. برای تعیین مقادیر تانن در نمونه‌ها از معرف وانیلین–اسید کلریدریک (Vanillin–HCL) که توسط برود هورست و همکاران (۱۹۷۸) ارائه شده است، استفاده شد. در ابتدا مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر از عصاره هر نمونه برداشته شد و مقدار ۳ میلی‌لیتر از معرف وانیلین (۴ درصد حجمی وزنی: ۴ گرم وانیلین در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول) اضافه شد و کاملا مخلوط گردید. سپس میزان ۱/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک به محلول‌های قبلی افزوده شد و به صورت کامل مخلوط شدند. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری و بعد از آن، اعداد جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. نمونه‌هایی که مقدار تانن بیشتری بودند رنگ قرمز پر رنگ‌تری به خود می‌گرفتند. تبدیل داده‌های حاصل از جذب به غلظت‌های مختلف کاتکین (Catechin) با رسم منحنی استاندارد کاتکین انجام شد و نتایج به صورت میلی‌گرم کاتکین در گرم وزن خشک بیان شد.

۷.۲. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

روشهای مختلفی جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی وجود دارد. یکی از روشهای مرسوم استفاده از آزمون دی‌پی‌پی‌اچ(DPPH (2,2- diphenyl picrylhydrazyl) می‌باشد. در این آزمایش، از روش توصیه شده توسط اک و همکاران (۲۰۰۹) با اندکی تغییر استفاده شد. محلول بالا، یک اکسیدان می‌باشد که در متانول قابل حل می‌باشد و تولید رنگ ارغوانی می‌کند. ترکیباتی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند باعث خنثی شدن این رنگ و تبدیل رنگ ارغوانی به زرد روشن می‌گردند. در ابتدا مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های هر نمونه به ۵ میلی‌لیتر محلول DPPH با غلظت ۰/۰۰۴ درصد اضافه شد. در محلول شاهد به جای عصاره، ۵۰۰ میکرولیتر متانول اضافه شد. محلول‌ها به مدت ۱۰ ثانیه به وسیله شیکر انگشتی به شدت تکان داده شدند و مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و شرایط تاریکی جهت انجام واکنش نگهداری شدند و در نهایت اعداد جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. هرچه اعداد جذب پایین‌تر باشد نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تر عصاره می‌باشد. درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

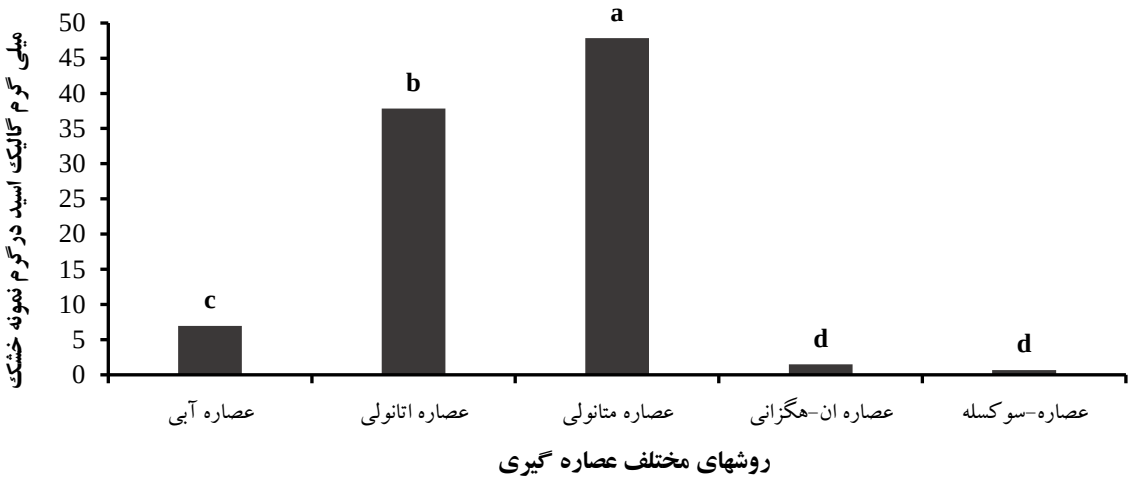
۱۰۰ × عدد جذب شاهد/ (عدد جذب نمونه –عدد جذب شاهد) = درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۳. نتایج

روش‌های مختلف عصاره‌گیری و نوع حلال بر میزان مواد موثره بادام کوهی تاثیر قابل توجهی داشت که شرح آن‌ها در زیر آمده است.

۱.۳. ترکیبات فنلی کل

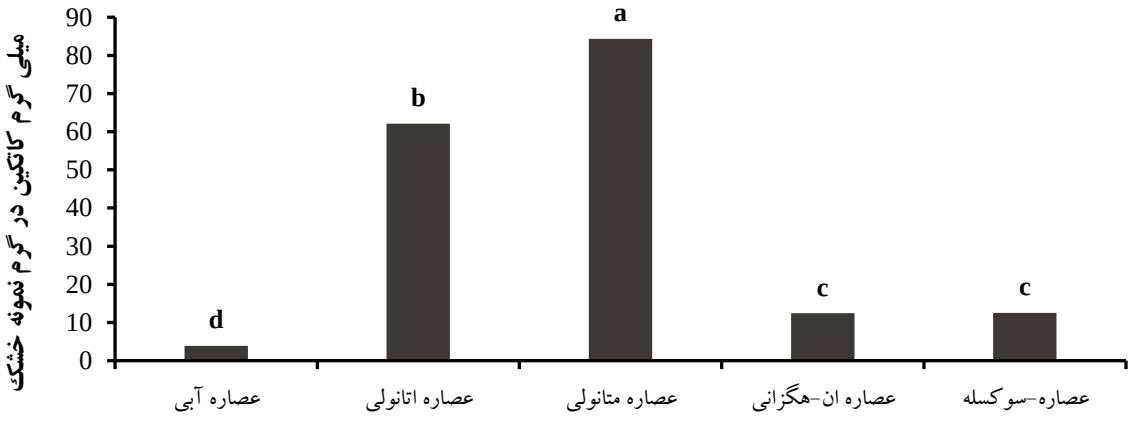
میزان ترکیبات فنلی بدست آمده توسط حلال‌های مختلف با یکدیگر تفاوت بسیار زیادی داشتند. به صورتی که در نمونه-های عصاره‌گیری شده با استفاده از سوکسله و حلال ان-هگزان کمتر از یک میلی‌گرم (۰/۶۹ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم نمونه خشک) بود. در حالی که مقدار این ترکیب با استفاده از حلال متانول ۴۷/۸۵ میلی‌گرم اندازه‌گیری شد (حدود ۷۰ برابر). همچنین در عصاره اتانولی نیز مقدار این ترکیب نیز نسبتا بالا اندازه‌گیری شد (۳۷/۸۳ میلی‌گرم) (شکل ۱).



شکل ۱- تاثیر روش‌های مختلف عصاره‌گیری بر میزان ترکیبات فنلی موجود در ساقه بادام کوهی

۲.۳. میزان تانن

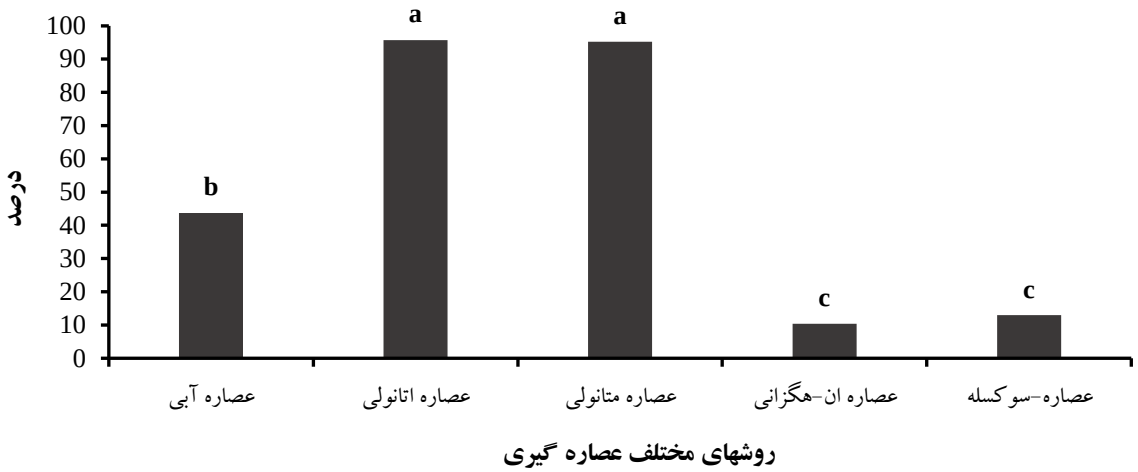
بالاترین میزان تانن (۸۴/۳۶ میلی‌گرم کاتکین در گرم نمونه خشک) مربوط به عصاره متانولی و بعد از آن عصاره اتانولی (۶۲/۰۷ میلی‌گرم) بود. در حالی که در سایر روش‌های عصاره‌گیری به شدت کاهش یافت و به کمترین میزان (۳/۸۸ میلی‌گرم) در عصاره آبی رسید (شکل ۲).



شکل ۲- تغییرات میزان تانن موجود در در ساقه بادام کوهی تحت تاثیر روش‌های مختلف عصاره‌گیری

۳.۳. فعالیت آنتی‌اکسیدانی

بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (بیش از ۹۵ درصد) مربوط به عصاره‌های اتانولی و متانولی بود. در حالی که کمترین میزان (حدود ۱۱ تا ۱۳ درصد) در عصاره‌های ان-هگزان با استفاده از روش خیساندن و سوکسله اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از عصاره آبی در حد متوسط (۴۳/۷۳ درصد) بود (شکل ۳).



شکل ۳- تاثیر روش‌های مختلف عصاره‌گیری بر درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی ساقه بادام کوهی

٤. بحث و نتیجه‌گیری

گیاهان به دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه ارزشمند در اندام‌های خود در درمان و پیشگیری از اختلالات گوناگون بکار می‌روند. مواد موثره گیاهان دارویی به چند دسته تقسیم می‌شوند که شامل آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، اسانس‌ها، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها، تانن‌ها، موسیلاژها، ساپونین‌ها و ... هستند (امیدبیگی، ۱۳۸۵). عمده‌ترین ماده موثره بادام کوهی از دسته ترکیبات فنلی و فلاونوئیدهای گلیکوزیدی می‌باشد (Zahedi et al., 2020). ترکیبات فنلی جزو فراوان‌ترین ترکیبات موجود در گیاهان می‌باشند که تقریبا در تمام بخش‌های گیاه وجود دارند و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک مانند رشد سلولی و رسیدن میوه نقش دارند.

در بافت‌های بدن، رادیکال‌های آزاد به‌طور مداوم به عنوان محصولات جانبی متابولیسم‌های اکسیداتیو تولید می‌شوند. تجمع آن‌ها و نبود آنتی‌اکسیدان‌های درون سلولی منجر به وقوع تنش اکسیداتیو و بیماری‌های گوناگونی مانند دیابت، سرطان، آلزایمر، پارکینسون و اختلالات قلبی-عروقی می‌گردد (Fiaschi and Chiarugi, 2012). اکسیداسیون لیپیدها از مهم‌ترین نگرانی‌های صنعت مواد غذایی نیز هستند؛ زیرا منجر به ایجاد عطر و طعم نامطلوب، رنگ تیره و ترکیبات سمی در مواد غذایی می‌شوند (Lin and Liang, 2002). بنابراین برای جلوگیری از این اثرات در مواد غذایی و حفاظت از بدن در برابر این بیماری‌ها، جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها و تشکیل رادیکال‌های آزاد، فرایندی حائز اهمیت می‌باشد. ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، از اجزای موجود

در مواد غذایی هستند که با جلوگیری از پیشرفت واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون یا به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد می‌توانند از اکسیداسیون لیپیدها جلوگیری کنند یا منجر به تاخیر این فرایند گردند (Othman et al., 2007). در صنعت غذا از آنتی-اکسیدان‌های مصنوعی مانند BHA و BHT جهت جلوگیری از اکسیداسیون استفاده می‌شوند. اگر چه این آنتی‌اکسیدان‌ها نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی قدرت بیشتری دارند اما از نظر ایمنی و سلامتی آن‌ها نگرانی‌هایی وجود دارد لذا شناسایی آنتی-اکسیدان‌های طبیعی برای استفاده در مواد غذایی و دارویی اهمیت بسیار زیادی دارد (کاوه و همکاران، ۱۳۹۹). آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شامل ترکیبات مختلفی می‌شوند که به دو دسته آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی تقسیم می‌شوند. آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل مواد معدنی، ویتامین‌ها، کاروتنوئیدها، ترکیبات گوگردی و ترکیبات پلی‌فنلی می‌باشد در حالی که آنتی-اکسیدان‌های آنزیمی شامل آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌باشند (Ghani et al., 2021). با توجه به اینکه ترکیبات فنلی جزو ترکیبات آنتی‌اکسیدان محسوب می‌شوند، لذا ارتباط مستقیم ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی-اکسیدانی بادام کوهی که در این پژوهش به‌دست آمده است، طبیعی به نظر می‌رسد.

از عصاره آبی ساقه بادام کوهی به‌طور سنتی برای درمان زخم‌های عمیق و کهنه و حتی زخم بستر استفاده می‌شود. همچنین بر طبق تحقیقات انجام شده بر روی این گیاه، خواص ضد التهابی، ضد سرفه و آنتی‌اکسیدانی بالا و ضد دیابتی نیز گزارش شده است (Zahedi et al., 2020). خواص ذکر شده برای این گیاه متاثر از متابولیت‌های با ارزش موجود در این گیاه است که عمدتا از نوع ترکیبات فنلی و فلاونوئیدهای گلیکوزیدی می‌باشند که میزان استخراج و جداسازی این ترکیبات در روش‌های مختلف عصاره‌گیری و حلال‌های بکار گرفته شده برای انجام آن متفاوت است. بر اساس نتایج این پژوهش، روش خیساندن و استفاده از حلال متانول در استخراج مواد موثره بادام کوهی موثرتر از سایر حلال‌های بکار گرفته شده و همچنین روش سوکسله در این آزمایش بود. در حالی که در عصاره‌های آبی و ان-هگزان کمترین میزان مواد موثره اندازه‌گیری شد. این نتایج نشان می‌دهد که در استفاده سنتی از این گیاه اگر از متانول به جای آب برای عصاره‌گیری استفاده شود، اثر درمانی آن به دلیل استخراج بیشتر مواد موثره از گیاه، بیشتر خواهد شد. در پژوهش انجام شده توسط باقری و همکاران (۱۴۰۰)، بیشترین میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گل ماهور تماشایی (*Verbascum speciosum*)، در عصاره‌های اتانولی بدست آمد در حالی که بیشترین میزان فلاونوئید کل در عصاره‌های متانولی اندازه‌گیری شد. فاضلی نسب و همکاران (۱۳۹۸)، گزارش داده‌اند که متانول مهم‌ترین حلال جهت استخراج مواد فنلی و بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. مجیدایی و همکاران (۱۳۹۹) در پژوهش خود بر روی گیاه کما (*Ferula persica*) به این نتیجه رسیدند که روش استخراج تاثیر زیادی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای تام فنلی دارد. اتیل استات و ان-بوتانول برای استخراج ترکیبات فنلی و متانول در فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب‌تر هستند و روش خیساندن به‌عنوان موثرترین روش برای استخراج ترکیبات فنلی گزارش شده‌اند. اخضری و همکاران (۱۴۰۰) در بررسی اثر ضدقارچی عصاره آبی و اتانولی ریشه قاصدک بومی ایران (*Taraxacum peregrinium*) گزارش کرده‌اند که عصاره اتانولی بر هر سه سویه قارچ مورد مطالعه خاصیت مهاری داشت در حالی که عصاره آبی هیچ اثر ضد قارچی از خود نشان نداد.

همان‌طور که از نتایج سایر محققین بر روی گیاهان دارویی مختلف مشاهده می‌شود، عصاره‌های الکلی (متانول و اتانول) نسبت به عصاره‌های آبی در استخراج ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی موثرتر هستند که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. اثر حلال‌های عصاره‌گیری در استخراج مواد بسته به نوع گیاه، آب و هوای منطقه رویش گیاه، خاک، روش‌های استخراج، نوع حلال، زمان عصاره‌گیری، قدرت استخراج و روش اندازه‌گیری مواد موثره می‌تواند تغییر کند (باقری و همکاران، ۱۴۰۰).

نتایج این پژوهش نشان داد که حلال متانول و استفاده از روش خیساندن در استخراج مواد موثره موثرتر از سایر حلال‌ها و روش سوکسله می‌باشد. بنابراین عصاره‌های متانولی که به روش خیساندن استخراج شده‌اند برای استفاده در مواد غذایی و داوریی مناسب‌تر هستند و با توجه به طبیعی بودن این ترکیبات، استفاده از این نوع عصاره در صنایع مختلف توصیه می‌گردد. البته روشن است جهت کاربرد در صنایع غذایی، داروهای گیاهی و یا لوازم آرایشی و بهداشتی پس از عصاره‌گیری باید اقدام به حذف حلال کرد.

منابع

اخضری، ع.، نصراللهی، ز.، یزدان پناه، م.، ابوالحسنی، ا.، ابوالحسنی، ه. ۱۴۰۰. بررسی اثر ضد قارچی عصاره آبی و اتانولی ریشه قاصدک بومی ایران (*Taracxacum peregrinium*) و مقایسه آن با فلوکونازول و نیستاتین. مجله دانشگاه علوم پزشکی قم. ۱۵(۱)، ۲۰-۲۷.

امیدبیگی، ر.، ۱۳۸۵. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد اول. به‌نشر (انتشارات قدس رضوی). ۳۴۷ صفحه.

باقری، ز.، فروزه، م.ر.، مازندرانی، م.، شهپری طبرستانی، ه.، آتشی، ص. ۱۴۰۰. اثر ارتفاع، حلال، نوع اندام گیاه و روش استخراج بر برخی ویژگی های فیتوشیمیایی گل ماهور تماشایی در مراتع چهارباغ استان گلستان. نشریه علمی مرتع. ۱۵(۱)، ۸۴-۹۶.

فاضلی نسب، ب.، مشتاقی، ن.، فروزنده، م. ۱۳۹۸. بررسی اثر حلال عصاره گیری بر میزان فنول، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برخی گیاهان داروئی ایران. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام. ۲۷(۳)، ۱۴-۲۶.

کاوه، ش.، صادقی ماهونک، ع.، سرابندی، ع. ۱۳۹۹. تاثیر نوع حلال، زمان و روش استخراج بر ترکیبات شیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست بادمجان. فصلنامه علمی-پژوهشی کارافن. ۱۷(۲)، ۱۲۹-۱۴۱.

مجیدایی، ا.، حسینی طالعی، س.ر.، غلام نژاد، س.، ابراهیم‌زاده، م.ع. ۱۳۹۹. مقایسه اهمیت روش‌های مختلف استخراج نقش افزایش قطبیت حلال در محتوای تام فنل و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کما (*Ferula persica*). مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۳۰(۱۸۸)، ۲۶-۳۹.

Broadhurst, R.B., Jones, W.T. 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. Journal of the Science of Food and Agriculture, 29: 788-794.

Fiaschi, T., Chiarugi, P. 2012. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. International journal of cell biology. 1-8.

Ghani, A., Mohtashami, S., Jamalian, S. 2021. Peel essential oil content and constituent variations and antioxidant activity of grapefruit (*Citrus* × *paradisi* var. red blush) during color change stages. Journal of Food Measurement and Characterization. 15(6): 4917-4928.

Lin, C. C., Liang, J. H. 2002. Effect of antioxidants on the oxidative stability of chicken breast meat in a dispersion system. Journal of Food Science. 67(2): 530-533.

-Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M. R., Conforti, F., Statti, G., De Cindio, B., Houghton, P. J., Menichini, F. 2009. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. Food Chemistry, 114(2): 553-560.

Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S., Altundag, S. 2009. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. Food Chemistry 112: 874-879.

Othman, A., Ismail, A., Ghani, N. A., Adenan, I. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. Food chemistry. 100(4): 1523-1530.

Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L., Bogdanov, S. 2004. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. Phytochemical Analysis 15: 235-240.

Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compound in 32 selected herbs. Food Chemistry, 1005: 940-949.

Zahedi, S.M., Abdelrahman, M., Hosseini, M.S., Yousefi, R., Phan Tran, L.S. 2020. Physical and biochemical properties of 10 wild almond *(Amygdalus scoparia*) accessions naturally grown in Iran. Food Bioscience. Article in pre-proof. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100721.

The effect of different extraction methods on the amount of phenolic compounds, tannins and antioxidant activity of wild almond shoots (*Amygdalus scoparia*)

Saeideh Mohtashami[1*], Abolfazl Khoshi Katteh[2], Amir Ali Gholamzadeh[2]

[1] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran
[2] Research Center of Dr. Borna, Jahrom, Iran

Abstract

Wild almond (*Amygdalus scoparia*) is one of the important native medicinal plants of Fars province, which has positive effects on human health due to its secondary metabolites such as flavonoids and other phenolic compounds. Traditionally, the aqueous extract prepared from the branches of this medicinal plant is used to treat deep and old wounds and even bedsores, which has a tremendous effect. While different solvents and extraction methods have different capabilities in extracting the active substances of medicinal plants. Therefore, considering that no study has been done on the effect of solvent type and different extraction methods on active substances of wild almond, in this research different solvents such as water, ethanol, methanol, n-hexane and two methods of maceration and Soxhlet were used for extraction. Then some active substances of wild almond shoots including total phenolic compounds, tannin content and antioxidant activity were measured. The results clearly showed that the highest amount of total phenolic compounds (47.85 mg) and tannin (84.36 mg) was obtained in the method of maceration and using methanol solvent. The highest amount of antioxidant activity (95.73%) was observed in methanolic extract after ethanolic extract. while the lowest was observed in aqueous and n-hexane extracts and Soxhlet method. In general, in this research, maceration method was recognized as the most effective method and methanol solvent as the most suitable solvent for extracting the active substances of wild almond.

Keywords: Wild almond, maceration, methanol, Soxhlet, ethanol

[1]- mohtashamis@yahoo.com

تاثیر ریز مغذی‌ها بر افزایش اسانس گل محمدی در کاشان

مژگان علی‌حاجی قمصری[۱]، مریم خوش‌سخن مظفر[۲]*، سید محمدحسین رضویان[۳]

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، قم

چکیده

اسانس گل محمدی یکی از مهمترین و ارزشمندترین مواد در صنعت عطر و صنایع دارویی و غذایی است. از آنجا که ترکیبات اسانسی اینگیاه جزء متابولیت‌های ثانویه گیاهمحسوب می‌شود و در مسیر بیوسنتزی آنها بسیاری از عناصر و ترکیبات شیمیایی شرکت دارند، در این پژوهش از محلول‌پاشی ریزمغذی‌های KNO_3 و $NH_4H_2PO_4$ جهت افزایش میزان اسانس استفاده‌شد. ابتدا بوته‌های هم سن از گل محمدی کشت شده در منطقه سردندانه قمصر انتخاب گردید. دو گروه از آنها با استفاده از محلول KNO_3 با غلظت‌های 900 ppm و 300 ppm، سه دسته دیگر با محلول $NH4H2PO_4$ با غلظت‌های 200 PPM و 300 PPM و 400 PPM، دسته هفتم با آب مقطر محلول‌پاشی نموده و دسته هشتم بدون هیچ‌گونه محلول‌پاشی به عنوان شاهد انتخاب گردید. گل‌ها جهت بررسی اسانس با دستگاه GC-Mass جمع‌آوری شدند. نتایج نشان دادن که میزان سیترونلول/ ژرانول/ متیل اوژنول/ اوژنول در تمامی گروه‌ها نسبت به گروه شاهد و آب مقطر بیشترین میزان افزایش را داشته است. با توجه به تاثیر ریزمغذی‌ها و عناصر شیمیایی در فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی ترکیبات اسانسی، همچنین ورود عناصر در ساختار مولکولی ترکیبات اسانسی، افزایش اسانس دور از انتظار نیست.

واژگان کلیدی: ریزمغذی‌ها، اسانس، سیترونلول، گل محمدی.

ایمیل نویسنده :

m.khoshm@gmail.com

۱.مقدمه

اسانس گل‌محمدی یکی از مهمترین و ارزشمندترین مواد صنعت عطر و طعم غذایی است. به‌دلیل اندک بودن حجم روغن اسانسی گل‌محمدی و ارزشمندی اقتصادی و اهمیت بالای این ترکیبات، از این روغن‌های اسانسی به‌نام طلای سیال (Fluid Gold) یاد می‌شود(Kumar et al. 2016). عوامل مختلفی بر میزان اسانس تاثیر می‌گذارند. از جمله زمان برداشت گل، نحوه‌ی برداشت گل (Pal et al 2019)، نحوه‌ی نگهداری گل قبل از اسانس‌گیری (قلی‌پور، ۱۳۹۹). تاکنون تاثیر فاکتورهای مختلفی در میزان اسانس گل محمدی مورد بررسی قرار گرفته‌است (Kumar et al. 2013و Mohamadi et al. 2011و Yousefi and Jaimand, 2018و Kara et al. 2017). در میان اقدامات زراعی برای گیاهان اسانسی، مدیریت مواد مغذی چیزی‌است که بر عملکرد و کیفیت اسانس تأثیر می‌گذارد. (Rahmati and Tabaei-Aghdaei, 2014)

مطالعات نشان‌داده‌است که افزایش عناصر در بالا بردن ترکیباتی اسانس گل محمدی تاثیر دارد. ولی همچنان مسیرهای تاثیرگذاری آن به‌طور دقیق مشخص نشده‌است (Kumar et al. 2019). نیتروژن ماده مغذی کلیدی برای ساخت بسیاری از ترکیبات آلی مانند اسیدهای‌آمینه، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و اسیدهای نوکلئیک است. محلول‌پاشی نیتروژن باعث بهبود محتوای اسانس در برخی از گیاهان و اصلاح ترکیب اسانس می‌شود (Kumar et al. 2019). نیتروژن به عنوان اصلاح کننده اصلی حاصلخیزی و باروری گیاه شناخته شده‌است (Valtcho et al. 2011). پتاسیم، سومین ماده مغذی ضروری گیاه، بر بسیاری از فرآیندهای متابولیک اساسی مانند حرکات تورگوری، تنظیم اسمزی، کنترل پلاریزاسیون غشا، بیوسنتز پروتئین و فعال‌سازی آنزیم تأثیر می‌گذارد. پتاسیم مناسب‌ترین کاتیون یک ظرفیتی برای فعال‌کردن آنزیم‌های گیاهی است (Kumar et al. 2019). این عنصر بر فعال‌سازی آنزیم‌های دخیل در سنتز کربوهیدرات‌ها تاثیر می‌گذارد، کیفیت و کمیت محصول را ارتقا می‌بخشد و همچنین در تکثیر و رشد سلول نیز دخیل است (kumar et al. 2016). نقش فسفر در رشد گیاه توسط بسیاری از محققین مورد بررسی قرار گرفته است. همه اتفاق نظر دارند که وجود فسفر در خاک، رشد گیاه را افزایش می‌دهد (Sabzi-mehrabad and Lotfi, 2017).

گل محمدی گیاهی دولپه از گروه روزیدها، خانواده Rosaceae، جنس *Rosa* و گونه *Rosa damascena* Mill. می‌باشد. حدود ۱۵۰ گونه از جنس *Rosa* می‌باشد(قلی پور، ۱۳۹۰). گیاه گل محمدی درختچه‌ای دارای شاخه‌های گل دهنده تیغ دار، استوانه‌ای شکل، بدون شیار و دارای برگ‌های مرکب شانه‌ای که دارای ۵–۳ برگچه متقابل دندانه‌دار می‌باشد. رگبرگ‌های پشت برگ مشخص، برگچه چرمی و بیضی شکل، نوک‌تیز به طول ۵–۳ سانتی‌متر، و روی برگ‌ها صاف و سبز و پشت آن‌ها سبز کمرنگ و و دُمبرگ‌هایش خزی و نمدی است و با کرک‌های غده‌ای پوشیده شده و تا انتهای جام گل کشیده شده‌است(بتولی، ۱۳۹۱). سازگاری مناسب گل‌محمدی با آب و هوای ایران و مناطق کوهستانی و مرتفع و با نیاز آبی کم، موجب توسعه گلستان‌ها و ایجاد کارگاه‌های گلابگیری برای تولید و عرضه سایر فرآورده‌های حاصل به بازارهای داخلی و خارجی گردیده‌است. این گل برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله اسهال مزمن، دردهای رماتیسمی، ناهنجاری‌های خونی

و گلودرد کاربرد داشته است گلبرگ‌های آن معطر و حاوی اسانس قابل استخراج می باشد و خصوصیات آنتی‌اکسیدانی آن نیز ثابت شده‌است (طباطبایی عقدایی و رضایی، ۱۳۸۳). علاوه بر موارد فوق از اسانس طبیعی گل محمدی در عطرسازی و تهیه پماد و کرم و از گلبرگ‌های آن در تهیه مربا و گل خشک آن جهت مصارف خوراکی استفاده زیادی می‌شود(بتولی و صفایی قمی، ۱۳۹۱). از مهمترین ترکیبات روغن‌های اسانسی گل محمدی؛ درصد بالایی از آسیکلیک مونوترپن‌ها (مثل سیترونلول، ژرانیول و نرول)، آروماتیک الکل‌ها (مثل فنیل‌اتیل‌الکل‌ها)، هیدروکربن‌هایی با زنجیره طویل (مثل نونادکان، ایکوزان، هنیکوزان وتریکوزان)، هیدورکربن‌های سزکویی‌ترپنی (مثل آلفا گواین)، اکسیدها و اترهایی (مثل متیل اوژنول) ، آلدئیدها و استرها (مثل ژرانیل استات) و فنول‌هایی مثل اوژنول را می‌توان نام برد (kumar et al. 2016و Jalali Chimeh and Gandomkar, 2019).

Kumar و همکاران در سال ۲۰۱۶، محلول‌پاشی KNO_3 را با غلظت‌های 700 ppm تا 1000 ppm انجام دادند. همچنین آنها تاثیر Nacl را در آب در حین تقطیر بررسی نموده و به این نتیجه رسیدند که بهترین میزان اسانس در محلول‌پاشی KNO_3 900 ppm است که درصد نرول – سیترونلول را تا ۴۲ درصد و میزان هیدروکربن‌ها و الکل‌های مونوترپن را تا ۲۶ درصد افزایش داده و استفاده از Nacl اسانس را ۲۶ درصد افزایش می‌دهد (Kumar et al. 2016). همچنین Pal و همکاران در سال ۲۰۱۶ با استفاده از محلول‌پاشی مواد مغذی گیاهی و کینتین مشاهده نمودند که رفتار گلدهی، عملکرد روغن گل و گیاه و پروفایل متابولیت‌های ثانویه و بالابردن اسانس را نقش دارد. در پژوهشی دیگر به بررسی پاسخ منیزیم و مس و روی بر روی گل پرداخته‌شد و نشان داده‌شد که محلول‌پاشی این مواد در خاک هیچ تاثیری بر میزان اسانس گل و وزن گل ندارد ولی محلول‌پاشی $ZnSo_4$بر روی برگ گل و اندام‌های گیاه تاثیر مثبتی داشته و میزان اسانس و وزن گل را بالا برده‌است (Pal et al. 2019). در سال ۲۰۱۴ به بررسی میزان کود گاوی بر گل‌محمدی پرداخته شد. تحقیق در سه سال متوالی در یک منطقه انجام شد و از کودهای ۱۵ ,۳۰ و ۴۰ تن در هکتار استفاده گشت. بر اساس نتایج، در سال سوم گلدهی ۷۱ درصد در تیمار ۱۵ تن در هکتار در مقایسه با شاهد، افزایش داشته است (طباطبایی، ۱۳۸۳). جمالی چیمه وهمکارانش در سال ۱۳۹۷ به مقایسه ترکیب اسانس گل‌محمدی در شرایط تغییر اقلیمی در۶ منطقه پرداختند و نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که از هشت ترکیب تشکیل دهنده اسانس تنها چهار ترکیب (نونادکان، بنزن اتانول، ژانیول و متیل اوژنول) به صورت معنادار تابع تغییرات فضایی فاکتورهای آب وهوایی در ماه‌های فروردین تا خرداد به ویژه اردیبهشت بوده و طبق این مقاله مناطق کاشان، نیاسر و قمصر بهترین میزان اسانس و مناطق برزک و نطنز کمترین میزان اسانس را دارد (Jalali-Chimeh and Gandomkar, 2019). هدف از این مطالعه تاثیر محلول‌پاشی دو ماده نیترات پتاسیم و فسفات‌دی‌هیدروژن آمونیوم بر میزان اسانس گل‌محمدی در قمصر کاشان است.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. منطقه مورد مطالعه

مطالعات و تیماردهی در منطقه‌ی کوهپایه‌ای در ارتفاعات شهر قمصر و در دامنه کوه اسبی، در محلی به نام سردندانه انجام گردید. ارتفاع جغرافیایی این محل ۲۵۹۰ متر از سطح دریاست. این محل بخاطر داشتن آب وهوای کوهپایه و بادخیز نبودن بسیار برای کشت مناسب بود. همچنین در این محل تمام گیاهان مورد آبیاری قطره‌ای قرار گرفته و به یک میزان، تمامی گل‌ها آبیاری شده‌اند واین پارامتر نمی‌تواند در نتایج آزمایش انجام شده تاثیری بگذارد.

۲.۲. روش تحقیق

بوته‌های گل‌محمدی هم‌سن و هم‌اندازه و در یک ارتفاع و شرایط یکسان انتخاب گردیده تا فرآیند محلول پاشی روی برگها انجام شود. تعیین جامعه آماری شامل هشت گروه بوده که هر گروه آماری شامل شش بوته می‌باشد. در این مطالعه از دو ماده KNO_3 و $NH_4H_2PO_4$ جهت تیماردهی استفاده شده‌است. KNO_3 به دلیل وجود تامین پتاسیم و نیتروژن انتخاب شده‌است و در مقالات نشان داده است که تاثیر گذار بوده‌است (kumar et al. 2016) و از آنجایی‌که در این پژوهش سعی بوده‌است که از فسفر هم به‌همراه این دو تاثیر داده شود، به‌عنوان ریز مغذی از ماده $NH_4H_2PO_4$ استفاده شد. لازم به‌ذکراست این ماده در فرمول تهیه محیط‌های کشت هیدروپونیک و محیط‌های کشت جامد گیاهی به کار می‌رود. محلول‌پاشی بوته‌ها از بیدار شدن گیاه و پیدایش نازک برگ‌های کوچک (۴ فروردین ۱۴۰۰) شروع شد و به مدت پنج هفته که دقیقا تا زمان شروع گل‌دهی، ادامه داشت. تیماردهی هفته‌ای یک‌بار قبل از طلوع آفتاب و داغ شدن برگ‌ها انجام شد. دو گروه از آنها با استفاده از محلول KNO_3 با غلظت‌های 900 ppm و 600 ppm، سه دسته دیگر با محلول $NH_4H_2PO_4$ با غلظت‌های 200 PPM و 300 PPM و 400 PPM، دسته هفتم با آب مقطر محلول پاشی شده‌است و دسته هشتم بدون هیچ‌گونه محلول‌پاشی به عنوان شاهد انتخاب گردید (جدول۱).

جدول ۱. گروه‌بندی گیاهان و نوع تیمارهای انجام‌شده

نام گروه	نوع تیمار و غلظت
گروه یک	KNO_3-900 PPM/$NH_4H_2PO_4$- 300PPM
گروه دو	$NH_4H_2PO_4$/400ppm
گروه سه	KNO_3/600ppm
گروه چهار	$NH_4H_2PO_4$/300ppm
گروه پنج	KNO_3/900ppm
گروه شش	$NH_4H_2PO_4$/200ppm
گروه هفت	آب مقطر
گروه هشت	شاهد

در فاصله زمانی ۱۶ روز (۵ روز اول ،۶ روز دوم و ۵ روز سوم)، محصول گل با وزن یکسان از هر گروه جمع‌آوری و تقطیر آبی آن با استفاده از دستگاه کلونجر انجام شد(Hydrodistillation). پس از تقطیر، روغن اسانسی آن جمع‌آوری شد و جهت تعیین مواد موجود در روغن اسانسی از دستگاهGC-MS مارک Agilent، سری ۶۸۹۰ واقع در دانشگاه کاشان استفاده گردید.کلیه آنالیزها با سه تکرار مستقل انجام گرفت و سپس نتایج به‌دست آمده از گروه‌ها به کمک نرم‌افزار spss و انجام تست Tukey مورد بررسی قرارگرفت. با استفاده از نرم‌افزار Excel داده‌ها تحلیل و نمودارهای مربوطه رسم شد. همچنین میزان معنی‌دار بودن یا نبودن آن‌ها در سطح $p\leq0.05$ بررسی شد.

۳. نتایج

تاثیر محلول‌پاشی KNO_3 و $NH_4H_2PO_4$ بر میزان روغن اسانس‌های گل‌محمدی با استفاده ازدستگاه GC-MS

مهمترین موادی که دراسانس گل‌محمدی افزایش یافت، شامل سیترونلول و ژرانیول و متیل اوژنول و اوژنول بود. میزان سیترونلول در گروه پنج بیشترین مقدار را دارد پس از آن گروه‌های۴،۱،۶،۲،۳ به‌ترتیب بیشتر تحت تاثیر تیمار مواد مغذی قرار گرفته‌اند.

از دیگر مواد مهم ژرانیول بوده که بعد از سیترونلول بیشترین افزایش را در گروه‌های تیمار دیده داشته است. در گروه ۶بیشترین میزان این ماده تولید شده‌است. پس از آن گروه‌های ۳،۴،۲،۵،۱ قرار دارند.

جدول ۲: نام و میزان مواد موثره اسانس‌ها در گروه‌های مختلف

group	1	2	3	4	5	6	7	8
material (RT)	KNO_3/$NH_4H_2PO_4$	$NH_4H_2PO_4$/ 400ppm	KNO_3/600ppm	$NH_4H_2PO_4$/ 300ppm	KNO_3/900ppm	$NH_4H_2PO_4$/ 200ppm	water	nothing
Z-5-Nonadecene (53.130)	7.82	6.9	0	7.46	6.36	6.24	7.81	12.07
Citronellol (27.291)	22.65	25.87	26.52	21.37	26.69	25.8	13.83	5.54
Geraniol (28.275)	4.03	3.14	2.82	2.93	4.25	4.62	3.43	1.46
b-Caryophyllene (36.064)	0.67	0.81	0.64	0.76	1.59	1.08	1.3	1.36
Methyleugenol (34.876)	1.3	1.52	1.53	1.21	1.44	1.4	0.39	0.41
Heptadecane (46.941)	5.19	5.1	4.86	5.47	4.54	4.44	5.89	7.21
Eicosane (57.211)	2.79	2.43	2.51	2.76	2.28	2.2	2.73	3.36

linalool (20.965)	0.6	0.48	0.5	0.4	0.67	0.87	0.38	0.45
Eugenol (32.910)	0.92	1.44	1.43	1.14	1.56	1.79	0.87	0.61
Nonadecane (54.131)	23.62	20.77	21.69	23.04	19.19	19.23	21.5	25.42
Heneicosane (60.423)	10.83	8.98	9.79	10.25	8.76	8.23	9.35	11.61
Geranyl acetate (33.858)	1.07	0.82	0.65	0.97	1.05	1.04	1.43	1.3
pentadecane (39.094)	1.01	1.12	1.02	1.15	1.05	1.05	1.22	1.93

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به‌دست آمده از میزان ترکیبات اسانسی در اثر تیمار غلظت‌های مختلف KNO3 و NH4H2PO4، بیش از ۵۰ ماده مختلف مشخص شد و مطابق بر مطالعات انجام شده در گذشته (kumar et al. 2016)، به ترتیب مواد زیر بیشترین مقدار را در اسانس تشکیل می‌دهند؛ سیترونلول، نونادکان، هنیکوزان، n–z–نونادکان، هپتادکان، ژرانیول، ایکوزان، متیل اوژنول و اوژنول. گزارش شده است که هر دو ماده مغذی ماکرو و میکرو می‌توانند عملکرد اسانس و کیفیت روغن اسانس را در برخی از گیاهان دارویی افزایش دهند.

مهراب یادگاری در پژوهشی نشان دادکه محلول‌پاشی در مرحله ظاهر شدن جوانه گل باعث افزایش عملکرد گل به دلیل جذب موثر مواد مغذی و افزایش فعالیت‌های فیزیولوژیکی شده‌است. همچنین استفاده از مواد مغذی در برگ‌ها، به انتقال سریع مواد مغذی از طریق بافت‌های برگ به بخش‌هایی از گیاه که دچار کمبود مواد مغذی هستند، کمک شایانی می‌کند.

Pal و همکارانش با استفاده از محلول‌پاشی مواد مغذی گیاهی و کینتین مشاهده نمودند رشد و میزان اسانس در گل‌محمدی زیاد شد. Kumarو همکارانش در سال ۲۰۱۶ به برسی محلول پاشیKNO3 با غلظت های ۷۰۰ppm تا ۱۰۰۰ppm و استفاده از Naclدر آب در حین تقطیر بررسی نموده اند. رسیدند که بهترین میزان اسانس در محلول‌پاشی KNO3/ 900 ppmاست که درصد نرول- سیترونلول را تا ۴۲ درصد و میزان الکل‌های مونوترپن را تا ۲۶ درصد افزایش‌داده‌است. همچنین تاثیر محلول پاشی نیترات کلسیم به تنهایی و به‌همراه کینتین میزان ترکیبات اسانسی نظیر سیترونلول، لینالول، ژرانیول را افزایش داده است.

سهیلا نوجوان و همکارانش در سال ۱۳۹۴ به بررسی تغذیه برگی سولفات پتاسیم و سولفات روی، بر ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی انگور پرداختند. نتایج نشان داد ویژگی‌های شیمیایی از قبیل ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل و فلاونویید کل و آنزیم کاتالاز نیز به طور معنی‌داری تحت تاثیر محلول پاشی قرار گرفتند و میزان فنل کل و آنزیم گایاکول در اثر محلول‌پاشی هر یک از فاکتورها به‌تنهایی افزایش یافته‌است .محلول‌پاشی همزمان این عناصرمی‌تواند موجب افزایش برخی متابولیت‌های ثانویه (فنل، فلاونوئید) و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی شود.

محلول پاشی KNO3 و NH4H2PO4 از نظر تامین عناصر نیتروژن، پتاسیم و فسفر، نقش مهمی در افزایش ترکیبات روغن اسانسی گل محمدی دارد. این تاثیر می‌تواند هم از طریق تاثیر عناصر ذکر شده بر فعالیت‌های آنزیمی مسیر بیوسنتزی ساخت ترکیبات اسانسی و هم از طریق ورود این عناصر به ساختار مولکولی این ترکیبات باشد. سیترونلول به‌عنوان مهمترین ترکیب اسانسی گل محمدی به‌طور فاحشی این تاثیر را نشان داد. با توجه به تشابه ساختاری و اشتراک مسیر متابولیسمی این ترکیبات اسانسی با فنل‌ها و فلاونوئیدها، میزان این دو ترکیب نیز در گیاهان تیمار دیده افزایش یافت. خواص آنتی اکسدانتی نیز تحت تاثیر افزایش فنل، فلاونوئید و ترکیبات اسانسی افزایش معنی‌داری نشان داد. تمامی تیمارهای تاثیر داده شده به‌نوعی افزایش اسانس را به‌دنبال داشتند اما بیش از همه نیترات پتاسیم با غلظت 900ppm اثر افزایشی داشت.

منابع

بتولی ح. صفایی قمی ج. ۱۳۹۱. مقایسه ترکیبهای تشکیل دهنده اسانس گلهای سه ژنوتیپ گل محمدی منطقه کاشان، فصلنامه گیاهان دارویی، ۹(۲): ۱۵۷-۱۶۶.

طباطبایی عقدایی سید رضا و محمد باقر رضایی . ۱۳۸۳. مطالعه تنوع در عملکرد گل محمدی مناطق غربی کشور . فصلنامه پژوهشی گیاهان و دارویی معطر ایران .,جلد ۲۰ شماره ۳ .

شهربانو قلی پور. سید رضا طباطبایی عقدایی ., ۱۳۹۰ .بررسی کاریولوژیکی چهار جمعیت گل محمدی(*Rosa damascene* Mill) .,فصلنامه علمی-پژوهشی گیاه و زیست بوم سال۷، شماره۲۷.

یادگاری مهراب, ناهید علاییان., ۱۳۹۱. اثرات محلولپاشی ریزمغذیها روی برخی صفات عملکردی گیاه همیشه بهار., مجله پژوهش های به زراعی - جلد4، شماره1، بهار1391.

قلی پور سمیرا و غلام رضا زمانی. ۱۳۹۹. تأثیرمحلول پاشی پوترسین و نیترات کلسیم بر برخی صفات فیزیولوژی کنجد در سطوح مختلف رطوبتی., فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد9، شماره39،آذر و دیماه 1399.

نوجوان سهیلا و لطفعلی ناصری. ۱۳۹۴. بررسی تغذیه برگی سولفات پتاسیم و سولفات روی بر ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی انگور. فنآوری تولیدات گیاهی، جلد شانزدهم، شمارهٔ دوم، پاییز و زمستان59.

Rahmani M. , Tabaei-Aghdaei R. 2014. Effect of Cow Manure Rate on Essential Oil Content of Rosa 506amascene Mill . Journal of Medicinal Plants and By-products (2014) 1: 89-91 .

25- Valtcho D. Zheljazkov ., Charles L. Cantrell . ,2011 . , Lemongrass Productivity, Oil Content, and Composition as a Function of Nitrogen, Sulfur, and Harvest Time ., Agronomy Jo u r n l .,Volume 103, Issue 3.

Sabzi-mehrabad z., Lotf R. 2017. Changes in Essential Oil Accumulation of Moldavian Balm (Dracocephalum moldavica L.) as Response to Phosphate Biological and Chemical Fertilizer. journal of Plant Nutrition DOI:10.1080/01904167.2017.1385802.

Jalali Chimeh., Gandomkar A., 2019. Comparison of the Rosa 506amascene Mill's Essence Composition in Climate Change Conditions., Geographical Researches Quarterly Journal. 34(1):37-46.

Pal K.P., Mahajan M., Vijai K., et al. 2019. Foliar application of plant nutrients and kinetin modifies growth and essential oil profile In *Rosa 507amascene* under acidic conditions . Acta Physiol Plant. 38:176 .
Kumar R., Sharma S., Kaundal M., et al. 2016. Variation in Essential Oil Content and Composition of Damask Rose (*Rosa 507amascene* Mill) Flowersby Salt Application Under Mid Hills of the Western Himalayas. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 19 (2): 297 – 306.

Kara N., Erbas S., and Baydar H. 2017. The Effect of Seawater Used for Hydrodistillation on Essential Oil Yield and Composition of Oil-Bearing Rose (*Rosa 507amascene* Mill.). International Journal of Secondary Metabolite. 4(3): 423-428.

Yousefi B., Jaimand K. 2018. Chemical Variation in the Essential Oil of Iranian Rosa damascene Landraces under Semi-arid and Cool Conditions . International Journal of Horticultural Science and Technology. 5(1): 81-92.

Kumar R., Sharma S., Sood S., et al. 2013. Effect of diurnal variability and storage conditions on essential oil content and quality of damask rose (*Rosa 507amascene* Mill.) flowers in north western Himalayas. Scientia Horticulturae. 54: 102–108.

Mohamadi M., Mostafavi A., and Shamspur T. 2011. Effect of Storage on Essential Oil Content and Composition of *Rosa 507amascene* Mill. Petals under Different Conditions . Journal of Essential Oil Bearing Plants. Jeobp 14(4): 430 – 441.

Jalali-Chimeh Z.S., Gandomkar A., Khodagholi M., et al. 2019. Comparison of the Rosa 507amascene Mill's Essence Composition in Climate Change Conditions. Geographical Researches Quarterly Journal. 34(1):37-46.

The effect of micronutrients on the increase of essential oil of *Rosa damascena* Mill. in Kashan

Article title in English (Times New Roman pt.14 Bold)

, Seyed Mohammad-Hosein [*]Mozhgan Alihagi-Qamsari[1], Maryam Khoshsokhan-Mozaffar[2] Razavian[3]

[1] . Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Abstract

Rose essential oil is one of the most important and valuable ingredients in the perfume, pharmaceutical and food industries. Since the essential compounds of this plant are considered as secondary plant metabolites and many elements and chemical compounds are involved in their biosynthesis, in this research, the application of KNO3 and NH4H2PO4 micronutrients was used to increase the amount of essential oil. First, the plants of the same age were selected from the Rosa cultivated in Sardandane area of Qomsar. Two groups of them were sprayed with KNO3 solution with concentrations of 900 ppm and 300 ppm, the other three groups with NH4H2PO4 solution with concentrations of 200 PPM, 300 PPM and 400 PPM, the seventh group with distilled water and the eighth group without any. The foliar spray species was selected as a control. Flowers were collected for essential oil analysis with GC-Mass. The results showed that the amount of citronellol/geranol/methyl eugenol/eugenol in all groups increased the most compared to the control group and distilled water. Considering the effect of micronutrients and chemical elements on the activity of enzymes of the biosynthetic pathway of essential compounds, as well as the entry of elements into the molecular structure of essential compounds, an increase in essential oil is not far from expected.

Keywords (Times New Roman pt.11 Bold): Micronutrient, essential oils, Citronellol, *Rosa damascena*.

[*] e-mail for the corresponding author: m.khoshm@gmail.com

تأثیر آللوپاتیک اسانس مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica* Bunge) و پونه (*Mentha pulegium* L.) بر جوانه‌زنی بذر گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) رقم‌های صفه و فرامان

فاطمه نژاد حبیب وش[1]*، عبدالباسط محمودی[2]

۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

در پژوهش حاضر، توانایی دگرآسیبی اسانس دو گیاه دارویی پونه (*Mentha pulegium* L.) و مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica* Bunge) روی جوانه‌زنی بذور گلرنگ زراعی (*Carthamus tinctorius* L.) دو رقم صفه و فرامان مطالعه شد. به منظور انجام این مطالعه، پژوهشی بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتور اول متشکل از پنج غلظت اسانس شامل ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm و فاکتور دوم شامل دو رقم فرامان و صفه گلرنگ بود. نتایج نشان داد که درصد جوانه‌زنی رقم فرامان تنها در اثر تیمار با اسانس پونه با غلظت ۱۰۰ppm کاهشی با اختلاف معنی‌دار با نمونه شاهد نشان داد. همچنین درصد جوانه‌زنی رقم صفه تحت تیمار هر دو اسانس تنها در دو غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰ ppm نسبت به شاهد دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود. سرعت جوانه‌زنی رقم فرامان و صفه تحت اثر اسانس پونه روندی کاهشی و تحت اثر اسانس مرزه روندی افزایشی نشان داد. شاخص بنیه بذر رقم فرامان تحت تیمار اسانس پونه در هیچ‌یک از تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشته ولی برعکس در تیمار با اسانس مرزه در تمامی غلظت‌ها معنی‌دار بود و بیشترین میزان کاهش این صفت مربوط به غلظت ۵۰۰ppm به مقدار ۵۷/۸٪ بود. در رقم صفه تیمار اسانس پونه تنها در دو غلظت ۱۰۰ و ۱۰۰۰ppm دارای تفاوت معنی‌دار با شاهد بوده ولی در تیمار با اسانس مرزه بختیاری این اختلاف معنی‌دار بود.

واژگان کلیدی: آللوپاتی، پونه، مرزه بختیاری

* e-mail: f.nejadhabibvash@urmia.ac.ir

۱. مقدمه

گلرنگ با نام علمی (*Carthamus tinctorius* L.) گیاهی یک‌ساله، دولپه‌ای و متعلق به راسته سینادره و خانواده Asteraceae می‌باشد (Ekin, 2008). یکی از گیاهان روغنی- دارویی است که تمامی اندام‌های آن مفید می‌باشد. این گیاه در تهیه روغن، دارو و رنگ استفاده می‌شود و از گلچه، بذر، ساقه و برگ‌های آن نیز می‌توان بهره‌برداری کرد (Weiss, 2000). آللوپاتی یک پدیده طبیعی زیست‌محیطی ناشی از تداخل بین موجودات مختلفی مانند قارچ، ویروس، میکروارگانیسم‌ها و گیاهان است که برای مدیریت علف‌های هرز، حشرات و بیماری‌ها در محصولات زراعی بکار برده شده است (ذبحی و همکاران، ۱۳۹۸؛ Farooq et al., 2011). این دسته از متابولیت‌ها در واقع متابولیت‌های ثانویه‌ای می‌باشند که به وسیله گیاهان از متابولیت‌های اولیه ساخته می‌شوند و شامل ترپن‌ها و تانن‌ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، کوئینون‌ها و فنل‌ها می‌باشند که مسئول تحریک رشد و گسترش گونه خودی و مهار علف‌های هرز یا محصولات زراعی هستند (Angelini et al., 2003; Ashrafi et al., 2007; Azirak and Karaman, 2008; Batis et al., 2004; Gitsopoulos et al., 2013; Uremis et al., 2009). در زمینه اثر آللوپاتیک اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان دارویی بر روی گیاهان زراعی و علف‌های هرز مطالعات متعددی انجام شده است. به گونه‌ای که اثر آللوپاتیک اسانس گیاهان رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.)، شیرین بیان (*Glycyrhiza glabra* L.) و بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) باعث کاهش معنی‌دار سرعت و درصد جوانه‌زنی گندم و یولاف وحشی شد (پیرسته انوشه و همکاران، ۱۳۸۹). طی مطالعه‌ای، توانایی دگرآسیبی گیاه پونه‌سای گربه‌ای (*Nepeta cataria*) بر جوانه‌زنی بذرهای سس بررسی شد و نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌های گل، برگ و ساقه این گیاه جوانه‌زنی بذرهای سس را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهند (Jafari, 1991). هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر اسانس سرشاخه‌های گل‌دار پونه کوهی و مرزه بختیاری بر جوانه‌زنی بذرگلرنگ زراعی در شرایط آزمایشگاه می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

بذور گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) رقم فرامان و صفه از شرکت سهامی خاص توسعه کشت دانه‌های روغنی اصفهان در سال ۱۳۹۵ تهیه شدند. بذرها از زمان تولید در جای کاملاً خشک و در دمای ۲۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ۱۰۰ گرم از مواد گیاهی (پونه کوهی و مرزه بختیاری) پس از خشک شدن در سایه و خُرد کردن با دستگاه خردکن، با استفاده از دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب به مدت سه ساعت اسانس‌گیری شدند (British Pharmacopoeia, 1988). غلظت‌های مختلف اسانس این دو گیاه؛ سطح ۱ (۱۰۰ppm)، سطح ۲ (۲۰۰ppm)، سطح ۳ (۵۰۰ppm) و سطح ۴ (۱۰۰۰ ppm) تهیه شدند. برای بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس بر روی صفات جوانه‌زنی بذرگلرنگ رقم فرامان، ۲۰عدد بذر (بذرها با هیپوکلریت سدیم پنج درصد به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی شد و با آب مقطر استریل شده سه بار شستشو داده شدند)، در درون پتری دیش قرار داده شدند و بر اساس طرح فاکتوریل با پنج تیمار و سه تکرار، چهار میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف اسانس به آن اضافه شد.

ظرف‌های مذکور در ژرمیناتور با دمای ۰/۵±۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت۱۴روز قرارداده شدند (Anonymous, 2003). تیمار-های اعمال شده شامل شاهد، غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm بود. به منظور محاسبه سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر از فرمول‌های ۱ تا ۳ استفاده شد (طباطبایی‌زاده و همکاران، ۱۳۹۳).

$$Gs = \sum \frac{ni}{Di} \qquad [۱]$$

در این رابطه؛ *Gs*: سرعت جوانه‌زنی، *ni*: تعداد بذرهای جوانه‌زده در روزهای شمارش و *Di*: تعداد روز پس از شروع آزمایش است.

$$PG = \frac{Ni}{N} \times 100 \qquad [۲]$$

PG: درصد جوانه‌زنی، *Ni*: تعداد بذر جوانه‌زده در روز آخر شمارش و *N*: تعداد کل بذرها می‌باشد.

$$VI = \% Gr \times SL \qquad [۳]$$

VI: شاخص بنیه بذر، *Gr*: درصد جوانه‌زنی و *SL*: طول گیاهچه می‌باشد.

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار آماری *SPSS* استفاده شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از ANOVA انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

۳. نتایج

۱،۳. اثر اسانس بر درصد و سرعت جوانه‌زنی

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۱ نشان داد که اثر نوع اسانس بر صفات درصد و سرعت جوانه‌زنی غیرمعنی‌دار بوده، ولی نوع گیاه دارای اثر معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر روی این صفات بود. اثر متقابل گیاه و اسانس در هیچ‌کدام از شاخص‌ها تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول ۱). مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی بذور گلرنگ رقم فرامان با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که بین درصد جوانه‌زنی نمونه شاهد و نمونه‌های تیمار شده با اسانس پونه تنها تیمار ۱۰۰ppm از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری بود. به گونه‌ای که در این تیمار ۳/۳ درصد از میزان جوانه‌زنی نسبت به شاهد کاسته شده بود. همچنین بین درصد جوانه‌زنی نمونه شاهد همین رقم با نمونه‌های تیمار شده توسط اسانس مرزه در تمامی سطوح هیچ‌گونه اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد. درصد جوانه‌زنی رقم صفه تحت تیمار هر دو اسانس تنها در دو غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰ ppm نسبت به شاهد دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود. در تیمارهای ۱۰۰ppm از اسانس پونه و ۵۰۰ppm از اسانس مرزه به ترتیب درصد جوانه‌زنی ۳/۳ و ۵ درصد افزایش پیدا کرده ولی در دو غلظت دیگر هر دو اسانس به ترتیب ۱/۷ و ۳ درصد از جوانه‌زنی کاسته شده بود (جدول ۲). سرعت جوانه‌زنی رقم فرامان تحت اثر اسانس پونه با افزایش غلظت اسانس تا ۵۰۰ ppm کاهش یافت هرچند که اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت. سرعت جوانه‌زنی همین رقم تحت اثر اسانس مرزه برخلاف اسانس پونه روند افزایشی داشت که بیشترین مقدار آن در تیمار ۱۰۰ppm مشاهده شد اما تفاوت معنی‌دار با نمونه شاهد نداشت. سرعت جوانه‌زنی رقم صفه در اثر تیمار با اسانس پونه کاهش یافت و کمترین مقدار آن نیز در تیمار ۱۰۰۰ppm مشاهده شد اما در اثر تیمار با

اسانس مرزه این شاخصه جوانه‌زنی افزایش پیدا کرد که بیشترین مقدار آن در تیمار با ۲۰۰ppm به دست آمد که با نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان داد (جدول ۲).

جدول ۱. تجزیه واریانس پارامترهای جوانه‌زنی رقم‌های فرامان و صفه تحت تأثیر اسانس پونه کوهی و مرزه بختیاری

		میانگین مربعات		
منبع تغییرات	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	شاخص بنیه بذر
گیاه	۱	۶۱۰۰/۴۱۷**	۴/۲۹۳**	۲۳۶۰۶۵/۵۳۸**
اسانس	۴	۱۸/۱۲۵^{ns}	۰/۱۰۷^{ns}	۱۴۳۴۵۷/۷۳۵**
اسانس×گیاه	۴	۲۲/۲۹۲^{ns}	۰/۱۰۸^{ns}	۲۴۰۱۸//۸۴^{ns}
خطا	۵۲	۷۶/۶۵۱	۰/۱۳۸	۱۰۶۲۵/۲۰۷
ضریب تغییرات ٪		۱۰/۲۰۹	۲۵/۰۸۶	۲۷/۱۲۳

جدول ۲. مقایسه میانگین اثرات اسانس دو گیاه پونه (*M .pulegium*) و مرزه ختیاری (*S. bakhtiarica*) بر جوانه‌زنی دو واریته فرامان و صفه

نوع اسانس	تیمار	درصد جوانه‌زنی (٪)	سرعت جوانه‌زنی	شاخص بنیه بذر
فرامان – پونه	شاهد	۹۸/۳۳۳۳^{a}	۱/۵۰۰۰^{ab}	۵۱۸/۳۳۳۳^{a}
	۱۰۰ppm	۹۵/۰۰۰۰^{ab}	۱/۴۸۳۳^{b}	۸۳۶/۰۰۰۰^{a}
	۲۰۰ppm	۱۰۰/۰۰۰۰^{a}	۱/۴۶۶۷^{a}	۴۳۳/۳۳۳۳^{a}
	۵۰۰ppm	۱۰۰/۰۰۰۰^{a}	۱/۳۳۳۳^{ab}	۴۰۳/۳۳۳۳^{a}
	۱۰۰۰ppm	۹۸/۳۳۳۳^{a}	۱/۷۳۳۳^{a}	۳۷۲/۵۰۰۰^{a}
فرامان – مرزه	شاهد	۹۱/۶۶۶۷^{a}	۱/۶۰۰۰^{a}	۴۷۴/۱۶۶۷^{a}
	۱۰۰ppm	۹۸/۳۳۳۳^{a}	۲/۳۸۳۳^{a}	۴۰۱/۶۶۶۷^{b}
	۲۰۰ppm	۹۳/۳۳۳۳^{a}	۱/۶۶۶۷^{a}	۲۹۱/۶۶۶۷^{ab}
	۵۰۰ppm	۹۰/۰۰۰۰^{a}	۲/۳۱۶۷^{a}	۲۰۰/۶۶۶۷^{b}
	۱۰۰۰ppm	۹۳/۳۳۳۳^{a}	۲/۰۰۰۰^{a}	۳۰۲/۰۰۰۰^{ab}
صفه – پونه	شاهد	۷۸/۳۳۳۳^{b}	۱/۲۰۰۰^{ab}	۴۴۷/۵۰۰۰^{a}
	۱۰۰ppm	۸۱/۶۶۶۷^{bc}	۱/۱۳۳۳^{b}	۴۰۶/۶۶۶۷^{b}
	۲۰۰ppm	۷۶/۶۶۶۷^{b}	۱/۰۸۳۳^{b}	۳۸۵/۰۰۰۰^{a}
	۵۰۰ppm	۷۵/۰۰۰۰^{a}	۱/۱۳۳۳^{b}	۳۴۲/۰۰۰۰^{a}
	۱۰۰۰ppm	۷۱/۶۶۶۷^{b}	۱/۰۵۰۰^{b}	۱۹۵/۵۰۰۰^{bc}
صفه – مرزه	شاهد	۷۵/۰۰۰۰^{b}	۱/۱۵۰۰^{b}	۴۰۳/۱۶۶۷^{a}
	۱۰۰ppm	۷۳/۳۳۳۳^{c}	۱/۳۸۳۳^{b}	۳۲۵/۳۳۳۳^{b}

۲۰۰ppm	۷۳/۳۳۳۳^{b}	۱/۴۳۳۳^{a}	۱۶۰/۱۶۶۷^{b}
۵۰۰ppm	۸۰/۰۰۰۰^{a}	۱/۳۸۳۳^{ab}	۱۹۵/۸۳۳۳^{b}
۱۰۰۰ppm	۷۱/۶۶۶۷^{b}	۱/۱۸۳۳^{b}	۱۱۸/۰۰۰۰^{c}

۲،۳. اثر اسانس بر صفت شاخص بنیه بذر

هر دو اثر اصلی (نوع اسانس و گونه گیاهی) دارای اثر معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر شاخص بنیه بذر بودند (جدول ۱). با توجه به مقایسه میانگین‌ها شاخص بنیه بذر رقم فرامان تحت تیمار اسانس پونه در هیچ‌یک از تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشته ولی برعکس در تیمار با اسانس مرزه در تمامی غلظت‌ها معنی‌دار بود و بیشترین میزان کاهش این صفت مربوط به غلظت ۵۰۰ppm به مقدار ۵۷/۸٪ بود. در رقم صفه تیمار اسانس پونه تنها در دو غلظت ۱۰۰ و ۱۰۰۰ppm دارای تفاوت معنی‌دار با شاهد بوده ولی در تیمار با اسانس مرزه بختیاری با تمام تیمارها این اختلاف معنی‌دار بود. که به ترتیب ۵۶٪ و ۷۰/۷٪ کاهش در غلظت ۱۰۰۰ppm را نشان دادند (جدول ۲).

٤. بحث و نتیجه‌گیری

تأثیر دگرآسیبی گیاهان مختلف بر همدیگر در مطالعه‌های مختلف توسط محققان گزارش شده است (عامری و همکاران، ۱۳۹۱؛ سلطانی‌پور و همکاران، ۱۳۸۵). مواد آللوکمیکال (Allelochemical) ممکن است از طریق تأثیر بر فرایندهای فیزیولوژیکی نظیر تقسیم میتوزی ریشه و هیپوکوتیل، جذب عناصر غذایی، فتوسنتز و تنفس، تشکیل پروتئین، نفوذپذیری غشاء سلول و فعالیت آنزیم‌ها، از رشد و نمو گیاهان ممانعت کنند (صابری و کریمیان، ۱۳۹۶). با توجه به تفاوت‌های مشاهده شده در نتایج مربوط به درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرهای دو رقم مختلف از گیاه گلرنگ تحت اثر دو اسانس متفاوت در واقع نشان‌دهنده این است که واکنش گونه‌ها و رقم‌های مختلف به نوع اسانس و غلظت‌های مختلف، متفاوت است (دلاور و همکاران، ۱۳۹۳). کاهش شاخص‌هایی نظیر درصد و سرعت جوانه‌زنی حاکی از دخالت مواد دگرآسیب در ایجاد اختلال و یا بازداری فرایندهای فیزیولوژیکی جوانه‌زدن می‌باشد (Fuji et al., 2016). نتایج مطالعه‌ای بر روی اثرات دگرآسیبی اسانس گیاه مورخوش بر روی جوانه‌زنی گیاهان زراعی گوجه فرنگی و گندم نشان داد که در گیاه گوجه فرنگی درصد جوانه‌زنی در غلظت ۱۰۰ درصد اسانس به ۶/۷ درصد رسید. این مقدار در نمونه شاهد ۷۰ درصد بود. برای گیاه زراعی گندم درصد جوانه‌زنی در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ درصد اسانس به صفر رسید درحالی‌که برای شاهد ۸۳/۳ درصد بود. در واقع با افزایش غلظت اسانس میزان بازدارندگی اسانس بیشتر شد (سلطانی‌پور و همکاران، ۱۳۸۵). تیمارهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۱۰۰۰ ppm از اسانس پونه بر رقم فرامان بر روی سرعت جوانه‌زنی اثر معنی‌داری داشت ولی در تیمار ۵۰۰ppm این اثر معنی‌دار نبود. در مطالعه اثر گیاهان دارویی اکالیپتوس، رزماری، شیرین بیان و بابونه بر گندم و یولاف وحشی بیشترین و کمترین اثر کاهشی به ترتیب مربوط به رزماری بر روی یولاف وحشی بود و کمترین آن مربوط به اسانس شیرین بیان بود. اسانس ریزوم زنجبیل سفید در غلظت یک درصد باعث کاهش ده درصدی سرعت جوانه‌زنی بذر کاهو شد (Miranda et al., 2015)، که با کاهش این صفت در غلظت بالا در این مطالعه هم‌خوانی داشت.

بر اساس مطالعه میرشکاری (Mirshekari, 2015) روی اثر اسانس گیاهان دارویی در بنیه بذر (Vigor) نشان داد که با افزایش غلظت اسانس از میزان این شاخص کاسته می‌شود به گونه‌ای که تنها نمونه شاهد با غلظت ppm۱۰۰ تفاوت معنی‌دار آماری نشان نداد و با دیگر غلظت‌ها یعنی ppm۲۰۰، ppm۳۰۰ و ppm۴۰۰ مقدار این شاخص تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد داشت و مقدار بنیه بذر در بالاترین غلظت به ۱۳/۷۲ رسید (Mirshekari, 2015)، در مطالعه میراندا و همکاران (Miranda et al., 2015) نیز کاهش بنیه بذر در اثر اسانس برگ و ریزوم زنجبیل سفید مشاهده شد. که این روند کاهش در مطالعه حاضر تنها در تیمار رقم فرامان توسط اسانس پونه تفاوت معنی‌دار آماری نشان نداد و در سایر تیمارها این مقدار معنی‌دار به دست آمد و بیشترین کاهش بنیه بذر نیز در تیمار رقم صفه تحت اثر غلظت ppm ۱۰۰۰ به دست آمد (جدول ۲). کاهش شاخص بنیه بذر با افزایش غلظت اسانس همانند رقم صفه تحت اثر اسانس مرزه در مطالعه تیلاکی و همکاران (۲۰۱۳) مشاهده شد.

منابع

پیرسته انوشه، ه.، امامی، و.، سحرخیز، م. ج. ۱۳۸۹. ارزیابی ویژگی‌های آللوپاتیک چند گیاه دارویی بر برخی صفات جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاه زراعی گندم و علف هرز یولاف وحشی. نشریه پژوهش‌های زراعی ایران. ۹ (۱)، ۱۰۲-۹۵.

دلاور، ح.، سحرخیز، م.، خاتون کازرانی، ن. ۱۳۹۳. بررسی ترکیبات شیمیایی و خواص آللوپاتیک اسانس گیاه آنغوزه (*Ferula assa-foetida* L.). دو ماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۳۰(۳)، ۴۳۳-۴۴۴.

ذبحی، س.ع.، خوانین‌زاده، ع.، غلام‌نژاد، ج.، حکیمی، م.ح. ۱۳۹۸. تأثیر کنترل کنندگی عصاره چند گونه گیاه مرتعی بر بیماری پوسیدگی خیار گلخانه‌ای (مطالعه موردی: اشکذر-یزد). نشریه علمی مرتع. ۱۴(۲)، ۲۴۷-۲۳۴.

سلطانی پور، م.، مرادشاهی، ع.، رضایی، م.، خلدبرین، ب. پ، برازنده، م. ۱۳۸۵. اثرات دگر آسیبی اسانس گیاه مورخوش بر جوانه زنی بذور و رشد دانه گیاهان زراعی گوجه فرنگی و گندم. مجله زیست شناسی ایران. ۱۹(۱)، ۲۸-۱۹.

صابری، م.، کریمیان، و. ۱۳۹۶. تأثیر محرک‌های شیمیایی بر بهبود مؤلفه‌های رشد، حمایت و مقاوم‌سازی گیاه دارویی *Datura stramonium* تحت تنش با ترکیبات آللوپاتیک *Eucalyptus camaldulensis*. نشریه علمی پژوهشی مرتع. ۱۲(۴)، ۴۱۰-۴۰۱.

طباطبایی‌زاده، م. س.، پژوهان، م.، سلطانی، م.، تجملیان، م.، شاه بندری، ر. ۱۳۹۳. اثر آللوپاتی اسانس گیاه دارویی درمنه (*Artemisia aucheri* boiss) بر درصد جوانه زنی و رشد اولیه دو گونه تاج خروس (*Amaranthus retroflexus* L.) و پیچک صحرایی (*Convolvulus arvensis* L.). نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار. ۲۴(۳)، ۹۵-۸۸.

عامری، ع.، ربانی نسب، ح.، جلیلوند، م.، ایمانی، م. ۱۳۹۱. اثرات دگر آسیبی (آللوپاتی) چند گونه علف هرز روی جوانه زنی بذر گیاه دارویی همیشه بهار (*Calendula officinalis*). مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان. ۴ (ویژه نامه فراورده های طبیعی و گیاهان دارویی). ۳۲-۲۳.

Angelini, L.G., Carpanese, G., Cioni, P.L., Morelli, I., Macchia, M., Flamini, G. 2003. Essential oils from Mediterranean Lamiaceae as weed germination inhibitors. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51(21): 6158-6164.

Anonymous. 2003. Hand Book for Seedling Evaluation (3rd ed.). International Seed Testing Association (ISTA), Zurich, Switzerland.

Ashrafi, Z.Y., Mashhadi, H.R., Sadeghi, S. 2007. Allelopathic effects of barley (*Hordeum vulgare*) on germination and growth of wild barley (*Hordeum spontaneum*). Pakistan Journal Weed Science Research. 13: 99-112.

Azirak, S., Karaman, S. 2008. Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weed species. Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science. 58(1): 88-92.

Batis, D.R., Setia, N., Singh, H.P., Kohli, R.K. 2004. Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. Crop Protection. 23(12): 1209-1214.

British Pharmacopoeia. 1988. British pharmacopoeia London HMSO. 137-138.

Ekin, Z. 2008. Resurgence of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) utilization: A global view. Journal of Agronomy. 4: 83-87.

Farooq, M., Jabran, K., Cheema, Z.A., Wahid, A., Siddique, K.H. 2011. The role of allelopathy in agricultural pest management. Pest Management Science. 67(5): 493-506.

Fuji, Y., Furukawa, M., Hayakawa, Y., Sugawara, K., Shibuya, T. 2016. Survey of Japanese medicinal plants for the detection of allelopathic properties. Weed Research. 36: 36-42.

Gitsopoulos, T.K., Chatzopoulou, P., Georgoulas, I. 2013. Effects of Essential Oils of *Lavandula x hybrida* Rev, *Foeniculum vulgare* Mill and *Thymus capitatus* L. on the Germination and Radical Length of *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare* L., *Lolium rigidum* L. and *Phalaris brachystachys* L. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 16(6): 817-825.

Jafari, A. 1991. Evaluation of the allergic effects of Cat Puppy (*Nepeta cataria* L.). Journal of Agriculture and Animal. 2: 24-35.

Miranda, C.A.S.F., Cardoso, M.D.G., Carvalho, M.L.M., Figueiredo, A.C.S., Andrade, J.D. 2015. Chemical characterisation and allelopathic potential of essential oils from leaves and rhizomes of white ginger. Revista Ciência Agronômica. 46: 555-562.

Mirshekari, B. 2015. Allelopatic Effect of Medicinal plants on Emergence Uniformity and Seedling vigor of Weed Plants Case Study: Fennel, Velvetleaf, Bindweed, ARPN. Journal of Agricultural and Biological Science. 10: 16-20.

Uremis, I., Arslan, M., Sungun, M.K. 2009. Herbicial activity of essential oil on the germination of some problem weeds. Asian Journal of Chemistry. 21: 3199-3210.

Weiss, E.A. 2000. Oil Seed Crops. Black Well Science Oxford. 364 p.

Allelopathic effect of (*Satureja bachtiarica*) and (*Mentha pulegium*) essential oils on seed germination of (*Carthamus tinctorius* L.) Faraman & Safeh cultivars

Fatemeh Nejadhabibvash[1*], Abdolbaset Mahmoudi[2]

[1] Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

[2] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

Abstract

In this study, the allelopathic properties of *Mentha pulegium* L. and *Satureja bachtiarica* Bunge essential oil on seed germination of two cultivars Safe and Faraman of *Carthamus tinctorius* L. were done. For this purpose, a research based on a completely randomized design was conducted in three replications. The first factor consisted of five essential oil concentrations including 0, 100, 200, 500 and 1000 ppm, and the second factor included two cultivars of Faraman and Safe safflower. The results showed that the germination percentage of the Faraman decreased with significant difference in comparison by control, only due to the treatment with 100 ppm essential oil of pennyroyal. Also, germination percentage of Safe affected by either two essential oils at 100 and 500 ppm, which had a significant difference with the control. The germination rate of Faraman and Safeh showed a decreasing trend under the effect of pennyroyal essential oil and an increasing trend under the effect of bakhtiari savory essential oil. The seed vigor of Faraman under the treatment of pennyroyal essential oil was not significantly different in any of the treatments, but on the contrary, it was significant in the treatment with bakhtiari savory essential oil in all concentrations, and the highest reduction of this trait was related to the 500 ppm, amounting to 57.8%. The seed vigor of Sofe affected by treatment of pennyroyal essential oil at 100 and 1000 ppm, and in the treatment by all concentration of bakhtiari savory essential oil.

Keywords: Allelopathy, *Mentha pulegium*, *Satureja bachtiarica*

[*] e-mail: f.nejadhabibvash@urmia.ac.ir

تأثیر روش‌های مختلف عصاره گیری بر مقدار ترکیبات پلی فنولی سه گیاه دارویی ترخون، نعناع و شوید

محمد علی شیخ محسنی *، مهسا لطفی

گروه گیاهان دارویی و باغبانی، مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه ، ارومیه

چکیده

برخی از گیاهان دارویی به دلایل مختلفی همچون مزه و طعم مناسب، به صورت روزانه و به عنوان سبزی خوردن مصرف می‌شوند. این گیاهان اغلب خواص مفیدی را نیز به همراه داشته و اثرات مثبتی بر سلامتی انسان می‌گذارند. ترخون، نعناع و شوید از جمله این گیاهان می‌باشند. یکی از مهمترین خصوصیات سبزی‌های خوردن و گیاهان دارویی که ارزش آن‌ها را مشخص می‌کند، محتوای ترکیبات پلی فنولی آن‌ها است. علاوه بر نوع گیاه، روش عصاره‌گیری نیز نقش مهمی در مقدار مواد مؤثره عصاره‌های گیاهی دارد. از این رو در این مقاله محتوای پلی فنولی چند گیاه دارویی پرمصرف به منظور ارزیابی ارزش آنتی اکسیدانی آن‌ها و نیز عملکرد چند روش مختلف عصاره گیری در تهیه عصاره‌هایی با مقدار پلی فنول بالا بررسی شده است. از روش‌های استخراج دینامیکی، استخراج با امواج فراصوت وسوکسله برای عصاره‌گیری از گیاهان ترخون (*Artemisia dracunculus*)، نعناع (*Mentha*) و شوید (*Anethum graveolens*) استفاده شد. نتایج نشان داد هرچند روش عصاره گیری در محتوای ترکیبات پلی فنولی تأثیر دارد ولی به طور کلی مقدار این ترکیبات در گیاه نعناع بیشتر از شوید و ترخون بود. روش عصاره گیری با امواج فراصوت بهترین روش برای تهیه عصاره‌ای با مقدار بالای ترکیبات پلی فنولی مشخص گردید.

واژگان کلیدی: آنتی اکسیدان، حلال هیدروالکلی، التراسونیک، سوکسله.

m.sheikhmohseni@urmia.ac.ir

۱. مقدمه

ترکیبات آنتی اکسیدان از جمله ترکیبات سلامتی بخش هستند که به طور مؤثری از واکنش‌های تولید رادیکال‌های آزاد که سبب آسیب و مرگ سلولی، بروز بیماری‌های قلبی و عروقی و انواع سرطان می‌شود، جلوگیری می کنند. از طرفی نقش و همچنین اثرات سودمند ترکیبات آنتی اکسیدان در جلوگیری و یا به تاخیر انداختن زوال مواد غذایی در اثر فساد اکسایشی از طریق اهدای هیدروژن و جذب رادیکال‌های آزاد و در نتیجه ممانعت از پیشرفت فرایند اکسایشی نیز به اثبات رسیده است (Pisoschi et al., 2021).

امروزه با توجه به اثبات سمیت و خطراتی که ترکیبات آنتی اکسیدان مصنوعی برای سلامتی انسان ایجاد می کند، هدف بسیاری از تحقیقات به جداسازی ترکیبات آنتی اکسیدان ایمن از منابع طبیعی و ارزان قیمت به منظور جایگزینی ترکیبات آنتی اکسیدان مصنوعی معطوف شده است. سبزی‌ها و میوه‌های مختلفی به عنوان منابع غنی از آنتی اکسیدان معرفی می‌شوند. گیاهان دارویی نیز منابع ارزشمندی هستند که علاوه بر استفاده روزمره برای تولید داروهای گیاهی برای انسان در بسیاری از کشورها مورد استفاده قرار می گیرند (Alirezalu et al., 2020).

شوید با نام علمی (*Anethum graveolens*)، گیاهی است یکساله یا دوساله که گاهی بلندی آن به یک متر نیز می‌رسد. ریشه آن راست و مخروطی شکل و سفید است. این گیاه بومی جنوب غربی آسیا و آسیای میانه‌است و امروزه در بیشتر نقاط گیتی کشت می‌شود. شوید آثار درمانی بسیاری دارد از جمله به‌عنوان ضد تشنج، ضد درد، باد شکم، ادرارآور و برای تقویت معده و به عنوان ضد التهاب موضعی به کار می‌رود (ناصری و همکاران، ۱۳۹۱).

جنس *Mentha* یکی از گیاهان متعلق به خانواده نعناعیان می‌باشد که ۶ گونه از آن در ایران یافت می‌شود و با توجه به دارا بودن مقادیر بالای ترکیبات فنولی، به خاصیت آنتی اکسیدانی مشهورند. گونه‌های این جنس عموماً تحت عناوین نعناع و پونه در ایران معروفند و به عنوان گیاهان دارویی، دمنوش وطعم دهنده استفاده می‌شوند. گیاه نعناع تقریبا تمام خواص پونه را دارد؛ ولی برگ‌هایش کرک کمتری دارند و بریدگی‌های کنار برگ‌های آن بیش‌تر از پونه و اسانس آن نیز ملایم‌تر است (Ahmed et al., 2018).

ترخون یا تلخون با نام علمی (*Artemisia dracunculus*)، گیاهی علفی چندساله از جنس *Artemisia* و تیره کاسنی و بومی آسیای میانه و شمالی، قفقاز و خاور دور است. امروزه پرورش آن در تمام نقاط ایران معمول است. علاوه بر ترکیبات تانن و پلی فنولی این گیاه حاوی روغن فرار (اسانس) می‌باشد. مهم‌ترین ترکیب اسانس ترخون متیل کاویکول (استراگول) است که میزان ۷۰–۵۰ درصد از حجم کل روغن را به خود اختصاص داده‌است. ترکیب‌های دیگر روغن فرار شامل کامفن، اسیمن، سابینش، میرس، آئیسول و یوجنول هستند (عباسیان، ۱۳۸۷).

با توجه به اهمیت ترکیبات پلی فنولی در گیاهان و تأثیراتی که این مواد در خواص گیاهان می‌گذارند، در این تحقیق محتوای ترکیبات پلی فنولی در چند گیاه دارویی که به عنوان سبزی خوردن استفاده زیادی دارند، شامل شوید، ترخون و نعناع اندازه گیری شد. همچنین به منظور مشخص کردن بهترین روش عصاره گیری از روش‌های استخراج دینامیکی، استخراج با امواج فراصوت و استخراج پیوسته داغ (سوکسله) استفاده گردید.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. جمع آوری و آماده سازی نمونه‌های گیاهی

نمونه‌های شوید، ترخون و نعناع از نمونه‌های محلی شهرستان میاندوآب تهیه شدند. این نمونه‌ها در سایه و در جریان هوای آزاد خشک شدند.

۲.۲. روش عصاره گیری

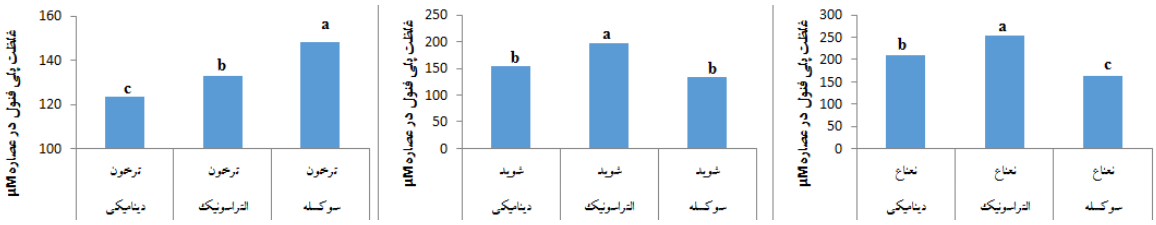
تمام عصاره‌ها با حلال اتانول ۲۵ درصد (۲۵٪ حجمی الکل اتانول و ۷۵٪ حجمی آب مقطر) تهیه شدند. در تمام روش‌های عصاره گیری از مخلوط حلال و نمونه خشک شده گیاهی با نسبت ۵ درصد جرمی گیاه استفاده شد. در عصاره گیری به روش دینامیکی، مخلوط حلال-نمونه‌ی گیاهی را در ارلن ریخته و به مدت ۳ ساعت بوسیله مگنت و همزن مغناطیسی هم زده شد. در عصاره گیری به روش سوکسله، مخلوط حلال-نمونه‌ی گیاهی به کمک سری سوکسله و به مدت یک ساعت عصاره گیری شد. در روش عصاره گیری فراصوت مخلوط حلال-نمونه‌ی گیاهی را در ظرفی دربسته ریخته و به مدت ۲۲ دقیقه در حمام آب دستگاه التراسونیک و تحت امواج فراصوت قرار گرفت. عصاره‌ها به وسیله پارچه ظریف و کاغذ صافی صاف و تا آنالیز در ظرف دربسته تیره و در محلی خنک نگه داری شدند.

۳.۲. روش آنالیز ترکیبات پلی فنولی

عصاره‌ی هیدروالکلی تهیه شده به وسیله حلال آب-اتانول (۲۵:۷۵) جهت اندازه گیری محتوای کل ترکیبات پلی فنولی آنها به دستگاه الکتروآنالیزر معرفی شدند. از استاندارد گالیک اسید به عنوان نماینده پلی‌فنول‌ها در اندازه گیری استفاده گردید. در این روش مقدار کل ترکیبات پلی‌فنولی که خاصیت آنتی اکسیدانی مناسب (قابلیت اکسایش و کاهش) دارند، اندازه گیری می‌شود (Sheikh-Mohseni, 2016).

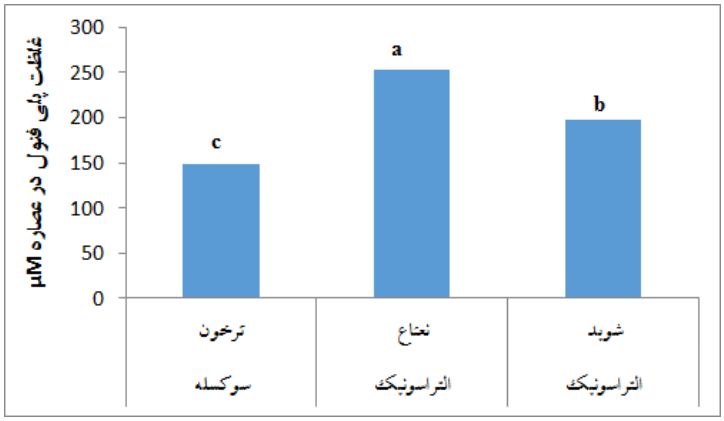
۳. نتایج و بحث

برای مقایسه تأثیر روش عصاره‌گیری بر محتوای ترکیبات پلی فنولی گیاهان، از روش‌های عصاره گیری دینامیکی، اولتراسونیک (امواج فراصوت) و سوکسله استفاده شد. شرایط عصاره گیری در تمامی روش‌ها یکسان بود و فقط زمان استخراج با توجه به عملکرد هر روش و مطالعات قبلی متفاوت بود. به طوری که زمان استخراج در روش دینامیکی ۳ ساعت، در روش سوکسله یک ساعت و در روش التراسونیک ۲۲ دقیقه اعمال شد. غلظت ترکیبات پلی فنولی بر حسب گالیک اسید در روش‌های مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که در دو نمونه گیاهی شوید و نعناع بیشترین مقدار پلی فنول‌ها با روش عصاره گیری التراسونیک به دست می‌آید. اما در نمونه‌ی ترخون، روش سوکسله بیشترین محتوای پلی فنولی را استحصال می‌کند و روش التراسونیک در جایگاه دوم قرار دارد. با این حال به دلیل سرعت بیشتر و سهولت روش عصاره گیری التراسونیک، این روش برای به دست آوردن عصاره‌ای با محتوای بالای ترکیبات پلی فنولی توصیه می‌شود.



شکل ۱. غلظت ترکیبات پلی فنولی موجود درعصاره گیاهان شوید، نعناع و ترخون به دست آمده از روش‌های مختلف عصاره‌گیری

برای بررسی محتوای پلی فنولی گیاهان مختلف در شرایط بهینه هر گیاه، نمودار شکل ۲ رسم گردید. همانطور که دیده می‌شود محتوای پلی فنولی گیاه نعناع از همه بیشتر و گیاه شوید در مرتبه دوم قرار دارد. محتوای این ترکیبات در گیاه ترخون از بقیه کمتر است. از آنجا که بین محتوای ترکیبات پلی فنولی یک گیاه و خاصیت آنتی اکسیدانی آن رابطه‌ای مستقیم وجود دارد، بنابراین می‌توان خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاهان مورد مطالعه را نیز تا حدودی با یکدیگر مقایسه کرد. بنابراین گیاه نعناع بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی و البته در شرایط بهینه عصاره گیری را دارد.



شکل ۲. غلظت ترکیبات پلی فنولی موجود درعصاره گیاهان شوید، نعناع و ترخون به دست آمده از روش‌های بهینه عصاره‌گیری در هر گیاه

٤. نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که روش عصاره گیری تأثیر بسزایی در محتوای ترکیبات پلی فنولی عصاره‌های به دست آمده دارد. هر چند که روش عصاره گیری بهینه در گیاهان مختلف با یکدیگر متفاوت است، اما به طور کلی روش عصاره گیری با امواج فراصوت (التراسونیک) بیشترین بازدهی را در کوتاهترین زمان ممکن دارد. مقایسه محتوای ترکیبات پلی فنولی گیاهان مختلف نشان داد، محتوای این ترکیبات در گیاهان نعناع، شوید و ترخون به ترتیب کمتر می‌شود.

منابع

عباسیان، ا. ۱۳۸۷. زراعت و فرآوری گیاهان دارویی. ویراستار ال. هورنوک. کرج: نشر آموزش کشاورزی.

ناصری، م.، خدادوست، م.، غفاری، ف.، کمالی‌نژاد، م.، شریعت‌پناهی، س.، دواتی، ع.، مظفرپور، س.، استاد، س. ۱۳۹۱. تست‌های حساسیت زایی و تحریک پذیری پوستی حاد بر روی فرآورده موضعی عصاره‌ی روغنی شوید (مرهم شوید). طب سنتی اسلام و ایران. ۱۰ (۳)، ۱۷۴–۱۸۲.

Ahmed, A., Ayoub, K., Chaima, A.J., Hanaa, L. and Abdelaziz, C., 2018. Effect of drying methods on yield, chemical composition and bioactivities of essential oil obtained from Moroccan Mentha pulegium L. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 16, pp.638-643.

Alirezalu, A., Ahmadi, N., Salehi, P., Sonboli, A., Alirezalu, K., Mousavi Khaneghah, A., Barba, F.J., Munekata, P.E. and Lorenzo, J.M., 2020. Physicochemical characterization, antioxidant activity, and phenolic compounds of hawthorn (Crataegus spp.) fruits species for potential use in food applications. Foods, 9(4), p.436.

Pisoschi, A.M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G. and Serban, A.I., 2021. Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. European Journal of Medicinal Chemistry, 209, 112891.

Sheikh-Mohseni, M.A., 2016. Sensitive electrochemical determination of gallic acid: application in estimation of total polyphenols in plant samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry Research*, *3*(2), pp.217-224.

The effect of different extraction methods on the amount of polyphenolic compounds of three medicinal plants: tarragon, mint and dill

, Mahsa Lotfi[*]Mohammad Ali Sheikh-Mohseni

Medicinal Plants and Horticulture group, Shahid Bakeri high education centre of Minadoab, Urmia University, Urmia

Abstract

Some medicinal plants are consumed daily as vegetables for various reasons such as taste. These plants often have useful properties and have positive effects on human health. Tarragon, mint and dill are among these plants. One of the most important characteristics of edible vegetables and medicinal plants that determine their value is the content of their polyphenolic compounds. In addition to the type of plant, the extraction method also plays an important role in the amount of active ingredients of plant extracts. Therefore, in this article, the polyphenolic content of some widely used medicinal plants has been investigated in order to evaluate their antioxidant value and also the performance of several different extraction methods in preparing extracts with high polyphenol content. Dynamic extraction, ultrasonic extraction and Soxhlet were used to extract tarragon (*Artemisia dracunculus*), mint (*Mentha*) and dill (*Anethum graveolens*) plants. The results showed that although the extraction method has an effect on the content of polyphenolic compounds, in general, the amount of these compounds in mint plant was higher than that of dill and tarragon. Extraction method with ultrasonic waves was determined to be the best method for preparing an extract with a high amount of polyphenolic compounds.

Keywords: Antioxidant, Hydro-alcoholic solvent, Ultrasonic, Soxhlet extraction

[*] m.sheikhmohseni@urmia.ac.ir

تأثیر کود نیتروژنی و شدت نور بر برخی ترکیبات بیوشیمیایی برگ سبز چای

احسان کهنه*، سمر رمزی، احمد شیرینفکر و کوروش فلک‌رو

گروه فناوری و مدیریت تولید چای، پژوهشکده چای، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان

چکیده

چای گیاهی سایه دوست است که در محیط اصلی به شرایط زیر تاج‌پوشش درختان جنگلی گرمسیری سازگار شده است. کمبود نور باعث کاهش/کندی تولید بازدارنده‌های فتوسنتزی و بهبود کیفیت نوشیدنی چای می‌شود. استفاده از روش‌های مختلف سایه‌دهی بوته به‌منظور تولید چای سبز باکیفیت اخیراً در مناطق چای¬کاری دنیا افزایش‌یافته است. لذا این پروژه با هدف بررسی اثرات کود نیتروژنی و شدت نور بر کیفیت برگ سبز چای در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با تیمارهای ۱- عدم پوشش بوته+ ۲۵۰ کیلوگرم ۲-عدم پوشش بوته+ ۵۰۰ کیلوگرم ۳- پوشش بوته با سایه‌بان ۵۰٪ + ۲۵۰ کیلوگرم ۴- پوشش بوته با سایه‌بان ۵۰٪ + ۵۰۰ کیلوگرم ۵- پوشش بوته با سایه‌بان ۹۰٪ + ۲۵۰ کیلوگرم ۶- پوشش بوته با سایه‌بان ۹۰٪ رنگ سیاه+ ۵۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در سه تکرار اجرا شد. در هر چین، یک غنچه و دو برگ برداشت و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی برگ سبز اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار کلروفیلa و عصاره آبی در تیمار سایبان ۹۰٪+ ۵۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار مشاهده شد که بترتیب باعث افزایش ۳۷/۲ و ۲۸/۷ درصدی مقدار کلروفیلa و عصاره آبی نسبت به تیمار بدون سایبان با مقدار مصرف کود برابر شد. درمجموع با در نظر گرفتن نتایج حاصله می‌توان نتیجه‌گیری کرد که سایه‌دهی ۹۰٪ و مصرف کود نیتروژنی اثر بهتری بر ویژگی‌های کیفی برگ سبز به‌ویژه مقدار کلروفیل برگ دارد. لذا با توجه به هدف از تولید چای ساخته‌شده می‌توان با تنظیم میزان نور و کود نیتروژنی برگ با کمیت و کیفیت بالاتری برداشت کرد.

واژگان کلیدی: چای، نور، نیتروژن، کیفیت

* ایمیل نویسنده مسئول

E-mail: e.kahneh@areeo.ac.ir

۱. مقدمه

زادگاه اصلی چای، جنوب شرقی آسیا است. چای در زیستگاه اصلی خود، سازگار به شرایط سایه است و در زیراشکوب درختان جنگل‌های بارانی گرمسیری رشد می‌کند؛ بنابراین استفاده از درختان سایبان در چای‌کاری‌ها، نزدیک شدن به شرایط طبیعی است. در سال ۱۹۶۴ با شیوع بیماری بلیستر بلایت در جنوب هند و سریلانکا، پیشنهاد شد که ایجاد سایه در اطراف بوته چای باعث افزایش شیوع بیماری شده است؛ بنابراین به‌تدریج نسبت به کاهش یا حذف درختان سایبان اقدام شد (ادن،۱۹۷۶). نور یکی از مهم‌ترین فاکتورهای محیطی برای تنظیم سرعت رشد گیاهان است. بوته چای به‌طور متوسط حداقل به پنج ساعت نور خورشید نیاز دارد. هوا ابری و بارندگی شدید و مداوم همانند نور مستقیم و شدید خورشید باعث کندی رشد بوته چای و کاهش عملکرد محصول چای می‌شود. معمولاً بوته‌های چای با برگ‌های نیمه ایستا نیاز به سایبان ندارد چون زمانی که برگ‌ها در معرض نور خورشید قرار می‌گیرند خیلی داغ نشده و به نور اجازه عبور به داخل بوته را می‌دهند، به همین دلیل است که در مناطق بدون سایبان، بوته‌های چای با برگ‌های نیمه راست در مقایسه با بوته‌های با برگ افقی، پتانسیل عملکرد بالاتری دارند. سیستم‌های آگروفارستری یا کشت مخلوط درختان، یکی از روش‌های تنظیم شدت نور در چای‌کاری‌ها است که باعث بهبود قابلیت دسترسی عناصر غذایی خاک، تنوع میکروبی خاک و تولید گیاهان موجود می¬شود. درختان سایبان از اجزای ضروری، تولید تجاری چای در چین، هند، سریلانکا و ...هستند؛ اما اجرای ترکیب درختان سایبان- چای به انتخاب درست درخت، تراکم، آرایش فضایی و مدیریت مناسب تاج پوشش درختان سایبان وابسته است. در یک مطالعه میدانی در طیف وسیعی از مناطق با سطوح مختلف سایه طبیعی، گاماژ و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که سطح بهینه سایه زنی برای رشد چای در ارتفاعات پایین‌تر تا ۶۰۰ متر از سطح دریا در منطقه مرطوب سری‌لانکا بین ۳۰ تا ۴۰ درصد است. لی و همکاران (۲۰۱۳) اثر تیمارهای سایه را بر کیفیت چای رقم یابوکیتا بررسی کردند. تفاوت در رنگ، ترکیبات رنگی و طعم چای‌های تولیدشده با تیمارهای مختلف سایه‌دهی (۰، ۱۵، ۱۸ و ۲۰ روز) ارزیابی شد. مقدار کلروفیلa و b در تیمارهای سایه افزایش یافت و در سایه‌دهی ۲۰ روزه به ترتیب ۲/۸ و ۱/۷ برابر بیشتر از کلروفیل در تیمار شاهد بود. تپوز و همکاران (۲۰۱۴) سه هفته قبل از برداشت، تورهای سایه‌انداز که از ورود ۰٪ (شاهد)، ۵۰٪ و ۹۰٪ نور جلوگیری می‌کرد، در ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر بالای گیاهان نصب کردند. مقدار خاکستر چای که نشان‌دهنده کل مواد معدنی است بین ۵/۹۷ تا ۷/۴۹ گرم در ۱۰۰ گرم متغیر بود.بیش از صدسال از ورود و کشت چای به ایران می‌گذرد. در حال حاضر تقریباً ۲۵ هزار هکتار باغ چای با تولید سالانه حدود ۲۵ هزار تن چای خشک وجود دارد. درحالی‌که میزان موردنیاز سالانه چای در ایران حدود ۱۰۰ هزار تن برآورد شده است که لزوماً نیاز به واردات است، ولی می‌توان با روش‌های مدیریت به باغی، بخشی از این نیاز را تأمین کرد. در چند سال اخیر استفاده از سایبان در تعدیل شرایط محیطی برای درختان میوه و باغ‌ها رایج شده است و در ژاپن نیز از انواع سایبان طبیعی و مصنوعی برای تولید چای با ارزش‌افزوده بالا استفاده می‌کنند در این پژوهش به‌عنوان اولین گام تأثیر سایبان‌های رایج بازار بر کمیت و کیفیت برگ سبز چای بررسی شد.

۲. مواد و روش‌ها

این تحقیق در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با شش تیمار شامل ۱- عدم پوشش بوته+ ۲۵۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن ۲-عدم پوشش بوته+ ۵۰۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن - پوشش بوته با سایه‌بان با تراکم ۵۰٪ + ۲۵۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن ۴- پوشش بوته با سایه‌بان با تراکم ۵۰٪ + ۵۰۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن ۵- پوشش بوته با سایه‌بان با تراکم ۹۰٪ + ۲۵۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن ۶- پوشش بوته با سایه‌بان با تراکم ۹۰٪ + ۵۰۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن در سه تکرار در روستای سوستان پشته شهرستان لاهیجان اجرا شد. ابعاد هر یک از تکرارها ۰/۷×۶ متر بود و پوشش¬دهی در دو چین بهاره و تابستانه انجام شد. برای پوشش-دهی از شید گلخانه¬ای ۵۰ و ۹۰ درصد استفاده شد. پوشش¬ها به مدت سه هفته به نحوی روی بوته¬ها قرار گرفت که کنار بوته¬ها نیز پوشانده شود و با استفاده از طناب محکم و ثابت شد. پس از گذشت زمان مورد نظر، پوشش¬ها برداشت شده و برگ¬چینی انجام شد. از هر بوته انتخاب‌شده، یک جوانه و دو برگ که استاندارد برگ‌چینی است با دست برداشت و به آزمایشگاه منتقل شد. برگ‌ها در آزمایشگاه برای انجام آزمایش‌های بعدی، آماده‌سازی شد. برای اندازه‌گیری رنگدانه‌های کلروفیل، برگ‌ها تا زمان انجام آزمایش در فریزر نگهداری شدند. برگ سبز برای اندازه‌گیری مقادیر کلروفیل بر اساس روش آرنون آماده‌سازی شد. سپس جذب مایع رویی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد و مقادیر هر یک با استفاده از فرمول استفاده محاسبه شد (Arnon,1976).درصد عصاره آبی، تانن و خاکستر کل براساس روش‌های استاندارد ملی ایران اندازه¬گیری شد (چراغی و همکاران،۱۳۹۷).داده‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه واریانس شد و در صورت معنی‌دار بودن، مقایسه میانگین با استفاده از آزمون LSD در سطح آماری ۵٪ انجام شد.

۳. نتایج

۱.۳.کلروفیل و عصاره آبی

نتایج تجزیه واریانس (جدول۱) نشان داد که تیمارهای مورداستفاده تأثیر معنی‌داری بر ویژگی‌های برگ سبز چای داشته است.

جدول ۱. خلاصه تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای آزمایشی بر ویژگی‌های بیوشیمیایی برگ سبز چای

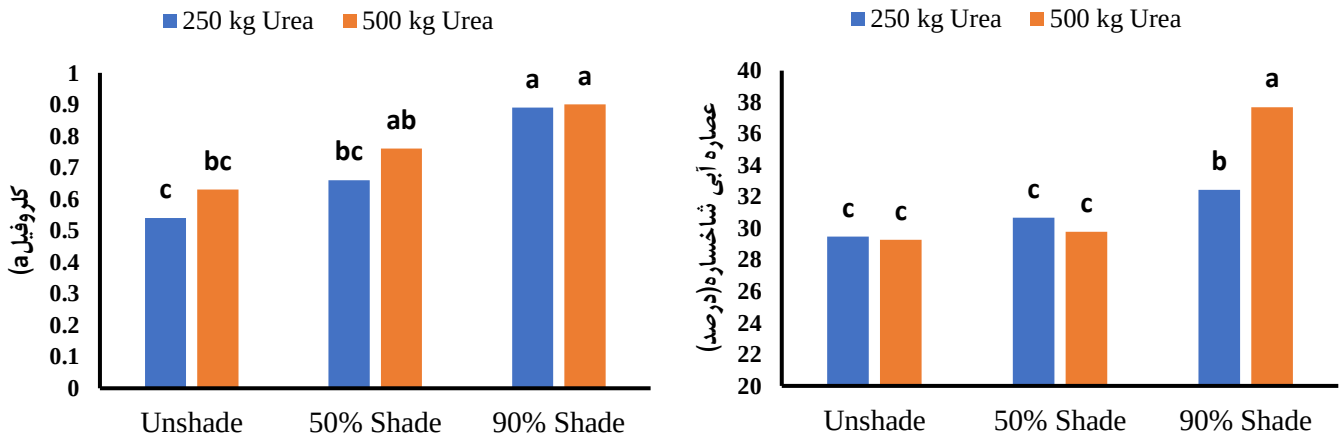
منبع تغییرات		میانگین مربعات			
	درجه آزادی	عصاره آبی	تانن	خاکستر کل	کلروفیل a
بلوک	**۲**	۰/۳۸	۰/۲۴	۰/۰۹۵	۰/۰۴۵
تیمار a	**۵**	۶۲/۱۴**	۳/۰۳**	۰/۴۹**	۰/۱۳**
اشتباه a	**۱۰**	۲/۰۹	۰/۴۳	۰/۰۳۳	۰/۰۳۹
برداشت b	**۱**	۷/۰۲	۰/۱۵	۰/۰۱۵	۰/۰۷۶
تیمار*برداشت	**۵**	۰/۶۷	۰/۰۱۹	۰/۰۰۴	۰/۰۰۶
بلوک*برداشت	**۲**	۰/۳۳	۰/۰۴۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۹
اشتباه b	**۱۰**	۲/۱۵	۰/۰۶۲	۰/۰۰۴	۰/۰۱۷۶

ضریب تغییرات٪	۴/۶۴	۳/۱۵	۱/۱۰	۱۸/۱۸

*

معنی دار سطح احتمال پنج درصد و ^{ns} عدم وجود تفاوت آماری معنی‌دار

با مقایسه میانگین‌ها مشخص شد که افزایش درصد سایه‌دهی و مصرف کود نیتروژنی تأثیر مثبت معنی‌داری بر مقدار کلروفیل a دارد. بیشترین مقدار کلروفیل a در تیمار پوشش سایبانی ۹۰ درصد و مصرف ۵۰۰ کیلوگرم کود نیتروژن در هکتار مشاهده شد، درمجموع سایه‌دهی باعث افزایش ۳۷/۲ درصدی مقدار کلروفیل a نسبت به تیمار بدون سایه‌دهی شد (شکل ۱). سال آزمایش نیز بر مقدار کلروفیل a برگ سبز تأثیر معنی‌دار ندارد (جدول ۱). نتایج تجزیه واریانس (**Error! Reference**



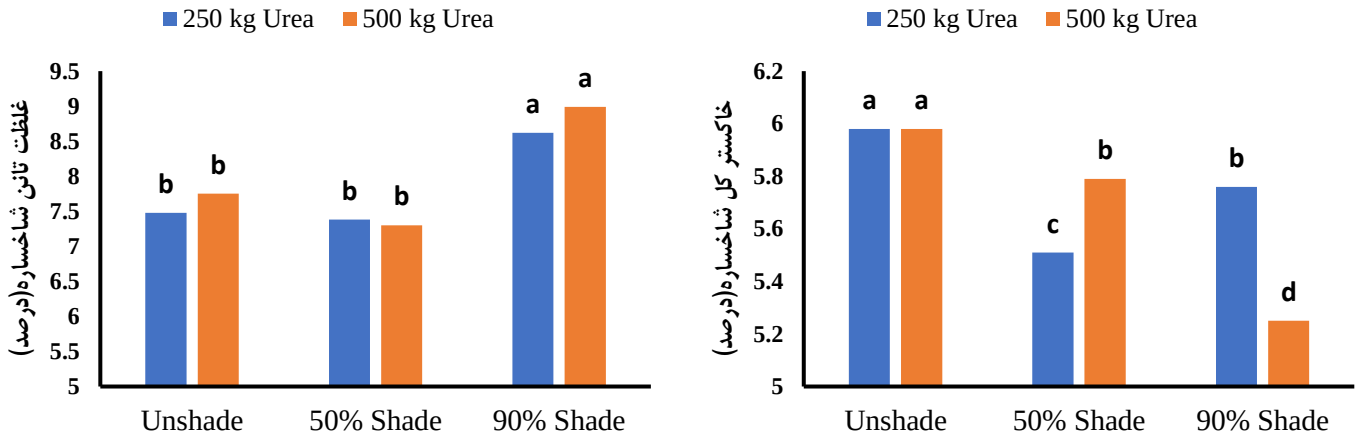
source not found.) نشان داد که تیمارهای مورداستفاده تأثیر معنی‌داری بر مقدار عصاره آبی برگ سبز چای داشته است. با مقایسه میانگین‌ها مشخص شد که بیشترین مقدار عصاره آبی در تیمار ۹۰ درصد پوشش سایبانی و مصرف ۵۰۰ کیلوگرم کود نیتروژنی است که با سایر تیمارها تفاوت آماری معنی‌داری دارد و نسبت به تیمار بدون سایبان با مقدار مصرف کود برابر توانسته مقدار عصاره آبی را ۲۸/۷ درصد افزایش دهد(**Error! Reference source not found.**۱).

شکل ۱. مقایسه میانگین مقدار کلروفیل a و عصاره آبی شاخساره در نهال‌های چای تحت تیمارهای مختلف کود نیتروژنی و شدت نور (میانگین‌های با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.)

۲.۳ .تانن و خاکستر کل

نتایج تجزیه واریانس (**Error! Reference source not found.**) نشان داد که تیمارهای مورداستفاده تأثیر معنی‌داری بر مقدار تانن برگ سبز چای داشته است. با مقایسه میانگین‌ها مشخص شد که بیشترین مقدار تانن در تیمار ۹۰ درصد پوشش سایبانی و مصرف ۵۰۰ کیلوگرم کود نیتروژنی است که با سایر تیمارها تفاوت آماری معنی‌داری دارد و نسبت به تیمار بدون سایبان با مقدار مصرف کود برابر توانسته مقدار تانن را ۶/۰ درصد افزایش دهد (**Error! Reference source not found.**۲).

نتایج تجزیه واریانس (**Error! Reference source not found.**) نشان داد که تیمارهای مورداستفاده تأثیر معنی‌داری بر مقدار خاکستر کل برگ سبز چای داشته است. با مقایسه میانگین‌ها مشخص شد که بیشترین مقدار خاکستر کل در تیمارهای بدون پوشش سایبانی و مصرف کود نیتروژنی است که با سایر تیمارها تفاوت آماری معنی‌داری دارد. باتوجه به نتایج مقایسه میانگین استفاده از پوشش‌های سایبانی توانسته تا حدود ۷/۰ درصد مقدار خاکستر کل برگ را نسبت به تیمار بدون سایبان کاهش دهد (شکل).



شکل ۲. مقایسه میانگین غلظت خاکستر و تانن شاخساره در نهال‌های چای تحت تیمارهای مختلف کود نیتروژنی و شدت نور (میانگین‌های با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.)

٤. بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش مقدار کلروفیل a با سایه‌دهی افزایش یافت اما زمان برداشت تأثیر قابل‌توجهی بر کلروفیل a نداشت. اگرچه محتوای کلروفیل a با افزایش سطوح نیتروژن افزایش یافت اما میزان مصرف نیتروژن تأثیر معنی‌داری بر محتویات کلروفیل a ندارد. براساس نتایج لی (۲۰۰۵) مقدار کلروفیل برگ بر اساس واحد سطح برگ به‌طورکلی تمایل به افزایش در زیر سایه را نشان می‌دهد. افزایش مقدار کلروفیل در این تحقیق با نتایج اندرسون (۱۹۸۶)، چارتزولاکیس و همکاران (۱۹۹۳) و لی (۲۰۰۵) مطابقت دارد. افزایش محتوای کلروفیل ممکن است یک عادت به محیط کم‌نور برای افزایش کارایی استفاده از نور باشد. مطالعات روی گونه‌های مختلف چای ثابت کرد که دما، کیفیت نور و رطوبت بر محتوای کلروفیل گیاه تأثیر می‌گذارد (هوانگ و همکاران، ۲۰۱۷). علاوه بر این، میزان سایه بر رنگ برگ‌های چای نیز تأثیر دارد. گیاهان چای که در محیط سایه‌دار با ۹۸ درصد سایه‌دهی رشد کرده بودند را چن و همکاران (۲۰۱۷) با سایه ۱۰۰٪ به مدت ۲ هفته تیمار کردند و تخریب کلروفیل در برگ‌های چای که منجر به زرد شدن برگ‌ها شد را مشاهده کردند. افزایش میزان سایه تا ۲ درصد می‌تواند فنوتیپ برگ چای را تغییر دهد. بنابراین، مکانیسم واسطه‌ای اثرات شدت‌های مختلف سایه‌دهی در دوره‌های بعدی نیز باید بررسی شود. این یافته‌ها ثابت می‌کنند که سایه باعث تجمع کلروفیل در برگ‌های چای، ازجمله برگ‌های گونه‌های آلبینو می‌شود، که نشان می‌دهد پاسخ گیاه چای به سایه‌دهی در بین گونه‌ها حفظ می‌شود. این پدیده ممکن است منعکس‌کننده مکانیسم تطبیقی گیاهان چای باشد که عموماً اعتقاد بر این است که گونه‌های مقاوم در برابر سایه با محیط‌های کم‌نور هستند.

در طول کشت گیاه چای، ایجاد سایه کافی برای گیاهان می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی کیفیت رنگ چای را بهبود بخشد. برای تولید ماچای ژاپنی، گیاهان چای اغلب به مدت ۳۰-۱۰ روز، ۹۸-۶۰ درصد سایه‌دهی می‌شوند (یاماشیتا و همکاران، ۲۰۲۰). محتوای کلروفیل برگ چای پس از سایه‌دهی به میزان قابل‌توجهی افزایش می‌یابد. در مقایسه با برگ‌های خشک گیاهان چای که بدون سایه رشد می‌کنند، برگ‌های چای خشک گیاهانی که در سایه رشد می‌کنند سبزتر هستند که ارزش اقتصادی آن‌ها را افزایش می‌دهد (سانو و همکاران، ۲۰۱۸). نتایج ارائه‌شده نشان داد که سایه‌دهی نود درصد باعث افزایش درصد عصاره آبی و مقدار تانن شده است. سایه‌دهی پنجاه‌درصد تأثیر معنی‌داری بر مقادیر این خصوصیات نداشت. یو و همکاران (۲۰۲۱) گزارش دادند که صفات زراعی، خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و ساختار داخلی گیاهان چای به‌راحتی تحت تأثیر نور قرار می‌گیرند. به‌عنوان‌مثال، گیاه چای که در نور کامل رشد می‌کند، به دلیل نور شدید دارای برگ‌های کوچک و ضخیم، میانگره های کوتاه و برگ‌های سخت و شکننده خواهد بود. گیاه چای در زیر سایه دارای برگ‌های بزرگ و نازک، میانگره های بلند و برگ‌های نرم است. درمجموع با در نظر گرفتن نتایج حاصله می‌توان نتیجه‌گیری کرد که سایه‌دهی به میزان پنجاه‌درصد همراه با مصرف کود نیتروژنی تأثیر مثبت بیشتری بر عملکرد برگ سبز داشته است در حالیکه سایه‌دهی به میزان نود درصد و مصرف کود نیتروژنی اثر بهتری بر ویژگی‌های کیفی برگ سبز به‌ویژه مقدار کلروفیل برگ دارد. لذا باتوجه به هدف از تولید چای ساخته‌شده می‌توان با تنظیم میزان نور و کود نیتروژنی برگ با کمیت و کیفیت بالاتری برداشت کرد.

تشکر و قدردانی

از مدیریت و همکاران پژوهشکده چای موسسه تحقیقات علوم باغبانی که ما را در انجام و ارتقای کیفی این پژوهش یاری دادند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

چراغی،ک.، روفیگری حقیقت،ش.، متولی جلالی،م.، و محبیان اطاقوری،ص.(۱۳۹۸).روش انجام آزمون های کیفی چای : ۱ - شیمی .دستورالعمل فنی .شماره ۵۷۲۱۳ .پژوهشکده چای .موسسه تحقیقات علوم باغبانی.

Anderson, J. M. (1986). Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. Annual review of plant physiology, 37(1), 93-136.

Arnon, D.S. (1967). Copper enzyme in isolated chloroplast polyphenol oxidase in Beta Vulgaris, journal of Plant Physiology, 24: 1 -15.

Chartzoulakis, K., Therios, I., & Noitsakis, B. (1993). Effects of shading on gas exchange, specific leaf weight and chlorophyll content in four kiwifruit cultivars under field conditions. Journal of horticultural science, 68(4), 605-611.

Chen, M., Zhu, Y., Liu, B., Chen, Z., Zheng, J., Guan, M.. & Yang, W. (2017). Changes in the volatiles, chemical components, and antioxidant activities of Chinese jasmine tea during the scenting processes. International Journal of Food Properties, 20(3), 681-693.

Eden, T. (1976). Tea. Longman Group Limited..

Gamage, A. J., Wijeratne, M. A., & De Costa, W. A. J. M. (2007). Role of shade trees in tea: A low-country perspective. In Proceedings of the 215 th Meeting of the Experiments and Extension Forum. Tea Research Institute of Sri Lanka, Talawakelle, Sri Lanka.

Huang, D., Wang, Y., Chen, X., Wu, J., Wang, H., Tan, R., & Mao, Y. (2022). Application of Tea-Specific Fertilizer Combined with Organic Fertilizer Improves Aroma of Green Tea. Horticulturae, 8(10), 950.

Lee, L. S., Choi, J. H., Son, N., Kim, S. H., Park, J. D., Jang, D. J., ... & Kim, H. J. (2013). Metabolomic analysis of the effect of shade treatment on the nutritional and sensory qualities of green tea. Journal of agricultural and food chemistry, 61(2), 332-338.

Li, J. (2005). The effect of plant mineral nutrition on yield and quality of green tea (Camellia sinensis L.) under field conditions (Doctoral dissertation).

Sano, T., Horie, H., Matsunaga, A., & Hirono, Y. (2018). Effect of shading intensity on morphological and color traits and on chemical components of new tea (Camellia sinensis L.) shoots under direct covering cultivation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 98(15), 5666-5676.

Topuz, A., Dinçer, C., Torun, M., Tontul, I., NADEEM, H. Ş., Haznedar, A., & ÖZDEMİR, F. (2014). Physicochemical properties of Turkish green tea powder: effects of shooting period, shading, and clone. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38(2), 233-241.

Yamashita, H., Tanaka, Y., Umetsu, K., Morita, S., Ono, Y., Suzuki, T., & Ikka, T. (2020). Phenotypic markers reflecting the status of overstressed tea plants subjected to repeated shade cultivation. Frontiers in Plant Science, 11, 556476.

Yue, C., Wang, Z., & Yang, P. (2021). The effect of light on the key pigment compounds of photosensitive etiolated tea plant. Botanical Studies, 62(1), 1-15.

Effect of nitrogen fertilizer and light intensity on some biochemical compounds of green tea leaves

Ehsan Kahneh*, Samar Ramzi, Ahmad Shirinfekrand Korosh Falakro

Department, Tea Research Centre, Horticultural Science Research Institute, AREEO, Lahijan, Iran

Abstract

Tea is a shade-loving plant that has adapted to conditions under the canopy of tropical forest trees in the main environment. Lack of light reduces/slows down the production of photosynthetic inhibitors and improves the quality of the tea drink. The use of different methods of shrub shading to produce high-quality green tea has recently increased in tea-growing regions of the world. Therefore, this project aims to investigate the effects of nitrogen fertilizer and light intensity on the quality of green tea leaves in the form of a CRBD with treatments 1.unshade + 250 kg 2.unshade + 500 kg 3. shade + 50% 250 kg 4.shade 50% + 500 kg 5.shade 90% + 250 kg 6.shade 90% black + 500 kg nitrogen per hectare was implemented in three replication. In each plot, one bud and two leaves were harvested and some biochemical characteristics of green leaves were determined. The results showed that the highest amount of chlorophyll and water extract was observed in 90% + 500 kg N/ha, which increased the amount of chlorophyll and water extract by 37.2 and 28.7%, respectively, compared to the controls. In general, taking into account the obtained results, it can be concluded that 90% shading and N fertilizer use have a better effect on the quality characteristics of green leaves, especially the amount of leaf chlorophyll. Therefore, according to the purpose of tea production, it is possible to harvest leaves with a higher quantity and quality by adjusting the amount of light and N fertilizer.

Keywords: Tea, Nitrogen, Light, Quality

E-mail: e.kahneh@areeo.ac.ir

تغییرات چربی و عملکرد کاملینا (*Camelina sativa*) تحت تاثیر زمان کشت و پرایمینگ بذر در منطقه‌ی بردسکن

رضا جعفری[۱]*، صادق باغبان خلیل‌آباد[۲]، نفیسه تقی زاده[۳]، مجید طاهریان[۴]

[۱] فارغ التحصیل کارشناسی ارشد مهندسی و علوم باغبانی، موسسه آموزش عالی و مرکز علمی جهاد دانشگاهی کاشمر، ایران

[۲] استادیار گروه زراعت موسسه آموزش عالی و مرکز علمی جهاد دانشگاهی کاشمر، ایران

[۳] مدرس موسسه آموزش عالی و مرکز علمی جهاد دانشگاهی کاشمر، ایران

[۴] استادیار مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، ایستگاه تحقیقات کشاورزی کاشمر، ایران

چکیده

گیاه کاملینا *Camelina sativa* جزء خانواده براسیکاسه است و در آزمایشات مختلف نشان داده شده است که احتیاجات آبی بسیار کمتر و مقاومت به سرمای بهاره بیشتری نسبت به سایر گیاهان روغنی بخصوص کلزا دارد. اهمیت به زراعی کاملینا در مناطق مختلف ایران مورد توجه قرار گرفته است. در راستای این مهم، آزمایشی به صورت مزرعه ای در منطقه‌ی بردسکن به صورت اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و دو فاکتور یکی فاکتور اصلی زمان کشت با سه سطح و فاکتور فرعی پرایمینگ بذر در سه سطح اجرا شد، زمان کشت‌های انتخابی ۱ فروردین، ۱۵ فروردین و ۳۰ فرودین ماه است و پرایمینگ بذر اسید هیومیک، نیترات پتاسیم و هیدروپرایمینگ بود. سپس میزان عملکرد دانه و درصد چربی اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات متقابل زمان کشت در پرایمینگ در هر دو صفت در سطح ۱٪ معنی دار شده است. عملکرد دانه در زمان کشت اول بیشترین میانگین و درصد روغن در تاریخ کشت سوم بیشترین میانگین را داشت. و پرایمینگ نیترات پتاسیم در هر دو بیشترین میانگین را داشت. آنالیز همبستگی دو صفت نشان داد که تغییر تیمارها هر دو صفت را همسو و در جهت مثبت با هم تغییر داده است.

واژگان کلیدی: کاملینا، عملکرد دانه،درصد چربی، پرایمینگ، زمان کشت

*nataghizadeh@gmail.com

۱. مقدمه

در سراسر جهان نیاز به دانه‌های روغنی بطور پیوسته توسعه یافته است. در بین محصولات زراعی، دانه‌های روغنی اهمیت خاصی دارند و دارای ذخایر غنی از اسیدهای چرب هستند. روغن های نباتی به‌طور عمده از دانه‌های روغنی نظیر سویا، آفتابگردان، پنبه دانه، بادام زمینی و کلزا به دست می‌آید که نیاز آبی نسبتاً بالایی دارند و علی‌رغم مزیتهای فراوان، خود دارای محدودیتهای از جنبه‌های مختلف کشت و شرایط اقلیمی می‌باشند (کهریزی و همکاران ، ۱۳۹۵). گیاه دارویی- روغنی کاملینا گیاهی است که بخصوص در سالهای اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است و مهمترین مزیت آن مقاومت فوق‌العاده آن به خشکی و سرما است (Kahrizi et al.,2015).

گیاه دارویی-روغنی .*Camelina sativa* L جزء خانواده براسیکاسه است و احتیاجات آبی بسیار کمتر و مقاومت به سرمای بهاره بیشتری نسبت به سایر گیاهان روغنی به‌خصوص کلزا دارد. همچنین این گیاه مقاومت بالایی نسبت به آفات رایج در دانه های روغنی مانند سوسک‌های گرده خوار دارد. پتانسیل تولید عملکرد بالا در گیاه کاملینا به اثبات رسیده و امکان قرار گرفتن آن به عنوان گزینه مناسب در قرار دادن در تناوب با غلات دانه ریز، مناسب گزارش شده است (کهریزی و رستمی، ۱۳۹۴).

تاریخ کشت یکی از مهم‌ترین عوامل قابل توجه در تولید کاملینا است، زیرا این عامل تاثیر زیادی در شرایط محیطی رشد دارد. دما و آب خاک مهم‌ترین عوامل موثر در کمیت و کیفیت دانه کاملینا هستند. دمای بالا می‌تواند سبب عدم باروری گیاه، عدم تکامل جنین، کاهش تعداد دانه و کوتاه شدن دوره پر شدن دانه گردد (Hatfield and Prueger, 2015). Morrison and Stewart (2002) گزارش کردند که گرما سبب کاهش عملکرد دانه در واریته‌ای کلزا که هم خانواده کاملینا است، می‌گردد. دیگر مطالعات نیز نشان داد که غلظت روغن در شرایط دمایی خنک بیشتر است (Zanetti et al., 2017؛Kirkhus et al., 2013). Obour et al. (2017) گزارش کردند که با افزایش دما به بالای ۲۵ درجه سانتیگراد در طول نمو دانه سهم اسیدهای چرب غیر اشباع کاهش می آید. بنابراین تعیین بهترین زمان کشت کاملینا که در آن زمان گیاه در مرحله گلدهی و پر شدن دانه آب کافی و دمای مناسب در اختیار داشته اشد نکته بسیار مهمی است.

پرایمینگ بذر روش فیزیولوژیک پیش از جوانه زنی است که عملکرد بذر را بهبود بخشیده و منجر به جوانه زنی سریع تر و یکنواخت می‌گردد (Patade et al., 2009). بررسی اثر تیمارهای مختلف پرایمینگ بر جوانه‌زنی بذور هندوانه در شرایط تنش اسمزی و دمایی حاکی از کاهش میانگین زمان جوانه زنی و افزایش جوانه‌زنی نهایی بذور هندوانه در تیمارهای هیدروپرایمینگ و پرایمینگ با نمک نیترات پتاسیم نسبت به شاهد بود (Demir and Mavi, 2004). در آزمایشی دیگر، پرایمینگ با نیترات پتاسیم باعث افزایش جوانه‌زنی بذور آفتابگردان در تنش شوری شد و هیدروپرایمینگ بیشترین اثر مثبت را بر رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه داشت (Kaya et al., 2006).

پرایمینگ با نمک‌های کلرید پتاسیم و کلرید کلسیم، افزایش معنی‌داری در سبزشدن نهایی گیاه برنج نسبت به شاهد نشان داد (Rehman et al., 2011). اثر مثبت و معنی‌دار هیدروپرایمینگ و پرایمینگ با نمک کلرید کلسیم بر صفات درصد و سرعت سبزشدن گندم تحت تنش شوری ناشی از خاک مزرعه گزارش شد. همچنین پرایمینگ بذر موجب افزایش شاخص

سطح برگ گندم در طی فصل رشد گردید و بیشترین میزان اختلاف با شاهد در حداکثر مقادیر شاخص سطح برگ به دست آمد (Jafar et al., 2011). همچنین اسموپرایمینگ بذر سویا با نیترات پتاسیم در مقایسه بـا شاهد بیشترین اثر مثبت را بر سطح برگ و ارتفاع گیاه داشت (Mohammadi, 2009). نتایج بدست آمده افزایش ارتفـاع و تعداد برگ در بوته آفتابگردان را در تیمار پرایمینگ با نیترات پتاسیم نشان داده است (Afkari et al.2010).

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. منطقه مورد مطالعه

بذور کاملینا[۱] (رقم سهیل) از مرکز تحقیقات دیم کشور- کرمانشاه دریافت شد. آزمایش فوق به صورت مزرعه‌ای در منطقه‌ی جلال‌آباد بردسکن به صورت اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و دو فاکتور یکی فاکتور اصلی زمان کشت با سه سطح و فاکتور فرعی پرایمینگ بذر در سه سطح اجرا شد.

۲.۲. روش تحقیق

زمان‌کشت‌های انتخابی ۱ فروردین، ۱۵ فروردین و ۳۰ فرودین ماه است و پرایمینگ بذر اسید هیومیک، نیترات پتاسیم و هیدرو پرایمینگ بود. کشت بذور در کرت های ۱/۵ در ۱/۵ متر با فاصله روی ردیف ۵ سانتیمتر و بین ردیف‌ها ۱۵ سانتیمتر به صورت ردیفی با هفت ردیف کشت شد، بذرها ابتدا به علت ریزی بذر با تراکم بیشتر یعنی ۲۰۰ بوته در مترمربع کاشته شد، سپس به تراکم مطلوب ۱۳۴ بوته در مترمربع تنک شدند.

جهت پرایمینگ بذور ابتدا مدت زمان آبنوشی و زمان خروج ریشه چه بذور تعیین شد. این زمان در حدود ۵ ساعت برآورد گردید. سپس بذور بر اساس این زمان در معرض پرایمینگ‌های اسید هیومیک (۰.۲ درصد) دو در هزار (تقی ذوقی و همکاران، ۱۳۹۶)، نیترات پتاسیم (۰.۶ درصد) ۶ در هزار (نورمحمدی و همکاران، ۱۳۹۳) و آب مقطر تیمار و سپس خشک شد. سپس در زمان کشت‌های ۱ فروردین، ۱۵ فروردین و ۳۰ فروردین در عمق کشت ۰.۵ سانتی متر با تراکم ۲۰۰ بوته در متر مربع کشت شدند. بعد از سبز شدن و استقرار گیاهچه‌ها به تراکم ۱۳۴ بوته در مترمربع تنک شدند. آبیاری گیاهان به صورت دوره ای هفته‌ای یکبار انجام گرفت. در مرحله رسیدگی فیزیولوژیک (رطوبت دانه ۱۰ درصد) ۱۰ بوته از هر کرت به طور تصادفی از چهار خط میانی انتخاب و صفات عملکرد دانه و درصد چربی (بذور تیمارهای مختلف پس از پاکسازی از آلودگیهای خارجی با آسیاب دستی پودر شدند. استخراج چربی از نیم گرم از نمونه های پودر شده بذر با استفاده از دستگاه سوکسله و هگزان نرمال به عنوان حلال و به مدت هشت ساعت انجام شد) اندازه‌گیری شد.

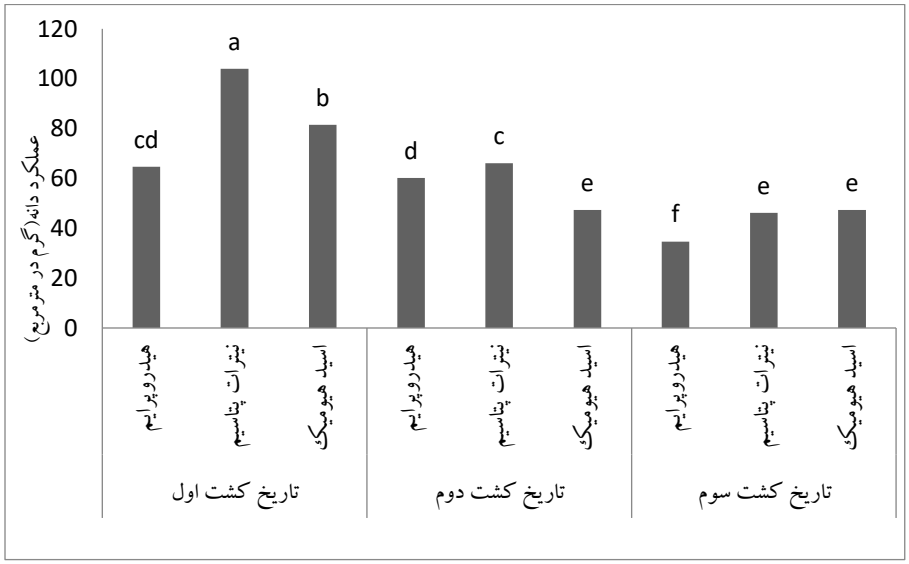
[۱] این بذور حاصل تحقیقات کهریزی و رستمی‌احمدوندی بوده است

نمودار داده‌ها توسط نرم افزار Excel رسم شد و تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS9.0 آنالیز شد و تجزیه واریانس انجام (برای داده های تعداد تبدیل داده با جذر انجام شد) و مقایسه میانگین به کمک آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح معنی‌داری ۱٪ انجام شد.

۳. نتایج

نتیجه تجزیه واریانس صفت عملکرد دانه و درصد چربی نشان داد در هر دو صفت عملکرد دانه و درصد چربی اثر متقابل زمان کشت در پرایمینگ در سطح ۱٪ معنی‌دار شده است. که این نتیجه مطابق نتیجه کهریزی و همکاران (۱۳۹۳) بوده است که تمامی صفات اندازه گیری شده بر روی کاملینا با تغییر متغیرها تغییر نموده اما تعداد بذر در کپسول تغییر معنی‌دار نداشته است.

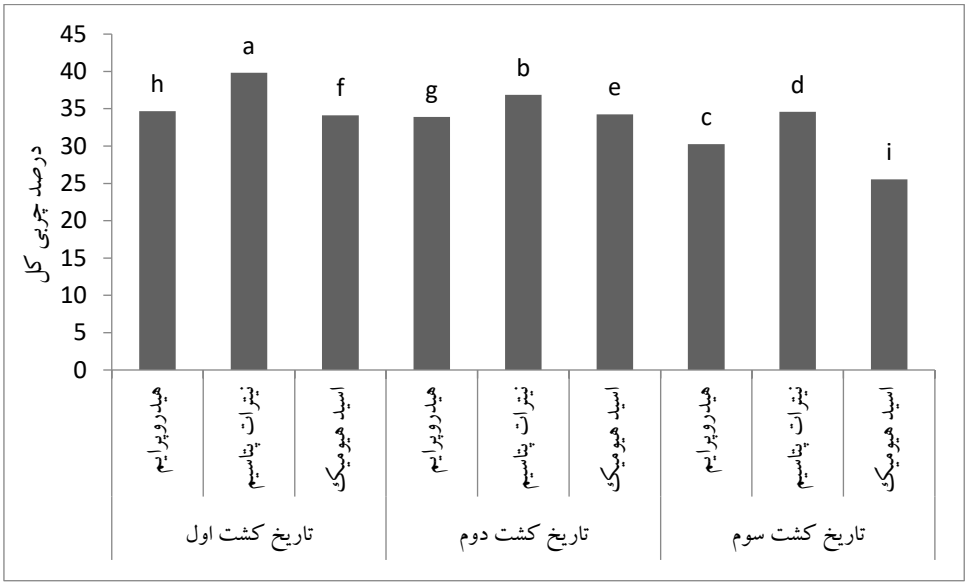
نتایج مقایسه میانگین نشان داد که عملکرد دانه در تیمار زمان کشت اول پرایمینگ نیترات پتاسیم بیشترین میانگین را با مقدار ۱۰۳.۹۵ گرم در مترمربع بوده است، و کمترین میانگین مربوط به زمان کشت سوم پرایمینگ هیدروپرایم با مقدار ۳۴.۶۹ گرم در مترمربع بوده است. بنابراین در این صفت زمان کشت اول و پرایمینگ نیترات پتاسیم بر بقیه تیمارها پیشی گرفته است. علت اینکه زمان کشت اول بهتر بوده مدت حضور بالاتر گیاه در مزرعه و پر شدن درجه روز آن بوده و اینکه نیترات پتاسیم بهتر بوده اثر مثبت عناصر غذایی در عملکرد دانه است (نمودار ۱). احتشامی‌و همکاران (۱۳۹۴)، در مطالعه بر روی تاثیر زمان کشت بر برخی صفات فنولوژیکی و موفولوژیکی کلزا نشان دادند که عملکرد دانه تحت تاثیر زمان کشت قرار می‌گیرد.



نمودار ۱: اثرات متقابل پرایمینگ در زمان کشت مربوط به صفت عملکرد دانه کاملینا (سطح معنی‌داری $\alpha=0.01$)

نتایج مقایسه میانگین درصد چربی کل نشان داد که زمان کشت اول بیشترین میانگین داشته است و پرایم نیترات پتاسیم بیشترین میانگین را دارا بوده است (نمودار۲)، درصد چربی در این تحقیق در بذور کاملینا بین ۳۹-۲۵٪ بوده است براساس گزارش

Tonecea et al. (2013) بر روی ترکیبات چربی گیاه کاملینا در رومانی، محتوای بذر کاملینا دارای ۳۰/۱ -۴۹/۷٪ چربی بوده است. که میزان چربی در این تحقیق در این محدوده برآورد شده است.



نمودار ۲: اثرات متقابل پرایمینگ در زمان کشت مربوط به صفت درصد چربی کاملینا (سطح معنی‌داری $\alpha=0.01$)

مطابق آنالیز همبستگی که برای دو صفت عملکرد دانه و میزان چربی کل انجام شد. میزان همبستگی دو صفت ۰.۶۹ بوده است. این نشان می‌دهد که هر دو صفت در تیمارهای آزمایش همسو و در یک جهت تغییر کرده اند. تاخیر در کشت هر دو صفت را به یک میزان کم کرده است. همچنین تیمار نیترات گتاسیم سبب بهبود هر دو صفت به یک میزان شده است.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که زمان کاشت تاثیر معنی داری بر عملکرد و درصد چربی کل کاملینا داشته است. تاخیر در کاشت به دلیل از دست رفتن زمان مناسب، سبب می‌شود تا گیاه به پتانسیل بالقوه خود نرسد، چرا که خصوصا در منطقه بردسکن رویارویی آخر فصل این محصول از گرما سبب خشک شدن گلها و پر نشدن کامل دانه و کاهش عملکرد می‌گردد، البته این تاخیر بر محتوای چربی نیز اثر منفی گذاشته است.

در مورد پرایمینگ بذور نیز تیمار نیترات پتاسیم خصوصیات بهتری نشان دادند که علت استقرار بهتر این تیمار در مزرعه بود که در سایر تیمارها این استقرار ضعیفتر انجام گرفت. البته پرایمینگ تا حد اندکی کاهش مربوط به تاخیر کشت را جبران می‌نماید اما این پژوهش نشان داد که این میزان بسیار اندک بوده و تغییرات حاصله معنی‌دار نبودند.

نتایج مطابق با این پژوهش نشان دادند که کشت کاملینا در اواخر فوریه و یا اوایل مارس (دهه اول فروردین) عملکرد دانه ی بالاتری در مقایسه با کشت میانه و اواخر و آوریل (اردیبهشت ماه) در مونتانا دارد (McVay and Lamb, 2008). ولی(2014) Gesch نشان داد که دامنه کشت ایده آل کاملینا در مینوستا بین میانه آوریل (اوایل اردیبهشت) تا میانه می(اوایل خرداد) است.

همچنین Sintim et al. (2016) نشان دادند که زمان کشت میانه آوریل (اوایل اردیبهشت) سبب افزایش عملکرد دانه و غلظت چربی در وایومینگ شده است.

پتاسیم به عنوان یکی از عناصر معدنی پر مصرف نقش مهمی‌در فرآیندهای آنزیمی‌و کنترل متابولیسم مواد فتوسنتزی و تبدیل آنه ها به چربی دارد (Amtmann et al., 2005). افزایش در محتوا و عملکرد چربی در شرایط کاربرد پتاسیم و گوگرد توسط Grant et al., 2003 و Farahani et al., 2019 گزارش شده است.

منابع

احتشامی‌م.ر.، تهرانی عارف آ. و صمدی ب. ۱۳۹۴. تاثیر تاریخ کاشت بر برخی صفات فنولوژیکی، موفولوژیکی، عملکرد و اجزای عملکرد پنج رقم کلزا. نشریه زراعت. شماره ۱۰۹. ۱۲۰-۱۱۱.

تقی ذوقی ش.، سلطانی ا.، اله دادی ا.، صادقی ر.،۱۳۹۶. اثر روش های مختلف پرایمینگ بر قابلین انبارداری و جوانه زنی بذر کلزا (*Brassica napus*) لاین کرج ۳ در شرایط تنش شوری. مجله پژوهش های بذر ایران، (۲)۴: ۹۱-۷۹.

کهریزی د.، رستمی‌احمدوندی ح.، اکبرآبادی ع. (۱۳۹۳). امکان سنجی کشت گیاه روغنی- دارویی کاملینا (*Camelina sativa*) در شرایط دیم در استان کرمانشاه. نخستین گزارش در ایران. همایش ملی گیاهان دارویی دیم ایران.

کهریزی د.، کاظمی‌تبار س.ک.، سورنی ج.، رستمی‌احمدوندی ح.، فلاح ف.، اکبرآبادی ع.، رضایی ز.، بکشام م.، (۱۳۹۵)، معرفی کاملینا به عنوان گیاه دارویی- روغنی برای شرایط دیم ایران، همایش ملی اثر تغییر اقلیم در تولید گیاهان، ۱۸ شهریور ۱۳۹۵، ساری، ایران

کهریزی، د.، رستمی احمدوندی ح.، (۱۳۹۴) اولین گزارش کشت و اصلاح کاملینا در ایران، اولین همایش بین المللی و نهمین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران، دانشگاه شهید بهشتی تهران، ایران

نور محمدی ع.، سوهانی دربان ع.، معین راد ج.، ۱۳۹۳. بررسی اثر پیش تیمار نیترات پتاسیم بر جوانه زنی بذر گیاه کلزا تحت تنش شوری. دومین همایش ملی کاربرد گیاهان دارویی در سبک زندگی و طب سنتی. دانشگاه تربت حیدریه. ۱۹ آذر ماه.

Afkari, A. 2010. The effects of NaCl priming on salt tolerance in sunflower germination and seedling grown under salinity conditions. Afric J. Biotech. 9: 1764-1770

Amtmann A, Hammond JP, Armengaud P, and White PJ, 2005. Nutrient sensing and signaling in plants: potassium and phosphorus. Advances in Botanical Research. 43: 209–257.

Demir, I., Mavi, K. 2004. The effect of priming on seedling emergence of differentially matured watermelon (Citrullus lanatus (Thunb.) Matsum and Nakai). seeds. Sci. Hort., 97: 229-237. K. 2004.

Farahani S, Majidi Heravan E, Shirani Rad AH, and Noormohammadi Gh, 2019. Effect of potassium sulfate on quantitative and qualitative characteristics of canola cultivars upon late-season drought stress conditions. Journal of Plant Nutrition. 42(13): 1543-1555.

Gesch, R.W., 2014. Influence of genotype and sowing date on camelina growth and yield in the north central U.S. Industrial Crops and Products. 54, 209–215.

Grant C, Clayton G, and Johnston A, 2003. Sulphur fertilizer and tillage effects on canola seed quality in the Black soil zone of western Canada. Canadian Journal of Plant Science. 83: 745–758.

Hatfield, J. L., and J. H. Prueger. 2015. "Temperature Extremes: Effect on Plant Growth and Development." Weather and Climate Extremes 10: 4–10.

Jafar, M.Z., Farooq, M., Cheema, M.A., Afzal, I., Basra, S. M.A., Wahid, M.A., Aziz, T., and Shahid, M. 2011. Improving the Performance of Wheat by Seed Priming Under Saline Conditions. J. Agron. Crop Sci.14: 1-8.

Kahrizi, D., Rostami-Ahmadvandi, H., Akbarabadi, A. 2015. Feasibility Cultivation of *Camelina* (Camelina sativa) as Medicinal-Oil Plant in Rainfed Conditions in Kermanshah-Iran's First Report. Journal of Medicinal Plants and By-products, 2: 215-218.

Kaya, M.D., Okcu, G., Atak, M., Cıkılı, Y., and Kolsarıcı, O. 2006. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (Helianthus annus L.). Europ. J. Agronomy. 24: 291-295.

Kirkhus, B., A. R. Lundon, J. E. Haugen, G. Vogt, G. I. Borge, and B. I. Henriksen. 2013. "Effects of Environmental Factors on Edible Oil Quality of Organically Grown Camelina Sativa." Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 3179–3185.

McVay, K. A., and P. F. Lamb. 2008. "Camelina Production in Montana." Bull. MT200701AG. Montana State University.

Mohammadi, G.R. 2009. The effect of seed priming on plant traits of late-spring seeded soybean (Glycine max L.). American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 5: 322-326.

Morrison, M. J., and D. W. Stewart. 2002. "Heat Stress during Flowering in Summer Brassica." Crop Science 42: 797–803. doi:10.2135/cropsci2002.7970.

Obour A.K., Obeng E., Mohammed Y.A., Ciampitti I.A., Durrett, T.P. Aznar-Moreno J.A., and C. Chen. 2017. "Camelina Seed Yield and Fatty Acids as Influenced by Genotype and Environment." Agronomy Journal 109:1–11.

Patade, V.Y., Bhargava, S., and Suprasanna, P. 2009. Halopriming imparts tolerance to salt and PEG induced drought stress in Sugarcane. Agric Ecosys. Environ. 134: 24-28

Rehman, H.U., Basra, S.M.A., and Farooq, M. 2011. Field appraisal of seed priming to improve the growth, yield, and quality of direct seeded rice. Turk J. Agric. For. 35: 357-365.

Sintim, H.Y., V.D. Zheljazkov, A.K. Obour, A.G. y Garcia, and T.K. Foulke. 2016. "Evaluating Agronomic Responses of Camelina to Seeding Date under Rain-Fed Conditions." Agronomy Journal 108:349–357.doi:10.2134/agronj2015.0153.

Tonecea I., Necseriu D., Prisecaru T., Balint L., Ghilvacs G., Popa M. 2013. The seed's and oil composition of Camelia – first Romanian cultivar of camelina (Camelina sativa, L. Crantz). Romanian Biotechnological Letters, Vol. 18, No. 5.

Zanetti, F., C. Eynck, M. Christou, M. Krzyżaniak, D. Righini, E. Alexopoulou, M. J. Stolarski, E. N. Van Loo, D. Puttick, and A. Monti. 2017. "Agronomic Performance and Seed Quality Attributes of Camelina (Camelina Sativa L. Crantz) in Multi-Environment Trials across Europe and Canada." Industrial Crops and Products 107: 602–608.

Changes of lipid and yield of Camlina (*Camelina sativa*) influence of planting date and seed priming in Bardaskan region

Reza Jafari[1], Sadegh Baghban Khalilabad[2], Nafise Taghizadeh[3], Majid Taherian[4]

1-MSc. of Horticultural Science and Engineering, ACECR -Khorasan Razavi, Kashmar Higher Education Institute, Kashmar, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Agronomy, ACECR -Khorasan Razavi, Kashmar Higher Education Institute, Kashmar, Iran.

3- Teacher of Horticultural Science and Engineering, ACECR -Khorasan Razavi, Kashmar Higher Education Institute, Kashmar, Iran.

4- Assistant Professor Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center

Abstract (Times New Roman pt.12 Bold)

Camelina sativa is a member of the Brassicaceae family and it has been shown in various experiments that it has much less water needs and more resistance to spring cold than other oil plants, especially rapeseed. The importance of camellia cultivation in different regions of Iran has been noticed. In line with this importance, a field experiment was carried out in the Bardscan region in the form of a split plot in the form of a randomized complete block design with three replications and two factors, the main factor of planting date with three levels and the secondary factor of seed priming at three levels. Selection is Farvardin 1, Farvardin 15 and Farvardin 30, and seed priming was humic acid, potassium nitrate and hydropriming. Then the grain yield and lipid percentage were measured. The results of analysis of variance showed that the interaction effects of cultivation time in priming in both traits were significant at 1% level. The seed yield at the time of the first planting date was the highest average and the lipid percentage was the highest average at the third planting date. And potassium nitrate priming had the highest average in both.

Keywords (Times New Roman pt.11 Bold): Camlina, seed yield, percent lipid, priming, planting date

تکنیک‌های کشت بافت جهت افزایش تولید متابولیت‌های تخصصی در گیاهان دارویی

زینب احمدی[1*]، سید علی اندی[2]

[1*] دانشجوی کارشناسی ارشد فیتوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان

[2] استادیار دانشکده گیاهان دارویی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل

چکیده

جست و جو برای ترکیباتی که می‌توانند سبب درمان و یا پیشگیری بسیاری از بیماری‌ها شوند، سبب شده است که مطالعات گسترده‌ای در جهت شناخت مکانیزم بیوسنتز متابولیت‌های تخصصی در گیاهان دارویی و همچنین افزایش میزان تولید این ترکیبات در شرایط طبیعی و کنترل‌شده صورت گیرد. یکی از مهمترین استراتژی‌ها برای رسیدن به این اهداف استفاده از تکنیک کشت سلول و بافت گیاهان دارویی موردنظر می‌باشد که می‌تواند بر مشکلاتی از قبیل وابستگی تولید متابولیت‌های دارویی به فاکتورهای محیطی در شرایط مزرعه، هزینه بالای سنتز شیمیایی ترکیبات هدف و در بسیاری از موارد عدم سنتز این ترکیبات به دلیل پیچیدگی گسترده در ساختار شیمیایی و ... فائق آید. انواع مختلفی از این تکنیک‌ها از قبیل کشت بافت و اندام، کشت سوسپانسیون سلولی، کشت ریشه‌های مویین، کشت ریشه‌های نابجا و الیسیتیشن به طور قابل توجهی در جهت بهبود تولید متابولیت‌های تخصصی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این مقاله مروری به معرفی برخی از این روش‌ها پرداخته می‌شود و امیدواریم که با افزایش آگاهی در این زمینه در آینده بتوانیم از این روش‌ها در مقیاس انبوه و در بیوراکتورها برای تولید متابولیت‌های تخصصی مورد استفاده در صنایع دارویی، آرایشی، بهداشتی و غذایی استفاده کنیم.

واژگان کلیدی: گیاهان دارویی، متابولیت‌های تخصصی، کشت سلول و بافت

Zeynab1998ahmadi@gmail.com

۱. مقدمه

گیاهان دارویی حاوی منابع ارزشمندی از متابولت‌ها به نام متابولیت‌های تخصصی (Specialized Metabolites) می‌باشند که ارتباط معکوس بین مصرف این گیاهان و بروز بیماری‌های مزمن غیر قابل انتقال مانند بیماری های قلبی عروقی، سرطان، چاقی، دیابت و غیره به اثبات رسیده است (Constabel, 1990). اگرچه این ترکیبات نقش مستقیم در رشد و نمو گیاه ندارند اما در پاسخ به عوامل مختلف استرس زیستی و غیرزیستی گیاه و پاسخ‌های دفاعی آن نقش مهم و کلیدی دارند ، از این رو این ترکیبات را متابولیت‌های تخصصی می‌نامند (Hussain et al., 2012; Rodney et al., 2000). این متابولیت‌ها در صنایع مختلف دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی و همچنین به عنوان آفت‌کش‌ها، طعم‌دهنده‌ها و افزودنی‌های طبیعی موارد کاربرد فراوانی دارند (Balandrin and Klocke, 1988). از آنجایی که این ترکیبات ارزشمند در رشد و نمو گیاه نقش چندانی نداشته و در پاسخ به شرایط تنش و به عنوان یک مکانیسم دفاعی در پاسخ به عوامل مختلف محیطی تولید می‌شوند، بنابراین میزان تجمع این ترکیبات در بافت‌های مختلف گیاه اندک می‌باشد. علاوه بر این، به دلیل ساختار پیچیده آن‌ها سنتز شیمیایی این ترکیبات دشوار و در بسیاری از موارد غیرممکن است. از این رو به نظر می‌رسد که روش‌های آزمایشگاهی و کنترل‌شده می‌توانند روش‌هایی پایدار برای تولید متابولیت‌های تخصصی در جهت برآورده کردن تقاضای بازار باشند. یکی از کارآمدترین روش‌ها به منظور تولید و تکثیر انبوه اندام‌ها و یا مواد مؤثره گیاهان دارویی استفاده از تکنیک کشت بافت به صورت‌های مختلف می‌باشد و می‌تواند جایگزین مناسبی برای تولید و افزایش مقدار متابولیت‌ها نسبت به کشت گیاهان دارویی در مزرعه که با مشکلات مختلفی نظیر بازده کم، ناپایداری در میزان تولید به دلیل تغییرات جغرافیایی، فصلی و محیطی مواجه هستند، باشد (Rao and Ravishankar, 2002).

۱.۲. افزایش متابولیت‌های تخصصی با استفاده از کشت سوسپانسیون سلولی

همان طور که اشاره شده است، کشت سلول‌ها و بافت‌های گیاهی یکی از روش‌های تجاری ممکن در جهت تولید متابولیت‌های تخصصی می‌باشد (Dicosmo and Misawa,1995). در میان روش‌های مختلف تکنیک کشت بافت، کشت سوسپانسیون سلولی به عنوان یک روش کارآمد برای تولید این متابولیت‌ها در اواخر سال ۱۹۶۰ معرفی شد (Tepe and Sokmen, 2007). هم‌اکنون این استراتژی نقشی بسیار ارزشمندی در تولید تجاری متابولیت‌های دارویی ایفا می‌کند و همچنین در تحقیقات زیست‌شناسی سلولی، ژنتیک و بیوشیمی مورد استفاده فراوانی دارد. در مقایسه با سایر روش‌های کشت بافت،کشت سلولی روشی سریع‌تر برای تولید تجاری و گسترده متابولیت‌های دارویی می‌باشد. (Chattopadhyay et al., 2002; Vanisree et al., 2004). اگرچه در این کشت‌ها متابولیت‌های مورد نظر افزایش می‌یابد، پس از مدتی ظرفیت بیوسنتز به دلایل مختلف از جمله تفاوت‌های ژنتیکی و یا تغییرات سوماکلونال کاهش می‌یابد. بنابراین، در این نوع کشت‌ها انتخاب لاین سلولی پربازده و با عملکرد بالا بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Chattopadhyay et al., 2002). در این روش کشت ابتدا از گیاه مادری موردنظر و بسته به آزمایشات مقدماتی از ریزنمونه برتر، در محیط کشت مناسب جامد سلول‌های تمایز نیافته کالوس تولید می‌شوند (Hamburger and Hostettmann 1991). کالوس‌های تولید شده موارد استفاده فراوانی از جمله تکثیر یا القای اندام‌زایی، جنین‌زایی و تولیدکشت

سوسپانسیون سلولی را دارا می‌باشند (Barrales et al., 2019). برای استقرار کشت‌های سلولی کالوس‌های شکننده به محیط کشت مایع که در تمامی اجزای محیط به استثنای آگار مشابه با محیط کشت جامد هستند منتقل شده و در شرایط مناسبی از نور، دما، هوادهی و سایر مؤلفه‌های فیزیولوژی قرار می‌گیرند. با این وجود که استراتژی‌های مختلفی برای ایجاد کشت سلولی نسبتاً همگن استفاده می‌شوند، تحقیقات مختلفی این مورد را تائید می‌کنند که رشد سلول‌ها و بیوسنتز متابولیت‌های تخصصی در کشت سوسپانسیون به شدت به ترکیبات محیط، کیفیت کالوس، تنوع ژنتیکی و... وابسته هستند (Chattopadhyay et al., 2002). کشت سوسپانسیون سلولی در چندین گونه گیاهی با موفقیت به کار گرفته شده است. طبق تحقیقات انجام شده توسط Wang و همکاران در سال ۲۰۰۱ مقدار تاکسول در گونه *Taxus chinensis* از طریق کشت سوسپانسیون سلولی افزایش یافته است. همچنین Rao و همکاران در سال ۲۰۲۱ ، کشت سلولی *Abutilon indicum* را یک روش منحصر به فرد برای تولید انبوه فیتواسترول استیگماسترول در شرایط آزمایشگاهی ارائه کرده‌اند.

۲.۲. افزایش متابولیت‌های تخصصی با ستفاده از کشت ریشه‌های موئین

تولید متابولیت‌های تخصصی از طریق کشت سوسپانسیون سلولی به دلایل مختلفی از جمله ناهمگن بودن کشت‌ها، تجمع بیوماس کم و تولید مقادیر کمی از متابولیت‌ها همیشه نتیجه مطلوبی را ارائه نخواهد داد، بنابراین از روش‌های دیگری نظیر کشت ریشه‌های موئین برای تولید ترکیبات فعال استفاده می‌شود (Giri and Narasu, 2000; Verpoorte et al., 2002; Murthy et al., 2008; Baque et al., 2012)

کشت ریشه‌های موئین به روشی کاربردی در زمینه کشت بافت و اندام گیاهی برای افزایش تولید متابولیت‌های دارویی تبدیل شده است. در این روش از آلودگی ایجاد شده توسط باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز در ریزنمونه‌های گیاه دارویی موردنظر برای تولید ریشه‌ها استفاده می‌شود (Giri and Narasu, 2000; Bourgaud et al., 2001). آگروباکتریوم رایزوژنز یک باکتری گرم منفی می‌باشد که با انتقال به درون ژنوم گیاهان دارویی و در جهت تولید منبع غذایی برای خود باعث ایجاد ریشه‌های موئین در محل عفونت گیاه میزبان می‌شود که این ریشه‌ها منابع غنی از ترکیبات بیواکتیو مربوط به گیاه دارویی میزبان خود می‌باشند(Shanks and Morgan, 1999). گزارش‌های بسیاری نشان می‌دهند که کشت ریشه‌های موئین در تعدادی از گیاهان دارویی در جهت تولید متابولیت‌های تخصصی از جمله ترپنوئیدها، ترکیبات فنولی و ترکیبات حاوی نیتروژن مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Lee et al. 2007). حسینی و همکاران در سال ۱۳۹۷ افزایش میزان ترکیب فنولی رزمارینیک اسید تحت تنش UV را در کشت ریشه‌های موئین گیاه *Dracocephalum kotschyi* گزارش کرده‌اند. همچنین عصاره مخمر سبب افزایش میزان آلکالوئیدهای تروپان در کشت ریشه‌های موئین گیاه *Hyoscyamus reticulatus L*. شده است (محرمی، ۱۳۹۶).

۳.۲. الیسیتیشن

الیسیتور (Elicitor) ماده‌ای است که شروع‌کننده یا بهبوددهنده بیوسنتز یک ترکیب خاص در کشت‌های مختلف از جمله کشت‌های سوسپانسیون سلولی و یا کشت ریشه‌های موئین می‌باشد. الیسیتورها که در غلظت‌های بسیار کم باعث افزایش بیوسنتز متابولیت‌های دارویی می‌شوند (Radman et al., 2003)، را می‌توان به انواع مختلفی طبقه‌بندی کرد. الیسیتورها بر اساس ماهیت به الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی تقسیم می‌شوند. الیسیتورهای غیرزیستی به مواد غیربیولوژیکی گفته می‌شود که عمدتا نمک‌های معدنی مانند یون‌های مس، کادمیم وکلسیم هستند و همچنین عوامل فیزیکی از جمله شرایط PH بالا در این گروه قرار می‌گیرند. الیسیتورهای زیستی به مولکول‌هایی اطلاق می‌شوند که منشاء بیولوژیکی دارند که از آن جمله می‌توان به پلی‌ساکاریدها (پکتین، سلولز، کیتین و گلوکان)، عصاره مخمر و ... اشاره کرد(Veersham, 2004). بسیاری از تحقیقات نشان داده‌اند که الیسیتورها مقدار متابولیت‌ها را در سیستم‌های کشت بافت گیاهی افزایش می‌دهند. به عنوان مثال در کشت سلولی شنبلیله (*Trigonella foenum– graecum*) الیسیتور سالیسیلیک‌اسید منجر به افزایش میزان تریگونلین شد(عربی باف و همکاران، ۱۳۹۵). در تحقیق Afreen و همکاران در سال ۲۰۰۵ مقدار گلیسیریزین در گیاه *Glycyrrhiza uralensis* تحت تاثیر نور UV به عنوان الیسیتور غیرزیستی افزایش یافت و همچنین در تحقیق Wongwicha و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی گیاه *Glycirrhiza infata* افزایش مقدار گلیسیریزین تحت تأثیر الیسیتور مهم متیل‌جاسمونات که یک استر جاسمونیک اسید است و عصاره مخمر به عنوان الیسیتور زیستی مشاهده شد. علاوه بر این Keshavan و همکاران در سال ۲۰۲۲ حداکثر مقدار از آلکالوئید کامپتوتسین را در اثر استفاده از الیسیتور کیتین در سلول‌های تعلیقی گیاه *Nothapodytes nimmoniana* اندازه‌گیری کردند.

۳. بحث و نتیجه‌گیری

گیاهان دارویی منابع مهم و ارزشمندی از متابولیت‌های تخصصی می‌باشند که به طور مستقیم و غیرمستقیم در صنایع مختلف دارویی، آرایشی، بهداشتی و غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از طریق مهندسی متابولیک و استفاده از تکنیک‌های مربوط به کشت بافت از قبیل کشت سوسپانسیون سلولی، کشت ریشه‌های موئین و حتی کشت ریشه‌های نابجا می‌توان بر مقدار محدود این ترکیبات فعال در شرایط طبیعی مزرعه فائق آمد. استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی در این کشت‌ها می‌تواند کمک شایانی به افزایش تولید متابولیت‌های تخصصی کند، اما باید بر اساس پژوهش‌های هدفمند الیسیتورهایی را برگزید که علاوه بر بیوسنتز بیشتر ترکیبات هدف از تجمع بیوماس بالایی نیز برخوردار باشند که در نهایت سبب عملکرد بالای ترکیب مورد نظر گردند. امیدواریم که نتایج استخراج شده از تحقیقات مربوط به این حوزه ما را به سمت تولید انبوه این ترکیبات در مقیاس انبوه بیورآکتورهای آزمایشگاهی، نیمه‌صنعتی و در نهایت صنعتی سوق دهد.

منابع

- ✓ حسینی، ب.، ایوبی، ن.، فتاحی، م.۱۳۹۷. بررسی عامل‌های موثر در القا ریشه موئین و افزایش میزان رزمارینیک‌اسید زرین‌گیاه. مجله علوم باغبانی ایران. ۴۹(۱)، ۳۶۹-۲۵۵.
- ✓ عربی باف، م.، بابائیان جلودار، ن.، باقری، ن. ۱۳۹۵. بررسی اثرسالیسیلیک‌اسید برافزایش میزان متابولیت ثانویه تریگونلین درکشت درون شیشه‌ای *Trigonella foenum– graecum*. مجله علمی ـ پژوهشی زیست فناوری گیاهان زراعی. ۹(۲)، ۱۹-۱۱.
- ✓ محرمی، ف.، حسینی، ب.، فرجامی‌نژاد، م.، شرفی، ع. ۱۳۹۶. تأثیرعصاره مخمر بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تولید آلکالوئیدهای‌تروپانی درکشت ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک(*Hyoscyamus reticulatus* L.). مجله دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۳۳(۳)، ۴۸۰-۴۶۶.

Afreen, F., Zobayed, S.M.A., Kozai, T. 2005. Spectral quality and UV-B stress stimulate glycyrrhizin concentration of *Glycyrrhiza uralensis* in hydroponic and pot system. Plant Physiol Biochem. 43(12):1074-81.

Balandrin, MF., Klocke, JA. 1988. Medicinal, aromatic, and industrial materials from plants. In: Medicinal and aromatic plants. Springer: Berlin.

Barrales, HJ., Reyes, CR., Garcia, IV., Valdez, LGL., De Jesus, AG., Ruiz, JAC., Montoya, JM. 2019. Alkaloids of Pharmacological Importance in *Catharanthus roseus*. Nature and Human Life. 1-18 .

Baque, MA., Moh, SH., Lee, EJ., Zhong, JJ., Paek, KY. 2012. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added. Biotechnology Advances.30(6): 1255-1267.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science. 161(5):839–851.

Chattopadhyay, S. Farkya, S., Srivastava, AK., Bisaria, VS. 2002. Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. Biotechnol Bioprocess Eng. 7(3): 138-149.

Constabel, F. 1990. Medicinal plant biotechnology1. Planta Med. 56:421–425.

DiCosmo, F., Misawa, M. 1985. Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. Trends Biotechnol. 3(12):318–322.

DiCosmo, F., Misawa M. 1995. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. Biotechnol Adv. 13(3):425–453.

Giri, A., Narasu, ML. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnol Adv. 18:1–22.

Hamburger, M., Hostettmann, K. 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. Phytochemistry. 30(12):3864–3874.

Hussain, MS., Fareed, S., Saba, M., Rahman, A., Ahmad, IZ., Saeed, M. 2012. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. J Pharm Bioallied Sci. 4(1):10-20.

Keshavan, B., Santosh Srinivas, N., Muthu Tamizh, M., Vairamani, M., Pachaiappan, R. 2022. In vitro elicitation of Camptothecin by challenging with biotic elicitors in *Nothapodytes nimmoniana (J.Graham) Mabb*. South African Journal of Botany. 144: 325-331

Lee, S. Y., Cho, S. I., Park, M. H., Kim, Y. K., Choi, J.E., Park, S. U. 2007. Growth and rutin production in hairy root cultures of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.). Preparative Biochemistry And Biotechology. 37(3):239-46.

Murthy, HN., Hahn, EJ., Paek, KY. 2008. Adventitious root and secondary metabolism. Chin J Biotechnol 24(5):711–716.

Radman, R., Saez, T., Bucke, C., Keshavarz, T. 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. Biotechnol Appl Biochem. 37(1):91–102.

Rao, K., Chodisetti, B., Gandi, S., Giri, A., Kavi Kishor, P, B. 2021. Cadmium chloride elicitation of Abutilon indicum cell suspension cultures for enhanced stigmasterol production. Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. 163(3):613-618.

Rao, SR., Ravishankar, GA. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol Advances. 20(2):101–153.

Shanks, JV., Morgan, J. 1999. Plant 'hairy root' culture. Curr Opin Biotechnol 10(2):151–155.

Tepe, B., Sokmen, A. 2007. Production and optimisation of rosmarinic acid by *Satureja hortensis* L. callus cultures. Nat Prod Res. 21(13):1133–1144..

Vanisree, M., Chen, YL., Shu-Fung, L., Satish, MN., Chien, YL., HsinSheng, T. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Bott Bull Acad Sin. 45:1–22.

Veersham, C. 2004. Medicinal plant biotechnology. CBS Pub: New Delhi.

Verpoorte, R., Contin, A., Memelink, J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochem Rev 1:13–25.

Wang, C., wu, J., wei, X. 2001. Enhanced taxol production and release in Taxus chinensis cell suspension cultures with selected organic solvents and sucrose feeding. Biotechol Prog. 17(1):89-94.

Wongwicha ,W., Tanaka, H., Shoyama, Y., Putalun, W. 2011. Methyl jasmonate elicitation enhances glycyrrhizin production in *Glycyrrhiza inflata* hairy roots cultures. Z Naturforsch C J Biosci. 66(7-8):423-8.

Tissue culture techniques to increase the production of specialized metabolites in medicinal plants

Zeynab Ahmadi[1*], Seyed Ali Andi[2]

[1] M.Sc. Degree Student, Department of Chemistry, Golestan University, Gorgan

[2] Assistant Proffessor, Faculty of Medicinal Plants, Amol University of Special Modern Technologies, Amol

Abstract

The search for compounds that can cure or prevent many diseases has led to extensive studies to understand the biosynthesis mechanism of specialized metabolites in medicinal plants and also to increase the production of these compounds in natural and controlled conditions. One of the most important strategies to achieve these purposes is the use of cell and tissue culture techniques of medicinal plants, which can overcome problems such as the dependence of the production of medicinal metabolites on environmental factors in field conditions, the high cost of chemical synthesis of desired compounds and also the lack of synthesis of these compounds due to the extensive complexity in the chemical structure. Various types of these techniques such as tissue and organ culture, cell suspension culture, hairy roots culture, adventitious roots culture and elicitation have been significantly used to improve the production of specialized metabolites. In this review article, some of these methods are introduced and we hope that with increasing awareness in this field in the future, we will be able to produce specialized metabolites used in the pharmaceutical, cosmetic, hygiene and food industries on a mass scale in bioreactor systems.

Keywords: Medicinal Plants, Specialized Metabolites, Tissue and Cell Culture

* zeynab1998ahmadi@gmail.com

تولید ترکیبات فعال زیستی در گیاهان دارویی با استفاده از باکتری‌های محرک رشد

معظمه حسینی عباس‌آبادی[۱]، مریم دهجی‌پور حیدرآبادی[۱]*، روح‌اله صابری ریسه[۲]

[۱] گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان

[۲] گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان

چکیده

ترکیبات فعال زیستی گیاهان دارویی از دیرباز به عنوان افزودنی‌های غذایی و هم‌چنین درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. ارزش عصاره گیاه به‌عنوان داروهای گیاهی، به تولید متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط بسیاری از گیاهان دارویی نسبت داده شده است. علاقه به کشت گیاهان دارویی برای برداشت ترکیبات فعال زیستی به طور قابل توجهی در سراسر جهان افزایش یافته است. این افزایش تقاضا، نیاز به تولید گیاهان دارویی در مقیاس صنعتی را با استفاده از تکنولوژی‌های نوین زیستی سوق داده است تا ضمن افزایش تولید، کیفیت و سلامت گیاهان دارویی را هم تأمین کند. تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی غالباً تحت تأثیر محرک‌ها با تحریک پاسخ‌های فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و تجمع فیتوالکسین رخ می‌دهد. تأثیر مثبت کاربرد باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه بر پارامترهای رشدی، بهبود تولید مواد زیست فعال و هم‌چنین کیفیت گیاهان دارویی به‌عنوان یک روش نوین زیستی و دوستدار محیط زیست به اثبات رسیده است.

واژگان کلیدی: باکتری محرک رشد، گیاهان دارویی، متابولیت‌های ثانویه، محرک زیستی

* e-mail: m.dahaji@vru.ac.ir

۱. مقدمه

امروزه به‌دلیل آگاه‌شدن جوامع نسبت به عوارض منفی داروهای شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها رویکرد عمومی به مصرف گیاهان دارویی در حال افزایش است. نیاز صنایع دارویی، غذایی و بهداشتی به گیاهان دارویی به عنوان مواد اولیه تولیدات صنایع مذکور، به حدی زیاد است که امکان تامین آن به‌صورت سنتی و از طبیعت غیر ممکن می‌باشد. بنابراین، افزایش سطح زیر کشت گیاهان دارویی امری اجتناب ناپذیر است. استفاده از تکنولوژی‌های نوین زیستی، تولید گیاهان دارویی در مقیاس بزرگ همراه با افزایش تولید، کیفیت و سلامت گیاهان دارویی را فراهم کرده است (Arun et al., 2012). خواص درمانی گیاهان دارویی، به ترکیباتی به نام متابولیت‌های ثانویه نسبت داده می‌شود که مجموعه‌ای مفید از ترکیبات طبیعی مانند اسانس‌ها، اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، تانن‌ها و غیره هستند (Gonçalves and Romano, 2018). تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان معمولاً بسیار کم (کمتر از ۱٪ وزن خشک با نوسانات قابل توجه بسته به عوامل درون‌زا و برون‌زا) است (Thakur et al., 2019). یافتن استراتژی‌های عملی کارآمد برای افزایش متابولیت‌های ثانویه و تعدیل ترکیب آنها، علاوه بر بهبود زیست توده گیاهی، چالشی مداوم برای محققان در سراسر جهان ایجاد کرده است (Riahi et al., 2019). تأثیر مثبت کاربرد باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه بر پارامترهای رشدی، بهبود تولید مواد زیست فعال و هم‌چنین کیفیت گیاهان دارویی به‌عنوان یک روش نوین زیستی و دوستدار محیط زیست به اثبات رسیده است. باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه[1] گروهی از باکتری‌های خاک هستند که بهبود کیفیت و کمیت رشد گیاه را به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم موجب می‌شوند. باکتری‌های محرک رشد گیاه با تولید سیدروفورها، حفظ تعادل هورمونی با تولید هورمون‌های محرک رشد و هم‌چنین القای مقاومت سیستمیک در گیاهان، علاوه بر بهبود شاخص‌های رشدی و فیزیولوژیکی، افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه را در گیاهان موجب شده است (Tsukanova et al., 2017). متابولیت‌های ثانویه گیاهی نقش‌های بسیاری از جمله دفاع در برابر پاتوژن‌ها، آفات و گیاهخواران و پاسخ به تنش‌های محیطی را ایفا می‌کنند. به‌طورمشابه، باکتری‌های همزیست با گیاه در بسیاری از فرآیندهای فوق به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم با تنظیم متابولیسم گیاه شرکت می‌کنند. نتایج مطالعات زیاد در زمینه‌ی کاربرد باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد در گیاهان دارویی تاییدکننده‌ی این موضوع است که باکتری‌های مذکور از طریق فراهمی عناصر غذایی برای گیاه، حفظ تعادل هورمونی در گیاهان، تاثیر مثبت بر مورفولوژی ریشه وکنترل زیستی بیماری‌های گیاهی، سبب بهبود شاخص‌های رشدی، فیزیولوژیکی و تولید متابولیت‌های ثانویه شده‌اند. هم‌چنین افزایش متابولیت‌های ثانویه در حضور باکتری‌های محرک رشد گیاه به افزایش تولید ماده‌ی خشک نیز ارتباط داده شده است (Pang et al., 2021). استفاده از باکتری محرک رشد *Pseudomonas fluorescens* در گیاه بذرالبنج[2] افزایش میزان تروپان آلکالوئید هیوسیامین را به دنبال داشت (Ghorbanpour and Hatami, 2014). استفاده از سه باکتری محرک رشد *Pseudomonas rhizophila*، *Halomonas desertis* و *Oceanobacillus iheyensis* به عنوان محرک

[1] Plant Growth-Promoting Rhizobacteria
[2] *Hyoscyamus niger*

زیستی علاوه بر مشاهده اثرات مثبت بر پارامترهای رشد و رنگیزه‌های فتوسنتزی، افزایش قابل ملاحظه‌ای در متابولیت‌های ثانویه مانند ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاه سداب[1] را موجب شده است (Riahi et al., 2020).

۲. باکتری‌های محرک رشد گیاه

باکتری‌های محرک رشد گیاهی معمولاً به صورت باکتری‌های آزاد در خاک مستقیماً در اطراف ریزوسفر گیاه وجود دارند. این باکتری‌ها عموماً از طریق زخم‌ها و ترک‌های ریشه، از ریزوسفر وارد گیاه می‌شوند. تقریباً تمام ۳۰۰۰۰ گونه گیاهی جهان حاوی چندین باکتری اندوفیت مختلف (تقریباً ۱۰۸-۱۰۵ سلول در هر گرم از بافت گیاهی) و هم‌چنین تعداد زیادی اندوفیت قارچی هستند. نکته مهم این است که اندوفیت‌های باکتریایی می‌توانند در داخل بافت‌های گیاهی در یک رابطه متقابل با گیاه بدون اینکه به گیاه آسیبی وارد کنند یا از رشد آن جلوگیری کنند رشد کنند (Glick, 2020).

۳. اهمیت متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی

مطالعات نشان داده است که متابولیت‌های ثانویه در سازگاری و بقای گیاهانی که آنها را سنتز می‌کنند نقش دارند. خواص گیاهان دارویی، به ترکیباتی به نام متابولیت‌های ثانویه نسبت داده می‌شود که منحصر به گونه خاص بوده و اغلب طی یک دوره خاصی از رشد و نمو در گیاه تولید می‌شوند. این ترکیبات دارای عملکردهای اکولوژیکی مهم در گیاهان هستند و نقش حفاظتی در مقابل گیاه‌خواران و عوامل بیماری‌زای میکروبی و همچنین جذب گرده افشان‌ها ایفا می‌کنند. برخی از این ترکیبات مهم در گیاهان دارویی در جدول ۱ آورده شده است (Rizvi et al., 2022).

جدول ۱. متابولیت‌های ثانویه تولید شده در تعدادی گیاهان دارویی مهم

گیاه دارویی	متابولیت‌های ثانویه (ترکیبات فعال زیستی)
Mentha piperita	هسپریدین، دیوسمین، دیدایمین و اسید رزمارینیک
Aloe vera	آلوئین، لوپئول، آنتراکینون و اسید سینامیک
Ocimum sanctum	اوژنول، کارواکرول، اسید رزمارینیک و اسید الینولیک
Dracocephalum moldavica	اسید کوماریک، اسید کلروژنیک، اپیژنین، فلاونوئید
Cuminum cyminum	کومارین، آنتراکینون، استروئید و فلاونوئید
Datura inoxia	ترپنوئید، فنل، فلاونوئید و ساپونین

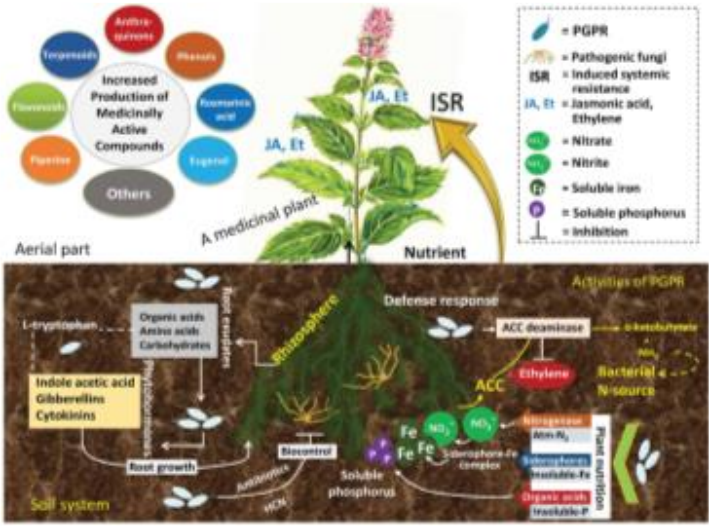
[1] *Pelargonium graveolens*

٤. تأثیر باکتری‌های محرک رشد بر رشد و عملکرد گیاهان دارویی

داده‌های تأثیر باکتری‌های محرک رشد بر عملکرد گیاهان دارویی، به‌دلیل آزمایش‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای محدودی که به طور خاص میانکنش گیاه دارویی و این باکتری‌ها را هدف قرار داده باشد بسیار اندک است. هم‌چنین، مکانیسم‌ها و مسیرهای مربوط به سنتز متابولیت‌های گیاهی ثانویه نیز هنوز به‌طور کامل شناخته نشده‌اند. باکتری‌های محرک رشد ممکن است با گیاهان دارویی همانند سایر گیاهان زراعی در تعامل باشند. در شکل ۱ نقش باکتری‌های محرک رشد بر افزایش کیفیت ترکیبات زیستی فعال در گیاهان دارویی نشان داده شده است.

٥. افزایش ترکیبات فعال زیستی در گیاه با استفاده از باکتری‌های محرک رشد

تأثیر سودمند تعدادی از باکتری‌های محرک رشد گیاهی بر رشد و نمو برخی گیاهان دارویی به‌طور خلاصه در جدول ۲ آورده شده است (Rizvi et al., 2022).



شکل ۱. تأثیر باکتری‌های محرک رشد بر متحرک سازی مواد غذایی، تأمین فیتوهورمون‌ها و دفاع گیاه علیه بیماریزاهای میکروبی با افزایش خواص بیوشیمیایی و تولید ترکیبات فعال زیستی گیاهان دارویی (Rizvi et al., 2022)

جدول ۲. تاثیر باکتری‌های محرک رشد گیاه بر صفات بیوشیمیایی و عملکرد گیاهان دارویی

گیاه دارویی	تلقیح زیستی مورد استفاده	صفات بیوشیمیایی و عملکرد
Limonium sinense	*Bacillus flexus*	افزایش سنتز کلروفیل و فلاونوئیدها، تنظیم اسمزی، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تنظیم هموستازی سدیم/پتاسیم
Papaver somniferum	*Pseudomonas putida*	تولید IAA، بهبود رشد و عملکرد، افزایش سنتز کلروفیل و هدایت روزنه‌ای

Mentha pulegium	*Azotobacter chroococcum* *Azospirillum brasilense*	کاهش مقاومت به خشکی، افزایش تولید اسید اسکوربیک، قندهای محلول، پروتئین‌ها، فلاونوئیدها، فنل کل و مونوترپن‌ها
Dracocephalum moldavica	*Micrococcus yunnanensis* *Claroideoglomus etunicatum*	افزایش فتوسنتز، تجمع مواد مغذی و ماده خشک، محتوای بیشتر رزمارینیک اسید، اوژنول، هسپرتین و کوماریک اسید
Mentha piperita	*Bacillus amyloliquefaciens* *Pseudomonas fluorescens*	بهبود پارامترهای مختلف رشد گیاه مانند تعداد برگ، زیست توده، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی غشا و تنش اکسیداتیو و افزایش محتوای فنل
Mentha piperita	*Pseudomonas fluorescens* *P. putida* *B. subtilis*	افزایش اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک با افزایش تراکم کرک‌های ترشحی
Mentha arvensis	*Bacillus flexus* *Steno trophomonas* spp. *Brevibacterium halotolerans*	افزایش فتوسنتز، محتوای روغن بیشتر و تجمع مواد مغذی
Stevia rebaudiana	*PGPR strains*	تولید IAA
Mentha piperita	*P. fluorescens* *P. putida* *B. subtilis*	افزایش انتشار ترکیبات آلی فرار و فنل‌ها
Ocimum basilicum	*Pseudomonas* sp. *Azospi rillum* sp. *Bacillus* sp. *Azoto bacter* sp	افزایش تجمع ماده خشک در اندام هوایی و اسانس
Hyptis Suaveolens	*Bacillus pumilus* *Pseudomonas Pseudoalcaligenes*	کاهش تاثیر شوری، افزایش کاروتنوئیدها و کلروفیل
Handroanthus Ochraceus	*Azospirillum brasilense*	افزایش حجم ریشه، تجمع ماده خشک، افزایش تراکم یا اندازه کرک‌های ترشحی
Codonopsis pilosula	*Bacillus amyloliquefaciens*	افزایش محتوای لوبتیولین

٦. نتیجه‌گیری

از آنجایی که کشت گیاهان دارویی به شدت توسط تنش‌های غیرزیستی و استفاده از مواد شیمیایی در کشاورزی تهدید می‌شود استفاده از باکتری‌های محرک رشد در این راستا راه حل‌هایی ارزان و دوستدار محیط زیست جهت افزایش رشد، عملکرد و کیفیت ترکیبات زیستی گیاهان دارویی ارائه کرده است. استفاده از این باکتری‌های مفید چهار مزیت ۱) صرفه‌جویی و کاهش مصرف کودها و آفت کش‌ها، ۲) حفاظت از کیفیت خاک و تنوع زیستی، ۳) احیای سطح کشت گیاهان دارویی در حال انقراض و ۴) در دسترس بودن داروهای طبیعی با هزینه نسبتاً کم و در نتیجه بهبود سیستم‌های سلامت انسان را به همراه خواهد داشت. بنابراین، بهبود رشد و عملکرد ترکیبات زیستی فعال گیاهان دارویی با استفاده از باکتری‌های محرک رشد، راه‌های جدیدی را در توسعه داروهای گیاهی ارزان باز کرده که در هنگام ناتوانی سیستم‌های بهداشت و درمان کارآمد خواهد بود.

منابع

Arun, B., Gopinath, B., Sharma, S. 2012. Plant growth promoting potential of bacteria isolated on N free media from rhizosphere of Cassia occidentalis. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 28: 2849-2857.

Ghorbanpour, M., Hatami. M. 2014. Biopriming of *Salvia officinalis* seed with growth promoting rhizobacteria affects invigoration and germination indices. Journal of Biological and Environmental Sciences. 8(22): 29-36.

Glick, B.R. 2020. Beneficial Plant-Bacterial Interactions. In: Beneficial Plant-Bacterial Interactions Springer: Cham.

Gonçalves, S., Romano, A. 2018. Production of plant secondary metabolites by using biotechnological tools. Secondary Metabolites - Sources and Applications. 5: 81-99.

Pang, Z., Chen. J., Wang. T., Gao. C., Li. Z., Guo. L., Xu. J., Cheng., Y. 2021. Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: a review. Frontiers in Plant Science. 12: 621276.

Riahi, L., Cherif. H., Miladi, S., Neifar, M., Bejaoui, B., Chouchane, H., Masmoudi, A.S., Cherif, A .2020. Use of plant growth promoting bacteria as an efficient biotechnological tool to enhance the biomass and secondary metabolites production of the industrial crop *Pelargonium graveolens* L'Hér. under semi-controlled conditions. Industrial Crops and Products. 154: 112721.

Riahi, L., Chograni, H., Masmoudi, A.S., Cherif, A. 2019. Genetic resources of Tunisian *Artemisia arborescens* L. (Asteraceae), pattern of volatile metabolites concentration and bioactivity and implication for conservation. Biochemical Systematics and Ecology. 87: 103952.

Rizvi, A., Ahmed, B., Khan, M.S., El-Beltagi, H.S., Umar, S., Lee, J. 2022. Bioprospecting plant growth promoting rhizobacteria for enhancing the biological properties and phytochemical composition of medicinally important crops. Molecules. 27(4): 1-31.

Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P.K., Puri, S., 2019. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. 12: 1–12.

Tsukanova, K., Meyer, J., Bibikova, T. 2017. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on plant hormone homeostasis. South African Journal of Botany. 113: 91-102.

Production of bioactive compounds in medicinal plants using plant growth promoting bacteria

, Roohallah Saberi *Moazameh Hosseini Abasabadi[1], Maryam Dahajipour Heidarabadi[1] Riseh[2]

[1] Department of Genetics and Plant Production, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran
[2] Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

Abstract

Traditionally, bioactive compounds of medicinal plant have long been used as food additives and for curing many health-related ailments. The importance of plant extracts as herbal medicines has been attributed to the production of secondary metabolites produced by many medicinal plants. Interest in the cultivation of medicinal plants to harvest bio-active compounds has increased considerably worldwide. This increased demand has driven the need to produce medicinal plants on an industrial scale using modern biological technologies to ensure the quality and health of medicinal plants while increasing production. Accumulation of secondary metabolites in medicinal plants often occurs under the influence of elicitors by stimulating physiological and morphological responses and phytoalexin accumulation. The positive effect of the application of plant growth promoting rhizobacteria on growth parameters, improving the production of bioactive compounds and also the quality of medicinal plants has been proven as a new biological and environmentally friendly method.

Keywords: Bio-elicitor, Growth promoting bacteria, Medicinal plants, Secondary metabolites

* e-mail: m.dahaji@vru.ac.ir

خواص آنتی اکسیدانی برخی از گیاهان خانواده ی نعناع در شهرستان مراغه

مهین کاظمی[1*]

[1] بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه، شهر مراغه

چکیده

مطالعه حاضر به بررسی مکانیسم اثر آنتی اکسیدان هفت گونه‌ی گیاهی از خانواده نعناع پرداخته است. گونه های *Mentha arvensis*، *Mentha spicata*، *Ocimum basilicum*، *Ocimum sanctum*، *Salvia officinalis*، *Thymus vulgaris* و *Origanum vulgare* از فراوان‌ترین گونه‌های یافت شده برای این خانواده در منطقه‌ی مراغه هستند. این گیاهان غنی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و دارای فعالیت آنتی‌اکسیدان قوی هستند که در طب سنتی برای درمان سرماخوردگی، تب و اختلالات گوارشی، قلبی عروقی و تنفسی استفاده می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد که اکثر گیاهان مورد مطالعه به طور بالقوه منبع خوبی از عوامل دارویی هستند. در طب سنتی با توجه به ارزان و در دسترس بودن گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های مختلف توصیه می‌شود از این گیاهان بعنوان پیشگیری از بیماری‌های مختلف، کمک به درمان بعضی بیماری‌ها ازآنها استفاده شود.

واژگان کلیدی: گیاهان دارویی، آنتی اکسیدان، رادیکال آزاد، تنش اکسیداتیو

E-mail: kazemi.kazemi.mahin@gmail.com.

۱. مقدمه

با توجه به نقش بالقوه در صنایع غذایی و سلامت انسان، آنتی‌اکسیدان ها در سراسر جهان محبوبیت پیدا می‌کنند. آنتی اکسیدان ها به عنوان ماده‌ای تعریف می‌شوند که حتی در مقادیر کم، قادر به جلوگیری یا به تعویق انداختن اکسیداسیون موادی که به راحتی قابل اکسید شدن هستند. آنتی‌اکسیدان همچنین به عنوان ماده‌ای تعریف می‌شود که قادر به مهار آنزیم‌های اکسید کننده خاص است یا ماده‌ای که با عوامل اکسید کننده قبل از آسیب رساندن به مولکول‌های دیگر واکنش می دهد یا ماده‌ای که یون های فلزی را جدا می‌کند یا حتی ماده‌ای که قادر به ترمیم سیستمی مانند پروتین انتقال دهنده آهن است. به این ترتیب، تولید رادیکال‌های آزاد و دیگر گونه‌های فعال اکسیژن در بدن انسان توسط فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متعدد گزارش شده است (Bhatt, et al., 2013). رادیکال‌های آزاد مولکول‌ها و اتم‌هایی هستند که به دلیل داشتن الکترون آزاد حاوی انرژی بالایی هستند و قادرند به بافت‌ها و سلول‌ها آسیب برسانند. این مولکول‌ها در غلظت‌های فیزیولوژیکی برای عملکرد نرمال سلول (سیگنالینگ و تنظیم ردوکس) ضروری هستند و در غلظت‌های بالا باعث ایجاد وضعیتی به نام استرس اکسیداتیو می‌شوند. به دلیل عدم پایداری تمایل بسیار شدیدی برای واکنش با دیگر مولکول‌ها داشته و بدین ترتیب باعث آسیب به لیپیدها، پروتئین‌ها، DNA و تخریب سلول می‌شوند. (زرگری، ۱۳۹۹)

رادیکال‌های آزاد به عنوان محصول فرعی واکنش‌های فسفریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری تولید می‌شوند.۲ ٪ اکسیژن مصرف شده توسط میتوکندری به آنیون سوپر اکسید تبدیل میشود که پیش ساز سایر رادیکال‌های آزاد می‌باشد که می‌توانند منجر به آسیب اکسیداتیو پروتئین‌ها، لیپید و DNA گردد. آنیون سوپر اکسید همچنین می‌تواند با رادیکال‌های NO (تولید شده توسط نیتریک اکساید سنتاز طی تبدیل آرژینین به سیترولین) واکنش داده و منجر به تولید رادیکال پراکسی نیتریت گردد که سمی بوده و با بیو مولکول‌ها واکنش می‌دهد (زرگری، ۱۳۹۹). در طی فعالیت‌های نرمال سلولی، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و نیتروژن (RNS) تولید می‌شوند. گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) (یک اصطلاح کلی است که بیان کننده رادیکال های آزاد مشتق از O2) مانند سوپراکسید آنیون ($O2^{\cdot -}$) و رادیکال‌های هیدروکسیل ($HO^{\cdot}$) و گونه‌های غیر رادیکالی مشتق از O2 مانند هیدروژن پراکسید ($H2O2$) می‌باشد که به‌طور مداوم در ارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. آن‌ها گونه های گذرایی هستند که قدرت واکنش پذیری بالایی با DNA، پروتئین، کربوهیدرات و لیپیدها دارند. گونه‌های نیتروژن فعال (RNS) نیز اکنون به‌عنوان رادیکال‌های مهم شناخته شده‌اند. اکسید نیتریک (NO) درون سلولی می‌تواند در اشکال مختلف شیمیایی (NO^{-}، NO^{+}، $NO^{\cdot}$) وجود داشته باشد. همچنین NO می‌تواند با $O2^{\cdot -}$ ترکیب و به فرم پراکسی نیتریت ($ONOO^{-}$) درآید که می‌تواند آزادانه در داخل و میان سلول‌ها پخش شود(خوش طبیعت و مهدوی، ۱۳۹۴). انواع رادیکال‌های آزاد که می‌تواند منشا داخل سلول یا خارج سلولی داشته باشد در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: انواع رادیکال‌های آزاد که می‌تواند منشا داخل سلول یا خارج سلولی داشته باشد

Reactive Oxygen Species		Non Free-Radical Species	
Hydroxyl radical	HO•	Hydrogen peroxide	H_2O_2
Superoxide radical	O_2•	Singlet oxygen	$^1O_2$
Hydroperoxyl radical	HOO•	Ozone	O_3
Lipid radical	L•	Lipid hydroperoxide	LOOH
Lipid peroxyl radical	LOO•	Hypochlorous acid	HOCl
Peroxyl radical	ROO•	Peroxynitrite	$ONOO^-$
Lipid alkoxyl radical	LO•	Dinitrogen trioxide	N_2O_3
Nitrogen dioxide radical	NO_2•	Nitrous acid	HNO_2
Nitric oxide radical	NO•	Nitryl chloride	NO_2Cl
Thiyl radical	RS•	Nitroxyl anion	NO^-
Protein radical	P•	Nitrosyl cation	NO^+

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. منطقه مورد مطالعه

مراغه شهری در شمال ایران در حاشیه رودخانه صوفی چای است. در جنوب غربی استان آذربایجان شرقی واقع شده است و در حاشیه کوه سهند و فاصله آن تا تبریز ۱۳۰ کیلومتر است. موقعیت جغرافیایی تقریبی آن ۴۶ درجه و ۱۶ دقیقه شرقی و ۳۷ درجه و ۲۳ دقیقه شمالی است. میانگین ارتفاع آن از سطح دریا ۱۹۰۱ متر (۶۲۳۷ فوت) با میانگین حداقل، میانگین حداکثر و میانگین دمای ماهانه به ترتیب ۸.۷، ۳۵ و ۲۶ درجه سانتی¬گراد است. میزان بارندگی منطقه مورد مطالعه به طور متوسط حدود ۲۴.۴ میلی‌متر متغیر است (Babashpour et al., 2012).

۲.۲. خصوصیات گیاهشناسی:

خانواده نعناعیان Lamiaceae یکی از بزرگترین خانواده‌های گیاهی است که دارای پراکنش جهانی می‌باشد (به غیر از مناطق قطب شمال و جنوب) و دارای حدود ۲۰۰ جنس و دو تا پنج هزار گونه از بوته‌های معطر و درختچه‌های کوتاه است. اغلب نعناعیان تولید کننده ترپن‌ها و انواع ترکیبات دیگر هستند که این ترکیبات را (به طور عمده) در غدد اپیدرمی برگ‌ها، ساقه‌ها و اندام‌های زایشی ذخیره می‌کنند (Babashpour et al., 2012).

نعناع: گیاهی است علفی با ریشه هوایی و ساقه‌های مستقیم و چهارگوش و ریزوم‌های خزنده‌ای دارند و بیشتر با همین ریزوم به صورت رویشی تکثیر می‌شوند. ساقه نیز به سادگی در محیط مناسب، تولید ریشه می‌کند. بیشترآنها چندساله هستند. گل آذین‌های ارغوانی، یاسی، گاهی صورتی یا سفید دارند (میر جلیلی، ۱۴۰۰).

آویشن: گیاهی است از این تیره که ساختار بوته‌ای دارد و دارای ساقه مستقیم و علفی یا چوبی و پرشاخه به ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر و در بعضی موارد تا ۴۵ سانتی‌متر است. ساقه‌های منشعب این گیاه پوشیده از کرک‌های سفید رنگ می‌باشد (رییسی، ۱۴۰۰).

مریم‌گلی: گیاهی است چند ساله و علفی، ریشه راست و دارای انشعابات فراوان ساقه راست و ارتفاع آن بین ۸۰–۵۰ سانتی‌متر است. این گیاه، دارای ساقه‌هایی به رنگ سبز تیره و پوشیده از کُرک‌های انبوه و خاکستری رنگ است. گلها به رنگ بنفش متمایل به آبی، صورتی یا سفید مشاهده می‌شوند(wikipedi).

ریحان مقدس: گیاهی چند ساله و بوته ای دارای شاخه هایی چهارگوش، برگ های ریز و بسیار معطر به رنگ سبز روشن و گل هایی متمایل به رنگ ارغوانی می باشد (مقیمی پور و همکاران، ۱۳۹۴).

ریحان: ساقه چهارگوش و مستقیم است و انشعاب‌های کم و بیش فراوانی دارد. ارتفاع این گیاه بین ۴۰ تا ۶۰ سانتیمتر است. برگ‌ها پهن به صورت متقابل بر روی ساقه و به رنگ سبز و کنارههای آن صاف و فاقد دندانه است. گل‌ها کوچک و به رنگ سفید یا صورتی روشن است (ضیایی و همکاران، ۱۳۹۳).

پونه: گونه‌ای نعنا به شکل خوابیده یا خیزان با ساقه‌های متعدد و پوشیده از کرک‌های متراکم و گسترده؛ پهنک برگ‌ها تخم‌مرغی، به طول ۵ تا ۲۰ میلی‌متر و حاشیه صاف یا کم و بیش دندانه‌دار است و گل‌آذین آن دارای چرخه‌های کروی و گل‌های غالباً بنفش و به‌ندرت سفید است (wikipedi). در مطالعه حاضر بررسی مکانیسم اثر آنتی اکسیدان و برخی اطلاعات نمونه گونه‌های گیاهان دارویی نعناع از جمله نام علمی، نام محلی (نام ترکی)، رویشگاه، ارتفاع از سطح، اندام های مورد استفاده برای هر گیاه دارویی ثبت شده است.

۳. نتایج

با توجه به مطالعه میدانی در منطقه مراغه گو نه‌های *Mentha arvensis*، *Mentha spicata*، *Ocimum basilicum*، *Ocimum sanctum*، *Salvia officinalis*، *Thymus vulgaris* و *Origanum vulgare* از فراوان ترین گو نه‌های یافت شده برای خانواده نعناع بود (جدول ۲)

جدول ۲. خصوصیات گو نه‌های گیاهان دارویی خانواده نعناع در منطقه ی مراغه

مکانیسم اثر	منطقه رویش	ارتفاع از سطح	اندام مورد استفاده	نام محلی	نام گیاه	نام علمی
اسانس و عصاره گیاهی فعالیت آنتی اکسیدانی و مهار رادیکال را نشان داد	نرج آباد	۱۳۵۰– ۱۳۰۰	ساقه	نعنا	نعناع	*Mentha arvensis*

آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب، ضد زخم		۱۳۵۰-۱۳۰۰	ساقه	نعنا، نعنا فلفلی	نعناع دشتی	*Mentha spicata*
مهار رادیکال و فعالیت آنتی اکسیدانی	تازه کند	۱۶۵۰-۱۵۵۰	ساقه و بذر	ریحان	ریحان	*Ocimum basilicum*
مهار رادیکال و فعالیت آنتی-اکسیدانی	علیا و تازه کند سفلی	۱۶۵۰-۱۵۵۰	ساقه و بذر	ریحان	ریحان مقدس	*Ocimum sanctum*
مهار رادیکال و فعالیت آنتی-اکسیدانی	نوا	۱۵۵۰-۱۴۵۰	ساقه برگ و گل	رزماری، اکلیل کوهی	مریم گلی	*Salvia officinalis*
مهار رادیکال و فعالیت آنتی‌اکسیدان	سهند	۲۸۰۰-۱۵۰۰	برگ وگل	آویشن	آویشن باغی	*Thymus vulgaris*
مهار رادیکال و فعالیت آنتی-اکسیدانی	ینگجه	۱۹۵۰-۱۴۰۰	برگ و گل و ساقه	یارپیز	پونه کوهی	*Origanum vulgare*

گیاهان تیره نعناع با اهداف پرشماری در سراسر دنیا استفاده می‌شوند. گیاهان متعلق به این تیره، غنی از ترکیبات پلی فنلی بوده و بسیاری از آن‌ها به داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی معروف هستند. خانواده نعناع درطب سنتی دراصل به عنوان گیاه دارویی برای درمان درد معده و دردهای قفسه سینه مورد استفاده قرار می‌گرفته است.

نعنا: در طب سنتی برای درمان سرماخوردگی، تب و ناراحتی‌های گوارشی و قلبی عروقی استفاده می‌کنند. خواص زیست-شناختی گوناگونی هم‌چون اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، آفت‌کشی زیستی، ضد تومور، ضد سرطان، ضد ویروس، ضد حساسیت، ضد التهاب، ضد فشار خون و فعالیت بازدارندگی اوره آزی را به نعناع‌ها نسبت می‌دهند. (میر جلیلی، ۱۴۰۰)

نعنا دشتی: یکی از این گیاهان دارویی می‌باشد که در طب سنتی ایران برای درمان معده درد و اختلالات روده استفاده می شود. همچنین، در طب سنتی غالباً از دمکرده برگ‌های آن به عنوان مدر تسریع کننده عمل هضم، رفع آسم، اسپاسم، درد معده،

سردرد، سرماخوردگی و سرفه و همچنین به صورت استعمال خارجی برای درمان زخم‌ها و غدد متورم و نیز برای درمان برونشیت، نفخ شکم، بی شتهایی، کولیت و اختلالات روده‌ای مانند تهوع، سوءهاضمه و اسهال و به‌عنوان آنتی اکسیدان ضدقارچ، ضد باکتری و ضد انقباض وتشنج استفاده می‌شود (دادخواه و همکاران، ۱۳۹۷).

پونه کوهی: اساساً بصورت وحشی در مکان‌های مرطوب مانند حاشیه رودخانه‌ها روییده و رشد می کند. برگ، گل و ساقه گونه‌های پونه در چای‌های گیاهی یا بعنوان افزودنی در مخلوط‌های ادویه‌های تجارتی برای طعم دادن به غذاها استفاده می‌شود. این گیاه در طب سنتی برای درمان تهوع، برونشیت، نفخ و بی اشتهایی بکار گرفته می‌شود (پژوهی الموتی و همکاران ، ۱۳۹۹).

آویشن: از برگ آویشن در فرآورده‌های غذایی و همچنین از اسانس گیاه در نوشیدنی‌ها و صنایع دارویی، بهداشتی و آرایشی استفاده متنوعی می‌شود. روغن آویشن دارای خواصی نظیر ضداسپاسم، بادشکن، ضدقارچی، ضدباکتریایی، ضدعفونی کننده، ضدکرم، ضدرماتیسم، خلط آور، آنتی اکسیدان، نگهدارنده طبیعی غذا و تاخیردهنده پیری پستانداران می‌باشد. اسانس آویشن از جمله ده اسانس معروف می‌باشد که جایگاه خاصی در تجارت جهانی دارد (رییسی، ۱۴۰۰).

مریم گلی: گیاهی است که به عنوان ضدتشنج، تب بر ، مسکن دردهای گوارشی و سردردهای عصبی با منشاعصبی یا ناشی از سوءهاضمه، تقویت حافظه، کاهش دهنده فشارخون و قند خون و نیز در بیماری میگرن مورد استفاده قرار می‌گیرد (محمدکرمی و همکاران، ۱۳۹۴).

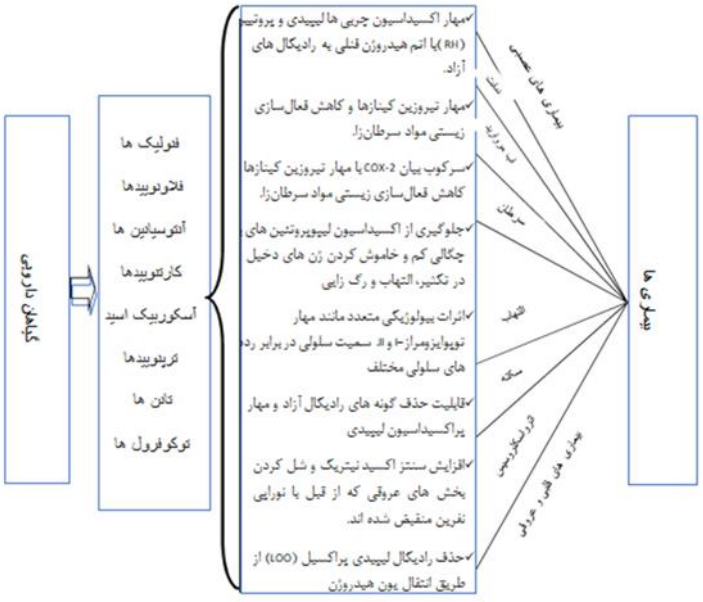
ریحان: از قدیم دیرباز به طور سنتی به عنوان یک گیاه زینتی و دارویی در درمان بیماریهایی چون سردرد، سرفه، اسهال، انگلها، زگیلها، ناراحتیهای کلیوی و همچنین برای، مداوای بزرگ شدن طحال مورد استفاده قرار میگیرد. همچنین در طب سنتی از برگها و نوک گلهای ریحان به عنوان ضد نفخ، افزایش دهندهی شیر، درمان برخی ناراحتیهای قلبی، اشتهاآور و داروی گیاهی ضد تشنج هم استفاده میشده است (ضیایی و همکاران، ۱۳۹۳).

٤. بحث و نتیجه‌گیری

گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده، دارای سیستم دفاعی و کارایی بالایی هستند که می‌تواند رادیکال‌های آزاد را از بین برده و یا خنثی کنند. این سیستم دفاعی دارای مکانیزمهای آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشند. آنتی اکسیدان آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز ، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون پراکسیداز می باشد که به ترتیب رادیکال‌های سوپر اکسید وهیدروژن پراکسید و پر اکسیدهای آلی را در درون سلول ها خنثی می‌نمایند و همچنین در این سیستم عوامل غیر آنزیمی شامل آسکوربات، توکوفرول، کارتنوئید ها و ترکیبات متفرقه (از جمله فلاونوئیدها مانیتول ها و پلی فنل‌ها،...) که به عنوان خنثی کننده اشکال اکسیژنی عمل می کنند و نقش حیاتی در حفظ هومئوستازی سلول بازی می کنند(زرگری، ۱۳۹۹) (زهره امینی و رحیم حداد، ۱۳۹۲). تعدد و کثرت سیستم‌های دفاعی به این خاطر است که انواع اکسیژن واکنش‌زا در سلول‌ها و بخش‌های زیر سلولی مختلف تولید می‌شوند و همچنین در خاصیت هایی چون توانایی انتشار،

حلالیت و گرایش به وارد واکنش شدن با مولکول‌های بیولوژیک مختلف، متفاوت هستند. بنابراین مجموعه‌ای به هم پیوسته از مولکول های‌دفاعی برای عمل در هر دو مرحله آلی و غشایی در تمام بخش‌های سلول برای غیر فعال کردن رادیکال‌ها به همان سرعتی که آن‌ها شکل می‌گیرند نیاز است. در شرایط طبیعی اغلب بین تولید رادیکال آزاد از یک سو و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی از سوی دیگر، حالت تعادل وجود دارد که در صورت تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و یا ضعف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، تعادل فوق مختل و حالت استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود (زربان و همکاران، ۱۳۸۳). با این حال، استرس اکسیداتیو به وضعیتی اشاره دارد که توانایی سیستم بیولوژیک برای سمزدایی و یا ترمیم آثار مخرب انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن به قدر کافی نباشد، لذا آسیب‌های اکسیداتیو به سلول، بافت یا ارگان‌های بدن را به دنبال خواهد داشت(زرگری، ۱۳۹۹). در این زمینه، یک آنتی اکسیدان می‌تواند در سطوح مختلف با (۱) کاهش غلظت موضعی اکسیژن، (۲) جلوگیری از شروع زنجیره یا از بین بردن رادیکال‌های آغازگر، (۳) تجزیه پراکسیدهای لیپیدی به رادیکال های پراکسیل و آلکوکسیل، (۴) تجزیه پراکسیدها با تبدیل آنها به محصولات غیر رادیکال، و (۵) شکستن زنجیره برای جلوگیری از ادامه انتزاع هیدروژن عمل کند

طیف گسترده ای از تنوع آنتی‌اکسیدان های طبیعی در گیاهان دارویی یافت می‌شوند که از نظر ترکیب، خواص فیزیکی و شیمیایی و محل اثر متفاوت هستند. تعدادی از آنتی اکسیدان‌های طبیعی و مصنوعی برای پیشگیری از بیماری‌های مختلف در کارآزمایی‌های تجربی مختلف گزارش شده است و مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که آنتی اکسیدان‌های طبیعی با منشاء گیاهی ممکن است یک عامل بازدارنده در برابر بیماری‌های دژنراتیو ناشی از استرس اکسیداتیو باشند (Bhatt, et al., 2013). فیتوکمیکال های آنتی اکسیدانی و مکانیسم اثر آنها برای پیشگیری از بیماری های مختلف در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱: فیتوکمیکال های آنتی اکسیدانی و مکانیسم اثر آنها برای پیشگیری از بیماری های مختلف

ثابت شده است که استفاده از ترکیبات گیاهی به عنوان درمان دارویی برای از بین بردن رادیکال های‌آزاد و درمان اختلالات منجر به استرس اکسیداتیو از نظر بالینی موثر و با سمیت نسبتاً کمتر نسبت به داروهای موجود می‌باشد. با توجه به نقش آنتی اکسیدان‌های غذایی در کاهش خطر ابتلا و یا کاهش عوارض در بیماری‌های مختلف از راه کاهش تنش اکسیداتیو و وجود گیاهان دارویی سرشار از آنتی‌اکسیدان های طبیعی که می‌توانند فعالیت رادیکال های آزاد را خنثی کنند و مانع ایجاد تنش اکسیداتیو شوند و نیز با توجه به جایگاه عمیق و تاریخی گیاهان دارویی و درمان بیماری‌های مختلف در طب سنتی ایران و ارزان و در دسترس بودن گیاهان دارویی، که دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند توصیه می‌شود از این گیاهان بعنوان پیشگیری از بیماری‌های مختلف، کمک به درمان بعضی بیماری‌ها و همچنین جلوگیری از ایجاد عوارض آنها استفاده شود .

منابع

- ✓ امینی، ز.، حداد ، ر. ۱۳۹۲. نقش رنگیزه های فتوسنتزی و آنزیمهای آنتی اکسیدان در مقابل تنش اکسیداتیو. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۶ (۳)، ۲۶۵-۲۵۱.
- ✓ پژوهی الموتی، م.، تاجیک ، ح.، آخوندزاده، ا.، گندمی، ح.، آبادی، ن.، احسانی ، ع. ۱۳۹۹. مطالعه ترکیب شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی اسانس های پونه کوهی (. Mentha longifolia L) و زیره سبز (.Cuminum cyminum L) در سوپ. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. ۳۶(۹)، ۴۵-۳۳.
- ✓ خوش طبیعت، ل.، مهدوی، م. ۱۳۹۴. نقش استرس اکسیداتیو در تکثیر بی رویه و مرگ سلولی. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۲۵ (۱۲۷)،۱۴۵-۱۳۱.
- ✓ دادخواه، ا.، فاطمی، ف.، محمدی ملایری، م.، رسولی، آ.، کاروین آشتیانی، م. ۱۳۹۷. تاثیر اسانس نعنا بر روی استرس اکسیداتیو و بیان ژن COX- ۲ در پیشگیری از سپسیس. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۳۱ (۴)، (دادخواه و همکاران، ۱۳۹۷)
- ✓ رئیسی،ح.، ۱۴۰۰. مروری بر ویژگیهای گیاه دارویی آویشن. فصلنامه اکوفیزیولوژی و فیتوشیمی گیاهان دارویی و معطر. ۹ (۱) ، ۲۶-۲۳.
- ✓ زربان، ا.، ملکانه، م.، حسن پور، م.، نجاری، م.، اباد، م. ۱۳۸۳. ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی ۲۸ مورد از گیاهان دارویی ایران. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند ۱۱ (۱)، ۱۳-۵.
- ✓ زرگری، ف. ۱۳۹۹. نقش استرس اکسیداتیو و رادیکالهای آزاد در بیماریها. مجله علوم پزشکی رازی ۲۷(۲)، ۲۲-۱۰.
- ✓ ضیائی، م.، شریفی م.، نقدیبادی، ح.،تحصیلی، ژ، ح.، قربانی نهوجی، م. ۱۳۹۳. مروری بر گیاه دارویی ریحان (Ocimum basilicum L.) با تأکید بر عمده ترین ترکیبات ثانویه و ویژگیهای زراعی و دارویی آن. فصلنامه گیاهان دارویی. ۱۳ (۴)، ۴۰-۲۶.
- ✓ کرمی، م.، حسینی، ا.، شهابی مجد، ن.، ابراهیم زاده، م.، عالمی، ش. ۱۳۹۴. مریم گلی گیاه شناسی، ترکیبات شیمیایی، خواص دارویی و درمانی. مجله تعالی بالینی ۳(۲)، ۱-۱۱.
- ✓ مقیمی پور، ز.، محمودی سورستانی، م.، عالم زاده انصاری، ن.، رمضانی، ز.. ۱۳۹۴. بررسی اثر محلولپاشی نانو کلات روی و سولفات روی بر خصوصیات مورفولوژیکی گیاه دارویی ریحان مقدس (Ocimum sanctum). تولیدات گیاهی. مجله علمی کشاورزی. ۳۸ (۳)، ۵۳-۴۱.
- ✓ میرجلیلی،ع. ۱۴۰۰. کشت و پرورش نعنا. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، معاونت آموزش و ترویج کشاورزی، نشر آموزش کشاورز ی.

Babashpour , M., Hossein Talebpour, A., Alijanpour , R. 2012. Introducing of medicinal plants in Maragheh, Eastern Azerbaijan Province (Northwestern Iran). Journal of Medicinal Plants Research Vol. 6(25), pp. 4208-20.

Bhatt, I. D., Rawat, S., Rawal, R. S. 2013. Antioxidants in medicinal plants. Biotechnology for Medicinal Plants: Micropropagation and Improvement, pp. 295-326.

https://fa.wikipedia.org/

Antioxidant effects of some plants in the family Lamiaceae in Maragheh

Mahin kazemi[1*]

[1] Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural, Islamic Azad University of Maragheh, Maragheh, iran

Abstract

The present study investigated the mechanism of antioxidant effect of seven plant species from the Lamiaceae family. *Mentha arvensis, Mentha spicata, Ocimum basilicum, Ocimum sanctum, Salvia officinalis, Thymus vulgaris and Origanum vulgare* species are among the most abundant species found for this family in Maragheh region. These plants are rich source of phenolic and flavonoid compounds and have strong antioxidant activity, that intraditional medicine to common cold, fevers, Gastrointestinal and cardiovascular disorders, relieving asthma symptoms are used. The results of this study showed that most of the studied plants are potentially a good source of medicinal agents. Considering the cheapness and availability of medicinal plants in the cure of various diseases in traditional medicine, it is recommended to use these plants as a prevention of various diseases and help in the treatment of some diseases.

Keywords: Medicinal plants, antioxidants, free radicals, oxidative stress

درمان ترکیبی آرتمیزینین و N-استیل سیستئین وضعیت شاخص های اسپرمی را تغییر می دهد

حسین طایفی نصرآبادی*، بهناز عابدی، داوود کیانی فرد، مهدی بساکی

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز

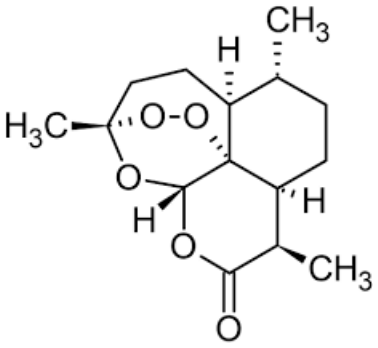
چکیده

آرتیمیزینین یک ترکیب موثره گیاه دارویی آرتمیزیا آنووا است که در درمان بیماریهای عفونی و التهابی، مالاریا، سرطان و دیابت استفاده می شود. بررسی ها نشان داده است که مصرف این ترکیب گیاهی بخصوص در دوزهای بالا از طریق افزایش رادیکال های آزاد و فرایند استرس اکسیداتیو سبب آسیب های بافتی از جمله آسیب بافت بیضه و شاخص های اسپرمی می شود. N-استیل سیستئین (NAC) از جمله ترکیبات آنتی اکسیدانی است که به واسطه دارا بودن گروه سولفیدریل توانایی حذف رادیکال های آزاد را دارد. هدف از این تحقیق بررسی نقش احتمالی NAC بر کاهش آسیب های ناشی از مصرف آرتمیزینین بر روی شاخص های اسپرمی می باشد. جهت این عمل ابتدا ۳۰ سر موش نر بالغ با وزن تقریبی ۳۰-۲۵ گرم به طور تصادفی به ۳ گروه ۱۰ تایی تقسیم گردیدند. گروه اول (کنترل) تنها روغن ذرت و DMSO (۰/۱ درصد) را به عنوان حلال آرتمیزینین دریافت نمود. گروه دوم (Art-250) دوز بالای آرتمیزینین (۲۵۰mg/kg) حل شده در حلال و گروه سوم (Art-250+NAC-150) بطور همزمان دوز بالای آرتمیزینین (۲۵۰mg/kg) بعلاوه NAC (۱۵۰mg/kg) حل شده در حلال را به مدت ۷ روز بصورت گاواژ دریافت کردند. اپیدیدیم گروه های مختلف جهت بررسی شاخص های اسپرمی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که آرتمیزینین در دوز بالا (Art-250) سبب کاهش معنی دار تعداد اسپرم، درصد تحرک و درصد زنده مانی اسپرم نسبت به گروه کنترل گردید. همچنین تجویز همزمان NAC (۱۵۰mg/kg) با آرتمیزینین (۲۵۰mg/kg) باعث جلوگیری از آسیب های ناشی از مصرف دوز بالای آرتمیزینین بر روی شاخص های اسپرمی گردید.

واژگان کلیدی: آرتمیزینین، N-استیل سیستئین، شاخص های اسپرمی، درمان ترکیبی.

۱. مقدمه

آرتمیزیا آنووا یکی از گیاهان بومی آسیا به شمار می رود که قرن هاست در طب آسیا برای درمان و پیشگیری تب و لرز مورد استفاده قرار می گیرد. ترکیب اصلی آرتمیزیا آنووا، آرتمیزینین است. آرتمیزینین یک سزکوئی ترپن لاکتون با ساختار ۱و ۲و ۴ تری اکسان و حاوی یک پل اندوپراکسید می‌باشد (شکل ۱). این ترکیب دارویی در قسمت هوایی گیاه آسیایی آرتمیزیا آنووا وجود دارد (Badshah et al. 2018).



شکل۱: ساختار شیمیایی ترکیب آرتمیزینین و گروه فعال اندوپراکسید در آن.

آرتمیزینین در دو دهه گذشته به طور وسیع در درمان مالاریا استفاده شده است. علاوه بر درمان مالاریا، این دارو و مشتقات آن می توانند بعنوان ضدسرطان، ضدالتهاب، ضد قارچ، ضدویروس، ضد تومور، ضدفیبروز، ضد آریتمی و همچنین جهت بهبود اختلالات متابولیک ناشی از دیابت و درمان بسیاری از بیماری های دیگر مورد استفاده قرار گیرند (Kim et al. 2015; Lee et al. 2023). آرتمیزینین از طریق پل اندوپراکسیدی با بخش هم آزاد (Fe II) ناشی از هضم هموگلوبین داخل انگل مالاریا واکنش داده و منجر به تشکیل گونه اکسیژن فعال (ROS) می‌شود. به همین ترتیب سبب از بین رفتن انگل مالاریا می‌گردد (Aktaş et al. 2020). همچنین نشان داده شده است که آرتمیزینین در داخل چربی‌های خنثی تجمع یافته و باعث آسیب غشای سلولی انگل می‌شود. این اثر نیز وابسته به پل اندوپراکسید در آرتمیزینین می باشد (Hartwig et al. 2009). با توجه به اینکه آرتمیزینین داروی نسبتاً ایمنی است ولی با این حال نگرانی‌هایی در مورد عوارض جانبی آن گزارش شده است. علاوه بر اثرات قلبی-عروقی و سمیت نورونی (به ویژه در سیستم تعادلی و هسته حرکتی و شنوایی ساقه مغز)، گزارش شده است که ترکیبات آرتمیزینین و مشتقات آن بر روی عملکرد تولید مثلی در جنس ماده و همچنین عملکرد تولید مثلی در جنس نر نیز تأثیر گذار می باشد (Aprioku 2012). تحقیقات نشان داده است که استرس اکسیداتیو ناشی از مصرف آرتمیزینین در اپیدیدیم می‌تواند در باروری افرادی که تحت درمان شدید با آرتمیزینین قرار گرفته‌اند اختلال ایجاد کند (Farombi et al. 2014).

NAC یک مولکول کوچک حاوی تیول است که برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ بعنوان داروی موکولیتیک معرفی شد (Aktaş et al. 2010). این ترکیب مشتق N-استیل طبیعی از اسیدآمینه ال-سیستئین می باشد (Fredriksson et al. 2023). NAC بعنوان یک گزینه درمانی بالقوه برای بیماری‌هایی که با تولید رادیکال آزاد اکسیژن درگیر هستند شناخته شده است (Shahin et al. 2009). نشان داده شده است NAC علاوه بر تأثیر بر کاهش گونه اکسیژن فعال و کاهش تأثیر آن بر روی منی، فاکتوری جهت کاهش ویسکوزیته منی می‌باشد. در حالت کلی NAC ممکن است در بیماران مبتلا به ناباروری، از طریق اثرات مفید بر

روی پارامترهای منی با حفاظت سلول‌های اسپرم از آسیب پراکسیداتیو و بهبود ویژگی‌های عملکری آن مفید باشد (Ciftci et al. 2009). با توجه به اثرات نامطلوب آرتمیزینین به خصوص در دوزهای بالا و همچنین اهمیت ترکیب NAC بعنوان یک آنتی اکسیدان، هدف از این تحقیق بررسی نقش احتمالی NAC بر کاهش آسیب های ناشی از مصرف آرتمیزینین بر روی شاخص های اسپرمی در موش‌های نر بالغ می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۳۰ سر موش بالغ نر سوری با وزن تقریبی بین ۳۰-۲۵ گرم تهیه و به طور تصادفی به ۳ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. موش‌ها به مدت یک هفته در جعبه‌های پلاستیکی در اتاق موش‌ها نگهداری شدند تا به محیط عادت کنند. در این مدت آب و غذای موش‌ها تحت کنترل بوده و دوره روشنایی ۱۲ ساعت و تاریکی ۱۲ ساعت رعایت گردید. همچنین ملاحظات اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در طول آزمایش رعایت گردید. سپس همه گروه‌ها به مدت یک هفته تیمار شدند. تیمار موش‌ها به صورت خوراکی و به وسیله گاواژ انجام شد. گروه اول (کنترل) تنها روغن ذرت و DMSO با غلظت نهایی ۰/۱ درصد را به عنوان حلال آرتمیزینین دریافت نمود. گروه دوم (Art-250) دوز بالای آرتمیزینین (۲۵۰mg/kg) حل شده در حلال و گروه سوم (Art-250+NAC-150) بطور همزمان دوز بالای آرتمیزینین (۲۵۰mg/kg) بعلاوه NAC (۱۵۰mg/kg) حل شده در حلال را به مدت ۷ روز بصورت گاواژ دریافت کردند. دوز آرتمیزینین و NAC استفاده شده در این مطالعه طبق مطالعات قبلی انتخاب گردیدند (Basaki et al. 2022, Zhang et al. 2018). بافت اپیدیدیم گروه های مختلف جهت بررسی شاخص های اسپرمی پس از بیهوش نمودن موش ها مورد استفاده قرار گرفت. جهت ارزیابی پارامترهای اسپرمی، ابتدا دم اپیدیدیم به قطعات کوچک (۱ mm) در پتری دیش استریل حاوی ۱ mL سرم فیزیولوژی تکه تکه شد و سپس محتوای آن توسط ۱ mL سرم فیزیولوژی رقیق گردید. نمونه مورد نظر به مدت ۳ دقیقه در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. مایع اسپرم حاصل به آرامی مخلوط شد. سپس اجازه داده شد تا تکه های بافت ته نشین گردد آنگاه مایع رویی جدا شد و سوسپانسیون سلولی به آرامی پنج بار پیپتاژ گردید. شمارش اسپرم ها با استفاده از لام هموسیتومتر انجام شد و تعداد اسپرم ها به صورت میلیون در میلی لیتر سوسپانسیون گزارش گردید (Zambrano et al. 2005). تحرک اسپرم با استفاده از محاسبه اسپرم متحرک ارزیابی شد (Jin et al. 2008). زنده مانی اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی ۱٪ ائوزین و ۱۰٪ نیگروزین اندازه گیری شد (Szablicka et al. 2022).

۳. نتایج

جدول ۱ نتایج حاصل از آنالیز داده‌های شاخص‌های اسپرمی در گروه کنترل، گروه تیمار شده با دوز بالای آرتمیزینین (Art-250) و گروه تجویز همزمان NAC با آرتمیزینین (Art-250+NAC-150) را در موش نر بالغ نشان می دهد. با توجه به داده های بدست آمده در این جدول، در گروه تیمار با دوز بالای آرتمیزینین (Art-250)، میزان تعداد اسپرم و همچنین درصد تحرک اسپرم و درصد زنده‌مانی اسپرم به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. علاوه بر این آرتمیزینین در دوز به کار رفته تأثیر معنی‌داری بر روی مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل نشان نداد. از طرفی تجویز همزمان NAC به همراه آرتمیزینین (Art-250+NAC-150) به موش‌ها نشان داد که تعداد و تحرک اسپرم‌ها نسبت به گروه دوز بالای آرتمیزینین (Art-250) افزایش داشته و به سطح کنترل رسیده‌اند (P<۰/۰۵). همچنین تجویز همزمان NAC با آرتمیزینین (Art-250+NAC-150) سبب افزایش معنی‌دار درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها نسبت به گروه دوز بالای آرتمیزینین (Art-250) گردید (P<۰/۰۵) با این وجود این میزان به سطح کنترل نرسید.

جدول ۱. تأثیر دوز بالای آرتمیزینین به تنهایی و تجویز همزمان NAC با دوز بالای آرتمیزینین به مدت ۷ روز بر روی پارامترهای اسپرمی موش نر بالغ

.

گروه	حرکت اسپرم (٪)	تعداد اسپرم (10^5×....)	زنده مانی اسپرم (٪)	اسپرم غیر نرمال (٪)
کنترل	۶۴/۱۲ ± ۹/۴۸[a]	۳۵/ ±۴۰ ۴/۸۲[a]	۶۸/۵۰ ± ۲/۱۲[a]	۲۳/۸۳ ± ۳/۳۰ [a]
Art-250	۵۲/۸۸ ± ۴/۰۴[b]	۲۱/۴۰ ± ۱/۶۷[b]	۲۱/۸۸ ± ۴/۰۲[b]	۲۹/۱۰ ± ۷/۵۴[a]
Art-250+NAC-150	۶۱/۳۴ ± ۱/۰۵[a]	۳۷/۷۵ ± ۷/۶۷[a]	۲۶/۹۶ ± ۳/۹۰[d]	۳۱/۹۳ ± ۴/۱۸[a]

* حروف (a,b,c,d) در هر ستون بیانگر تفاوت معنی دار در حد ($p< 0.05$) می باشد.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

تحقیقات مختلفی سمیت آرتمیزینین و مشتقات آن را به ویژه در غلظت‌های بالا در دستگاه تناسلی مردان و شاخص‌های اسپرمی گزارش کرده‌اند (Farombi et al. 2014). نتایج حاصل از تحقیق ما نیز نشان می‌دهد که تجویز آرتمیزینین در دوز بالای آن (Art-250) به مدت ۷ روز به موش نر بالغ سبب کاهش قابل توجه تعداد، درصد تحرک و درصد زنده‌مانی اسپرم گشته و تأثیری بر روی درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم نداشته است. بنابراین آرتمیزینین در دوز بالا (۲۵۰mg/kg) توانسته اثرات سمی بر شاخص‌های اسپرمی در موش داشته باشد. در مطالعه‌ای دیگر مشاهده شده است که تجویز دهانی آرتمیزینین و یکی از مشتقات آن بنام آرته متر، باعث کاهش قابل توجهی در تعداد، تحرک و زنده مانی اسپرم در موش نر می‌گردد که البته این اثرات بصورت وابسته به دوز گزارش شده اند (Olumide and Raji 2011). به طور کلی القای استرس اکسیداتیو توسط آرتمیزینین و مشتقات آن یکی از عوامل مؤثر در آسیب به دستگاه تولید مثلی نر مطرح گردیده است (Farombi et al. 2014).

NAC یک آنتی اکسیدان قوی است که به واسطه توانایی در کاهش استرس اکسیداتیو بسیار مورد توجه می‌باشد (Cordeiro et al. 2023). این دارو به دلیل داشتن گروه تیول (SH)، بالقوه به صورت مستقیم با اکسیدان‌ها مثل H_2O_2 میانکنش می نماید. عملکرد آنتی اکسیدانی NAC از طریق دو مکانیسم اتفاق می‌افتد. اول اینکه این ترکیب به راحتی به داخل سلول نفوذ نموده و پس از داستیله شدن به فرم ال-سیستئین در آمده و بعنوان پیش ساز گلوتاتیون احیا در بیوسنتز GSH شرکت می کند (Maghsadi et al. 2023). دوم اینکه در سطح خارج سلول NAC به صورت مستقیم بعنوان یک نوکلئوفیل بر روی رادیکال آزاد می تواند عمل نماید (Maghsadi et al. 2023). با توجه به اینکه در این تحقیق تجویز تنهایی آرتمیزینین در موش های نر باعث اثرات منفی بر شاخص های اسپرمی گردید و همچنین تجویز همزمان ترکیب NAC با آرتمیزینین این اثرات منفی را خنثی نمود می توان به این نتیجه رسید که احتمالا NAC بخاطر خواص آنتی اکسیدانی قوی و نقش آن در حذف رادیکال های آزاد توانسته القای استرس اکسیداتیو توسط آرتمیزینین را در دستگاه تولید مثلی موش کاهش داده و از این طریق از آسیب ناشی از مصرف آرتمیزینین جلوگیری نماید. لذا پیشنهاد می‌شود که جهت پیشگیری از آسیب‌های ناشی از مصرف آرتمیزینین، این دارو همزمان با ترکیب NAC تجویز گردد.

تشکر و قدردانی

از کمک های مالی امور پژوهشی دانشگاه تبریز جهت انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

Aktaş, Binhan Kağan, Şafak Bulut, Süleyman Bulut, Mehmet Murat Baykam, Cüneyt Özden, Mehmet Şenes, Doğan Yücel, and Ali Memiş. 2010. The effects of N-acetylcysteine on testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury, Pediatric surgery international, 26: 293-98.

Aktaş, İ, Ö Özmen, H Tutun, A Yalçın, and A Türk. 2020. Artemisinin attenuates doxorubicin induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats, Biotechnic & Histochemistry, 95: 121-28.

Aprioku, Jonah Sydney. 2012. Current trends in malaria and tuberculosis chemotherapy, Advances in Environmental Biology: 534-543.

Badshah, Syed, Asad Ullah, Nasir Ahmad, Zainab Almarhoon, and Yahia Mabkhot. 2018. Increasing the strength and production of artemisinin and its derivatives, Molecules, 23: 100.

Basaki, M., Hashemvand, A., Tayefi-Nasrabadi, H., Panahi, Y. and Dolatyarieslami, M., 2022. Artemisinin and l-carnitine combination therapy alters the erythrocytes redox status. Cell Biology International, 46(7), 1137-1143.

Ciftci, Halil, Ayhan Verit, Murat Savas, Ercan Yeni, and Ozcan Erel. 2009. Effects of N-acetylcysteine on semen parameters and oxidative/antioxidant status, Urology, 74: 73-76.

Cordeiro, E.B., Silva, B.R., Paulino, L.R., Barroso, P.A., Barrozo, L.G., de Lima Neto, M.F. and Silva, J.R., 2023. Effects of N-acetylcysteine on growth, viability and reactive oxygen species levels in small antral follicles cultured in vitro. Asian Pacific Journal of Reproduction, 12(1), 42.

Farombi, EO, IA Adedara, AO Abolaji, JP Anamelechi, and JO Sangodele. 2014. Sperm characteristics, antioxidant status and hormonal profile in rats treated with artemisinin, Andrologia, 46: 893-901.

Fredriksson, I., Jayaram-Lindström, N., Kalivas, P.W., Melas, P.A. and Steensland, P., 2023. N-acetylcysteine improves impulse control and attenuates relapse-like alcohol intake in long-term drinking rats. Behavioural Brain Research, 436, 114089.

Hartwig, Carmony L, Andrew S Rosenthal, John Dangelo, Carol E Griffin, Gary H Posner, and Roland A Cooper. 2009. Accumulation of artemisinin trioxane derivatives within neutral lipids of Plasmodium falciparum malaria parasites is endoperoxide-dependent, Biochemical pharmacology, 77: 322-36.

Jin, Lei, Hong-Yu Xue, Li-Ji Jin, Shu-Ying Li, and Yong-Ping Xu. 2008. Antioxidant and pancreas-protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes, European journal of pharmacology, 582: 162-67.

Kim, Wan-Su, Woo Jin Choi, Sunwoo Lee, Woo Joong Kim, Dong Chae Lee, Uy Dong Sohn, Hyoung-Shik Shin, and Wonyong Kim. 2015. Anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial effects of artemisinin extracts from Artemisia annua L, The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology, 19: 21.

Lee, B.J., Weyers, M., Haynes, R.K. and van der Kooy, F., 2023. Discovery of artemisinin in Artemisia annua, its current production, and relevance to sub-Saharan Africa. South African Journal of Botany, 153, 21-27.

Maghsadi, Z., Azadmehr, A., Moghadamnia, A.A., Feizi, F. and Hamidi, N., 2023. N-Acetylcysteine attenuated pulmonary fibrosis induced by bleomycin via immunomodulation responses. Research in Pharmaceutical Sciences, 18(2), 177.

Olumide, Stephen Akinsomisoye, and Yinusa Raji. 2011. Long-term administration of artesunate induces reproductive toxicity in male rats, Journal of reproduction & infertility, 12: 249.

Perchellet, Elisabeth M, Eric A Maatta, Nancy L Abney, and Jean-Pierre Perchellet. 1987. Effects of diverse intracellular thiol delivery agents on glutathione peroxidase activity, the ratio of reduced/oxidized glutathione, and ornithine decarboxylase induction in isolated mouse epidermal cells treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, Journal of cellular physiology, 131: 64-73.

Shahin, Ahmed Y, Ibrahim MA Hassanin, Alaa M Ismail, Jan S Kruessel, and Jens Hirchenhain. 2009. Effect of oral N-acetyl cysteine on recurrent preterm labor following treatment for bacterial vaginosis, International Journal of Gynecology & Obstetrics, 104: 44-48.

Szablicka, D., Wysokińska, A., Pawlak, A. and Roman, K., 2022. Morphometry of Boar Spermatozoa in Semen Stored at 17° C,The Influence of the Staining Technique. Animals, 12(15), 1888.

Zambrano, E, GL Rodriguez-Gonzalez, C Guzman, R Garcia-Becerra, L Boeck, L Diaz, M Menjivar, F Larrea, and PW Nathanielsz. 2005. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development, The Journal of physiology, 563: 275-84.

Zhang, L., Xu, S., Huang, Q. and Xu, H., 2018. N-acetylcysteine attenuates the cuprizone-induced behavioral changes and oligodendrocyte loss in male C57BL/7 mice via its anti-inflammation actions. Journal of neuroscience research, 96(5), 803-816.

Artemisinin and N-acetylcysteine combination therapy alters the state of spermatological indices

Behnaz Abedi[1], Davoud Kianifard[1], Mehdi Basaki[1] ,*Hossein Tayefi-Nasrabadi[1]

[1] Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Abstract

Artemisinin is an effective compound of the medicinal plant *Artemisia annua* L., which is used in the treatment of infectious and inflammatory diseases, malaria, cancer and diabetes mellitus. Studies have shown that the artemisinin, especially in high doses, causes tissue damage, including testicular tissue and spermatological indices, through the increase of free radicals and the process of oxidative stress. N-acetylcysteine (NAC) is one of the antioxidant compounds that has the ability to remove free radicals due to having a sulfhydryl group. The purpose of this research is to investigate the possible role of NAC in reducing the side effects caused by artemisinin on spermatological indices. Three groups of ten healthy male mice (25-30 g) were randomly assigned to different experimental groups. These groups received DMSO and corn oil as an artemisinin solvent (Control), 250 mg kg^{-1} artemisinin (Art-250) and 250 mg kg^{-1} artemisinin + 150 mg kg^{-1} NAC (Art-250+NAC-150) for a period of 7 days. The epididymis of different groups was prepared to evaluate the spermatological indices. Results showed that the high dose of artemisinin (Art-250) significantly reduced the sperm count, motility and viability compared to the control group. Also, the co-administration of NAC with artemisinin (Art-250+NAC-150) prevented the side effects caused by high doses of artemisinin on spermatological indices.

Keywords: Artemisinin, N-acetylcysteine, Spermatological indices, Combination therapy.

* E-mail: tayefi@tabrizu.ac.ir

ساپونین ها: ترکیبات فیتوشیمیایی با پتانسیل درمانی

محبوبه زارع [۱]

دانشکده گیاهان دارویی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، مازندران، ایران.

چکیده

ساپونین ها ترکیبات گلیکوزیدی هستند که در گیاهان زیادی یافت می شوند. برخی از ساپونین ها توانایی همولیز سلول های خون و تشکیل کمپلکس های نامحلول با کلسترول را دارند. ساپونین ها به عنوان محصولات گیاهی گلیکوزیدی از یک ترکیب اصلی و یک جزء قندی متغیر تشکیل شده اند. ساپونین ها به عنوان گلیکوزیدهای تری ترپن، گلیکوزیدهای اسپیروستانول و گلیکوزیدهای آلکالوئید استروئیدی طبقه بندی می شوند. اخیراً افزایش تقاضا برای کاربردهای ساپونین به دلیل اعمال مختلف بیولوژیکی و دارویی مشاهده شده است. بنابراین، این مقاله مروری اطلاعاتی در مورد شیمی ساپونینها و خواص درمانی آنها ارائه می دهد.

واژگان کلیدی: ساپونین ها، فیتوشیمیایی، سرطان، افسردگی، بیماری قلب و عروق.

[۱] E-mail: M.Zare@ausmt.ac.i.

۱. مقدمه

گیاهان دارویی منبع اصلی برای تهیه و استخراج انواع مختلف داروها و مواد دارویی مدرن مانند ساپونین ها هستند. برخی از مهم ترین ترکیبات زیست فعال ساپونین ها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها هستند. در این میان ساپونین های طبیعی در تهیه داروهای مدرن بکار گرفته می شوند. ساپونین ها دسته ای از ترکیبات بیورگانیک هستند که به وفور در قلمرو گیاهی یافت می شوند. به طور خاص، آنها گلیکوزیدهای طبیعی هستند که با کف کردن صابون مانند توصیف می‌شوند و در نتیجه وقتی در محلول‌های آبی تکان می‌خورند، کف تولید می‌کنند. از نظر ساختاری ساپونین ها دارای یک یا چند قند آبدوست همراه با یک مولکول تری ترپن، استانول و یا آلکالوئید چربی دوست هستند. منابع مختلف نشان می دهد که ساپونین ها نقش بیولوژیکی و خواص دارویی مانند ضد التهابی، ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی، حشره کش، ضد سرطانی دارند. علاوه بر این، گزارش شده است که ساپونین ها در حیوانات و انسان ها اثر کاهش دهنده کلسترول را نشان می دهند. اهمیت بالینی ساپونین های تری ترپنوئید در پیشگیری و درمان بیماری های عروقی بررسی شده است. این ترکیبات گیاهی به عنوان پیش ماده اولیه برای نیمه سنتز داروهای استروئیدی در صنعت داروسازی در نظر می شوند. تحقیقات و کاربردهای دارویی فوق نشان دهنده افزایش علاقه به ساپونین ها به عنوان یک منبع طبیعی زیستی است (Aziz et al., 2019).

۲. شیمی ساپونین ها

ساپونین ها گلیکوزیدهای تری ترپن ها، استروئیدها و گاهی آلکالوئیدها هستند که عمدتاً، اما نه منحصراً در گیاهان وجود دارند. بنابراین بسته به ماهیت آگلیکون، ساپونین ها را می توان به عنوان استروئیدی، تری ترپنوئیدی یا آلکالوئیدی طبقه بندی کرد. بخش آگلیکون یک ساپونین به عنوان ساپوژنین شناخته می شود، در حالی که بخش های گلیکون ساپونین ها عموماً الیگوساکارید هستند. الیگوساکاریدها ممکن است از طریق پیوند اتری یا استری در یک یا دو محل گلیکوزیلاسیون به ساپوژنین متصل شوند و به ترتیب ساپونین های مونودسموزیدی یا بیدموزیدی مربوطه را ایجاد کنند. چسبیدن گلیکون به سه محل (تریدموزیدیک) در ساپوژنین نادر است (Kareru et al., 2008).

۳. اثرات درمانی ساپونین ها

انواع مختلف ساپونین ها از نظر فارماکولوژیک فعال هستند و گزارش شده است که باعث اثرات ضد التهابی، ضد میکروبی (باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها) و سیتوتوکسیک می شوند (Sparg et al., 2004). در زیر به اثرات درمانی ساپونین ها بروی برخی بیماریها اشاره شده است.

۱.۳. ساپونین ها و اثر ضد افسردگی

گزارش های پیش بالینی فزاینده ای وجود دارد که نقش بالقوه ساپونین ها را در درمان افسردگی بالینی نشان می دهد. در این راستا، ساپونین های کل موجود در نخل آرِکا، مارچوبه گردی، چتر گندمی داسی، جینسنگ، و تریچپوس زیلانیکوس به عنوان ضد افسردگی در جوندگان با استفاده از پارادایم های رفتاری مختلف نشان داده شد. همچنین چندین ساپونین فعال مانند باکوپازیدهای به دست آمده از گیاه باکوپا مونیری، و یوانزی-۱ یک ساپونین تری ترپنوئیدی جدا شده از ریشه خشک شده گیاه *Polygala tenuifolia*، در جوندگان نیز به عنوان ضد افسردگی شناخته شدند. با این حال، بیشتر کار بر روی عصاره‌های خام انجام شد و شناسایی محتویات ساپونین که دارای اثر ضد افسردگی هستند باید مورد بررسی قرار گیرند. گزارش های ذکر شده نشان می دهد که در دهه گذشته، افزایشی در گزارش های پیش بالینی وجود داشته است که پتانسیل ضد افسردگی ساپونین ها را نشان می دهد. با این حال، شکافی که باید پر شود فقدان گزارش های بالینی است که فعالیت ضد افسردگی ساپونین ها را در افراد افسرده نشان می دهد (Abbas et al., 2015).

۲.۳. ساپونین ها به عنوان عوامل ضد سرطان

در سال ۱۹۷۶ یکی از اولین مطالعات با ساپونین ها برای درمان سرطان توسط ابسن و همکارانش شرح داده شد. ساپونین کیویل بقای موش هایی را که به سرطان خون مبتلا شده بودند طولانی کرد علاقه فزاینده ای به ساپونین ها به عنوان داروهای بالقوه برای درمان سرطان در دهه ۱۹۹۰ رخ داد. مطالعه ای که به بررسی اثر بازدارنده رشد ساپونین های سایکوسپونین-۱ پرداخته بود، نشان داد که سایکوسپونین تکثیر سلولی سلول های کبدی انسانی را مهار می کند. یو و همکاران یک ساپونین تری ترپنوئیدی به نام توبیموزید-۱ را از پیاز گیاه چینی بلبوستما پانیکوالتوم (کدوییان) شناسایی کرد. این ساپونین دارای اثر ضد توموری قوی در مدل تومور پوست موش بود. تعداد مطالعات روی ساپونین ها به عنوان داروهای ضد تومور در دهه گذشته به شدت افزایش یافته است. این بررسی بر روی اثرات ضد سرطانی مستقیم گروه‌های خاصی از ساپونین‌ها تمرکز دارد. تقریباً همه ساپونین‌ها آپوپتوز را در سلول‌های تومور القا می‌کنند، آنها داروهای ارجح برای درمان سرطان هستند، زیرا حذف سلول‌های تومور با آپوپتوز برای کاهش عوارض جانبی در بیماران با اجتناب از نکروز مفید است (Bachran et al., 2014).

۳.۳. اثرات محافظتی ساپونین بر بیماری های قلبی عروقی

مطالعات متعددی ثابت کرده اند که ساپونین ها یک عامل طبیعی محافظت کننده قلب است. برای مثال ساپونین‌ها از اجزای اصلی چربی دوست استخراج شده از *Panax notoginseng* هستند، اثرات درمانی قابل توجه و اثرات دارویی متعددی از جمله ضد پلاکتی، ضد انعقاد، ضد ترومبوتیک، ضد آترواسکلروز، کاهش دهنده چربی، گشادکننده عروق، ضد التهاب، ضد هیپلاسمی، ضد کم خونی، ضد کم خونی و ترویج اثرات رگزایی دارند. همه این موارد نشان می دهد که این ساپونین مستخرج از جنسینگ می تواند کل بدن را با عمل بر روی چند مرکز و چند هدف برای محافظت تنظیم کند و برای بیماری های قلبی عروقی موثر می باشد. تحقیقات در مورد اثر ضد پلاکتی و ضد انعقادی و اثر ضد آترواسکلروز کافی بود و در مقایسه با سایر اثرات مطالعات بیشتر انجام شد (Yang et al. 2014).

٤. بحث و نتیجه‌گیری

تعداد ساپونین های جدید استخراج و جداسازی شده از گیاهان به طور مداوم در حال افزایش است و دانشمندان زیادی در جهت بهبود روش های خالص سازی و تشخیص و شناسایی ساپونین ها گام برداشته اند. اکثر ساپونین های جدید و همچنین چندین ساپونین معروف دارای اثرات ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد میکروبی و ضد افسردگی چشمگیر هستند و ممکن است به توسعه رژیم های غذایی و داروی بهبود یافته کمک کنند. اگرچه تلاش¬های زیادی برای تهیه و بررسی اثرات بیولوژیکی ساپونینها صورت گرفته است، این حوزه همچنان محدودیت¬های زیادی دارند. مطالعات انجام شده به¬صورت آزمایشگاهی بوده و گزارش‌های بالینی بسیار کمی در رابطه با ساپونینها در دسترس است. همچنین استانداردهای لازم جهت مصرف ساپونین های مختلف ارایه نشده است. بنابراین باید به ساپونین ها توجه ویژه شود زیرا این داروها رژیم های درمانی بسیار کارآمدی را در برابر بیماریهای مختلف نظیر سرطان ارائه می دهند.

منابع

El Aziz, M.M.A., Ashour, A.S., Melad, A.G., 2019. A review on saponins from medicinal plants: chemistry, isolation, and determination. J. Nanomed. Res, 8(1): 282-288.

Kareru, P. G., Keriko, J. M., Gachanja, A. N., & Kenji, G. M. 2008. Direct detection of triterpenoid saponins in medicinal plants. African journal of traditional, complementary and alternative medicines, 5(1): 56-60.

Sparg, S., Light, M., Van Staden, J., 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. J Ethnopharmacol. 94: 219–243.

Abbas, G., Rauf, K., Mahmood, W. 2015. Saponins: the phytochemical with an emerging potential for curing clinical depression. Natural product research, 29(4): 302-307.

Bachran, C., Bachran, S., Sutherland, M., Bachran, D., Fuchs, H. 2014. Preclinical studies of saponins for tumor therapy. In Recent advances in medicinal chemistry 272-302.

Yang, X., Xiong, X., Wang, H. and Wang, J., 2014. Protective effects of panax notoginseng saponins on cardiovascular diseases: a comprehensive overview of experimental studies. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014.

Saponins: phytochemical compounds with therapeutic potential

*[1]**Mahboobeh Zare**

Faculty of medicinal plants, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

Abstract

Saponins are glycosidic compounds occurring abundantly in the plant kingdom. Some saponins have the ability to hemolyze blood cells and form insoluble complexes with cholesterol. Being glycosidic plant products, the saponins are composed of a parent compound and a variable sugar component. Saponins are classified as triterpene glycosides, spirostanol glycosides and steroidal alkaloid glycosides. Recently, the increase in demand of saponin applications was observed due to various biological, medicinal, and pharmaceutical actions. Therefore, this present review article provides detailed information about the chemistry of saponins and their therapeutic properties

Keywords: saponins, phytochemicals, cancer, depression, cardiovascular disease.

Email: [1] M.zare@ausmt.ac.ir

ساخت نانوکپسول کوئرستین و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و زیست فراهمی آن در جهت دارورسانی هدفمند

علی طراوتی*[1]، ملیحه سادات عطری[1]، هانیه خبیری[1]

[1]گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

چکیده

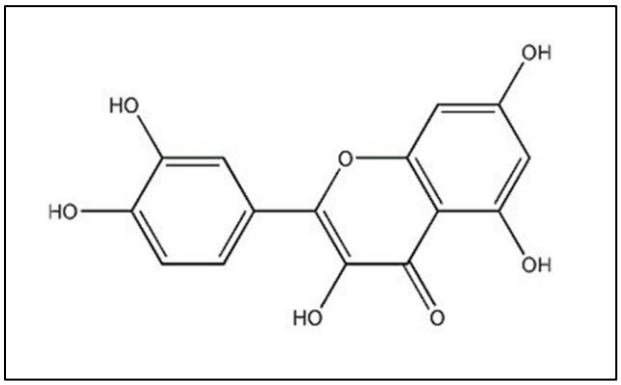
فلاونوئیدها متابولیت های ثانویه گیاهی اند که دارای بسیاری از عملکردهای دارویی و بیولوژیکی هستند.در میان فلاونوئیدها، کوئرستین یکی از فلاوینوئیدهای اصلی است که در پیاز، سیب و بسیاری از قسمت های گیاهان وجود دارد. اثرات دارویی کوئرستین مانند اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و غیره ثابت می‌کند که کوئرستین دارای پتانسیل درمانی خوبی است.کوئرستین علی رغم اثرات مفید دارای معایبی مانند حلالیت ضعیف، فراهمی زیستی کم و غیره است که برای غلبه بر آنها، کوئرستین را در پلیمرها محصور می کنند. اخیراً ایده استفاده از نانوذرات ساخته شده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر طبیعی از جمله کیتوزان و آلژینات برای تحویل داروها مورد توجه قرار گرفته است که سیستم تحویلی داروی پلیمری چسبنده به دلیل مزایایی که نسبت به روش های کلاسیک دارد بیشتر رواج یافته است. پلیمرهای مخاط چسبنده تغییر یافته برای اتصال قوی تر به سطح مخاطی مانند پلیمرهای تیوله توسعه یافته اند. بر این اساس، در این پژوهش نانوذره آلژینات/کیتوزان و نانوذره آلژینات/کیتوزان تیوله سنتز و برای کپسوله کردن کوئرستین مورد بررسی قرار گرفتند. این نانوذرات با روش ژله‌ای شدن یونی سنتز شدند و از تیوگلیکولیک اسید برای تیوله کردن کیتوزان استفاده شد. خواص آنتی اکسیدانی نانوکپسول‌های حاوی کوئرستین بر اساس توانایی روبش گری رادیکال ABTS اندازه گیری شد. از طیف سنجی انتقال فوریه (FT-IR) جهت بررسی نانوذرات سنتزی استفاده شد. خواص آنتی اکسیدانی نانوذرات تیوله و غیر تیوله به ترتیب ٪۸۴ و ٪۷۹/۸۵ بدست آمد. بر اساس نتایج این تحقیق نانوذره سنتز شده از کیتوزان تیوله می‌تواند کاندیدای خوبی برای اهداف دارو رسانی کوئرستین باشد.

واژگان کلیدی: نانوذره؛ کیتوزان تیوله؛ آلژینات؛ کوئرستین

*1 Email: a.taravati@umz.ac.ir

۱. مقدمه

فلاونوئیدها متابولیت های ثانویه گیاهی اند که دارای بسیاری از عملکردهای دارویی و بیولوژیکی هستند.در میان فلاونوئیدها، کوئرستین یکی از فلاوینوئیدهای اصلی است که اسکلت اولیه بسیاری از فلاونوئیدهای دیگر را تشکیل می دهد (Terao et al., 1994). و یکی از فراوان ترین فلاونوئیدها در رژیم غذایی است(ساختار آن در شکل ۱ نشان داده شده است). که معمولا به صورت گلیکوزیله در میوه ها، سبزیجات و غلات مختلف مانند سیب، انگور، زغال اخته، پیاز، بروکلی و غیره یافت می شود و معمولا در طب سنتی چینی مورد استفاده می گیرد. نشان داده شده است که کوئرستین عوارض جانبی کمی دارد و همچنین دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی و ارزش دارویی از جمله خواص ضد تومور، آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد دیابت، محافظت از کبد، محافظت عصبی و محافظت قلبی و عروقی است (Zhao et al., 2022).



شکل ۱. فرمول شیمیایی کوئرستین(Zhao et al., 2022)

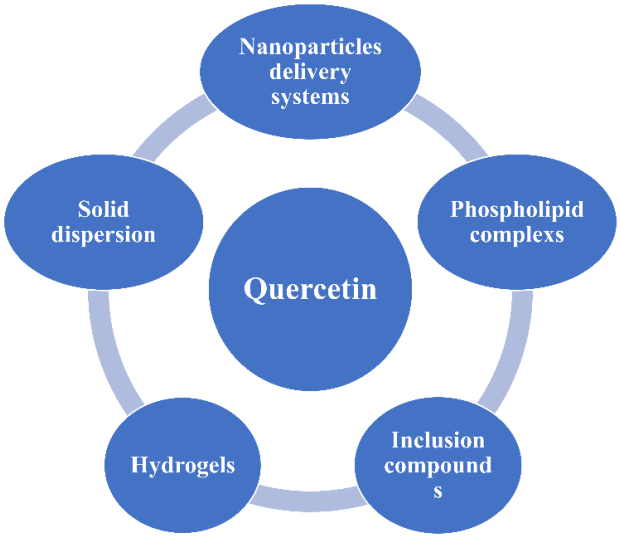
فعالیت آنتی اکسیدانی کوئرستین مستند شده است زیرا می تواند گونه های فعال اکسیژن را پاکسازی کند (Boots et al., 2008).کوئرستین برای پیشگیری از سرطان با تعدیل عوامل استرس اکسیداتیو و آنزیم های آنتی اکسیدانی برای جلوگیری از گسترش سرطان های مختلف استفاده می شود (Sharmila et al., 2014).

به دلیل حلالیت کم کوئرستین در آب و جذب ضعیف آن در دستگاه گوارش مصرف خوراکی آن محدود است، در حالی که فراهمی زیستی و زیست فعالی، ناپایداری شیمیایی و نفوذپذیری آن (به ویژه در محلول های آبی قلیایی)کاهش می یابد و احتمالا به دلیل فرسایش حلقه C توسط یون های هیدروکسید است که اثربخشی آن را به شدت کاهش می دهد و کاربردهای بالینی آن را محدود می کند (Fasolo et al., 2007; Luca et al., 2020).

بنابراین بسیاری محققان استراتژی‌های بسیاری را برای بهبود حلالیت و فراهمی زیستی کوئرستین و کاربردهای بالینی آن مطالعه کرده‌اند.اخیراً سیستم های مختلف دارورسانی به طور گسترده ای برای کوئرستین به منظور گسترش کاربرد های فارماکولوژیک آن توسعه یافته اند. در شکل ۲ انواع سیستم های تحویل بارگذاری شده با کوئرستین نشان داده شده است.

سیستم های تحویل نانوذرات به آماده سازی ذرات در فازجامد، مایع یا گازی با اندازه معین (میکرون یا نانومتر) اشاره دارد که دارای خواصی از جمله ظرفیت بارگذاری بالای دارو، کاهش نوسانات غلظت خون و و عوارض جانبی موضعی و سیستمیک هستند. آنها همچنین می توانند اثربخشی و سازگاری بیمار، افزایش حلالیت داروهای نامحلول، فراهمی زیستی و پایداری ذرات

دارو را در محیط بهبود بخشند در نتیجه انتشار دارو را به تاخیر اندازد و موجب بهبود هدف گذاری دارو شوند. بر اساس گزارش‌ها، سیستم‌های انتقال ذرات کوئرستین را می‌توان به لیپوزوم، نانوذرات، نانوامولسیون، نانوکپسول و... تقسیم کرد (Zhao et al., 2022).



شکل۲. انواع سیستم های تحویل بارگذاری شده با کوئرستین(Zhao et al., 2022)

همچنین سیستم تحویلی دارو با پلیمرهایی که دارای خاصیت چسبندگی هستند به دلیل مزایایی که نسبت به روش های کلاسیک دارد بیشترروا‌ج یافته است. این پلیمرها با گروه های عاملی اصلاح شده نظیر تیول برای اتصال قوی تر به سطح مخاطی توسعه یافته اند و همچنین تیومرها به دلیل اینکه شکاف های بین سلولی برای نفوذ پلیمرها را گسترش می دهند به عنوان تقویت کننده های نفوذ عمل می کنند (Tonglairoum & Opanasopit, 2014).

کیتوزان یک پلی ساکارید خطی پلی کاتیونی طبیعی است و حاصل از استیل زدایی جزئی کیتین است (Chandy & Sharma, 1990).کیتوزان از D-گلوکوزامین و N–استیل–D–گلوکزامین تشکیل شده است که با پیوند (۴-۱) β به هم متصل هستند که به طور تصادفی در داخل پلیمر توزیع شده اند (Venkatesan & Kim, 2010). ویژگی های جالب کیتوزان مانند زیست سازگاری، غیر سمی بودن، حساسیت زایی کم و زیست تخریب پذیری امکان استفاده از آن را در انواع مختلف پروژه های زیست پزشکی فراهم کرده است (Kumar et al., 2004).

آلژینات یک پلی ساکارید است که از جلبک های دریایی قهوه ای استخراج می شود (Jain & Bar-Shalom, 2014; Lee & Mooney, 2012). که از توالی مونومر های α-L گولورونات و β -D مانورونات با اتصال ۴-۱ تشکیل شده است. این ترکیب یک پلیمر زیست سازگار است که سمیت بسیار کمی دارد (Ching et al., 2017). این ویژگی دلیل اصلی کاربرد گسترده ی این ترکیب در زیست پزشکی است (Sosnik, 2014; Zhang et al., 2019).

بر این اساس، در این پژوهش نانوذره آلژینات/کیتوزان و نانوذره آلژینات/کیتوزان تیوله سنتز و برای کپسوله کردن کوئرستین مورد بررسی قرار گرفتند که خواص آنتی اکسیدانی نانوکپسول های حاوی کوئرستین بر اساس توانایی روبش گری رادیکال ABTS اندازه گیری شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مواد مورد استفاده در آزمایش

آلژینات، کیتوزان، کلسیم کلرید، سدیم کلرید (NaCl)، پتاسیم کلرید، سدیم هیدروکسید، استیک اسید، هیدروژن کلرید، تیوگلیکولیک اسید(TGA)، ۱-اتیل-۳-(۳-دی‌متیل‌آمینوپروپیل) کربودی‌ایمید (EDAC)، دی‌متیل سولفواکسید (DMSO)، پتاسیم پرسولفات، محلول بافر فسفات سالین(PBS)، ۲و۲-آزینو-بیس(۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید)(ABTS)

۲.۲. روش تحقیق

۱.۲.۲. روش تهیه کیتوزان تیوله

برای تهیه محلول کیتوزان تیوله، ۰/۱۲۵ گرم از پودر کیتوزان در یک میلی لیتر محلول هیدروژن کلرید یک مولار حل شد سپس ۱۱/۵ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شد و بعد از حل شدن کامل کیتوزان، ۰/۱۱۹۵ گرم EDAC به محلول اضافه شد و در مرحله ی بعد ۹۴/۵ میکرولیتر تیوگلیکولیک اسید به محلول اضافه شد سپس pH آن بر روی ۵ تنظیم شد و بعد به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. بعد محلول حاصل در کیسه دیالیز قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در یک بشر که حاوی ۱ لیتر محلول هیدروژن کلرید ۵ میلی مولار بود قرار داده شد و در مرحله ی بعد کیسه دیالیز در ۱ لیتر محلول هیدروژن کلرید ۵ میلی مولار حاوی ۱۰ گرم NaCl قرار داشته شد و بعد از این مدت زمان محلول کیتوزان تیوله از کیسه دیالیز خارج شد و در یخچال نگهداری شد. سنتز این محلول بر اساس متد مقاله نام برده شده با کمی تغییرات انجام پذیرفت (Saboktakin et al., 2011).

۲.۲.۲. ساخت نانوکپسول کیتوزان تیوله/غیر تیوله – آلژینات بارگذاری شده با کوئرستین

همه ی این نانوذرات با روش ژلی شدن یونی سنتز شدند که برای تهیه این نانوذرات، دارو با غلظت ۱/۱۴ mg/ml مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور ۲۰ میلی گرم از پودر کوئرستین در یک میلی لیتر DMSO حل شد سپس حجم مورد نیاز از محلول کیتوزان تیوله محاسبه گردید(۱/۷۴ میلی لیتر) و این مقدار با استیک اسید ۱٪ به حجم ۱۶ میلی لیتر رسید و محلول دارو به آن اضافه گردید. سپس به ۴۰ میلی لیتر محلول آلژینات، ۸ میلی لیتر محلول کلسیم کلرید و کیتوزان تیوله حاوی کوئرستین قطره قطره با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه اضافه گردید تا یک محلول یکنواخت حالت ژله ای و نارنجی رنگ حاصل شد که با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی از رسوب جدا شد و رسوب حاصل در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. برای ساخت نانوذرات غیر تیوله، از کیتوزان غیر تیوله حاوی

دارو استفاده شد و بقیه ی مراحل تکرار شد. سنتز این نانوکپسول ها بر اساس متد مقاله نام برده شده با کمی تغییرات انجام پذیرفت (Li et al., 2008).

۳.۲.۲. آزمایش آنتی اکسیدانی

ابتدا محلول ABTS سپس محلول پتاسیم پرسولفات و محلول PBS ۱۰ میلی مولار با pH برابر ۷/۴ تهیه شد.در مرحله ی بعد مقدار برابر از دو محلول اول با هم مخلوط شد و به مدت ۱۶ ساعت در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در دستگاه آون انکوبه شد و بعد این محلول با PBS رقیق سازی شد تا جذب آن در ۷۳۴ نانومتر به ۰/۷ برسد. در مرحله ی بعد ۲ میلی لیتر از این محلول در دو میکروتیوپ اضافه شد. در میکروتیوپ اول ۵ میلی گرم نانوذره ی ساده حاوی دارو، در میکروتیوپ دوم ۵ میلی گرم نانوذره ی تیوله حاوی دارو اضافه گردید و بعد از ۵ دقیقه جذب ۳۰۰ میکرولیتر از هریک از محلول ها در ۷۳۴ نانومتر اندازه گیری شد. این آزمایش بر اساس متد مقاله نام برده شده با کمی تغییرات انجام پذیرفت (Kumar et al., 2013).

۳. نتایج

۱.۳. آزمایش آنتی اکسیدانی

نتایج بدست آمده از این آزمایش در جدول ۱ ارائه شد.

جدول ۱. فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات حاوی کوئرستین

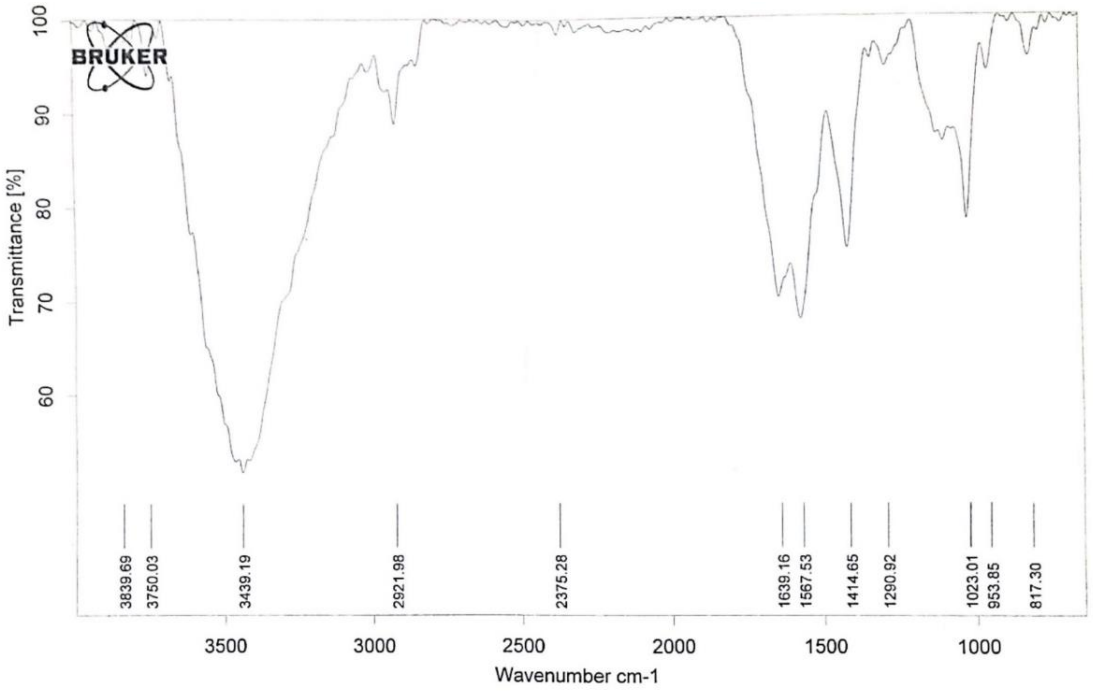
نمونه	فعالیت آنتی اکسیدانی(٪)
نانوذرات تیوله	٪۸۴
نانوذرات غیر تیوله	۷۹٪/۸۵

۲.۳. نتایج FT-IR

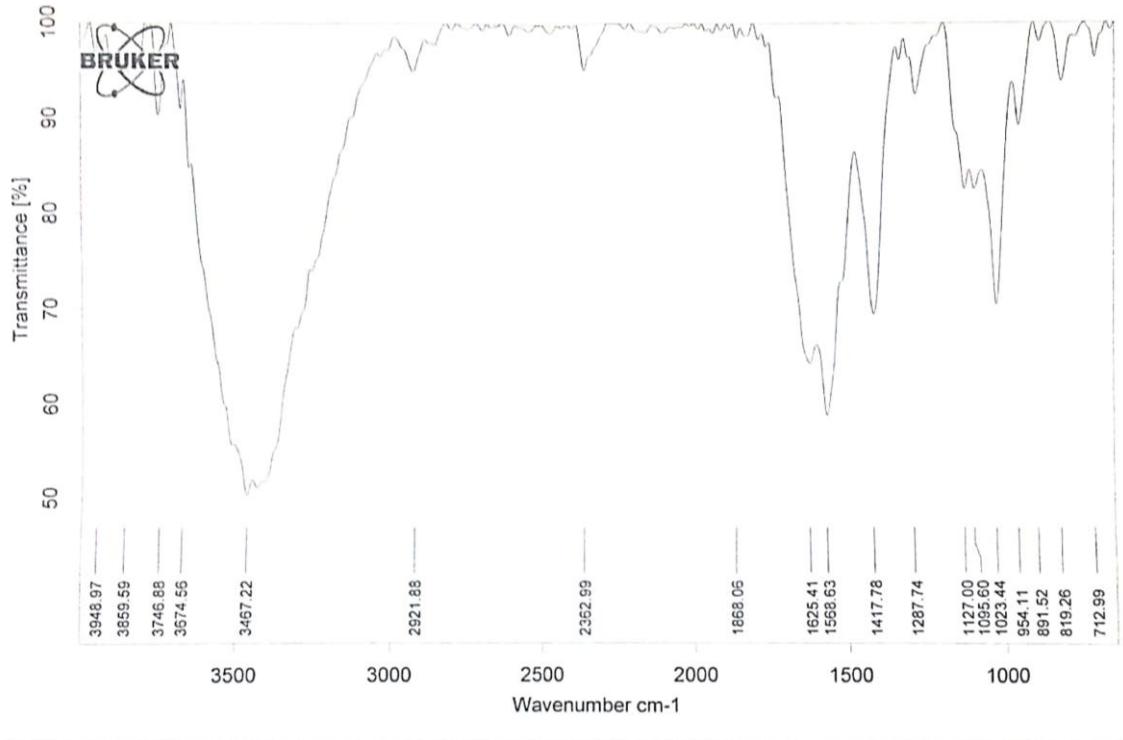
جهت بررسی تشکیل گروه عاملی روی نانوذرات روش اسپکترومتری تبدیل فوریه مادون قرمز(FT-IR) مورد استفاده گرفت که نتایج نانوذرات کیتوزان-آلژینات حاوی کوئرستین در نمودار ۱ و نانوذرات کیتوزان تیوله-آلژینات حاوی کوئرستین در نمودار ۲ نشان داده شده است.

از طیف های بدست آمده یک پیک کیتوزان و آلژینات در حدود $3453cm^{-1}$ مشاهده شد همچنین پیک مشاهده شده در محدوده ی $1633\ cm^{-1}$ وجود گروه C=O را اثبات می کند که برهکمنش بین COO^- آلژینات و NH^+ کیتوزان را نشان می دهد (Suryani et al., 2015).

پیک های مشاهده شده در محدوده ی نزدیک به $1605\ cm^{-1}$ ممکن است به ارتعاشات کششی C=C حلقه ی فنیل مرتبط باشد (Yadav et al., 2020).



نمودار ۱. نانوذرات کیتوزان-آلژینات حاوی کوئرستین



نمودار ۲. نانوذرات کیتوزان تیوله-آلژینات حاوی کوئرستین

٤. بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه ای در سال ۲۰۱۷ زیست سازگاری و کارایی آنتی اکسیدانی نانوذرات کیتوزان-آلژینات بارگذاری شده با کوئرستین را مورد ارزیابی قرار دادند که دو نوع از نانوذرات کیتوزان/آلژینات که از نظر اندازه و بار متفاوت بودند(به دلیل وجود نسبت های مختلف از این دو بیوپلیمر) را مورد بررسی قرار دادند و فعالیت آنتی اکسیدانی کوئرستین بارگذاری شده در نانوذرات کیتوزان/آلژینات را در مدل‌های استرس اکسیداتیو در سلول‌های کبدی تازه جدا شده و میکروزوم‌های کبدی موش صحرایی تعیین کردند. اما در پژوهش حاضر از دو نوع نانوذره تیوله و غیرتیوله استفاده شد و همچنین از سلول های تازه جدا شده در مدل حیوانی استفاده نشد و به جای آن روش ABTS (حل کردن نانوذرات بارگذاری شده در محلول ABTS) مورد استفاده قرار گرفت و نتایج هر دو مطالعه نشان داد که کیتوزان-آلژینات می تواند حامل خوبی برای کوئرستین باشد و اگر کوئرستین در این نانوذرات کپسوله شود اثر آنتی اکسیدانی و فعالیت محافظتی آن بهبود می یابد (Aluani et al., 2017). همچنین در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۹ نانوذرات fucoidan/chitosan بارگذاری شده با کوئرستین را سنتز شد.نانوذرات با روش خود مونتاژی پلی الکترولیت در سه نسبت وزنی مختلف تهیه شدند. و مشخص شد که کوئرستین بارگذاری شده در این نانوذرات دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قوی و رهاسازی کنترل شده در یک محیط شبیه سازی شده گوارشی است که از تجزیه کوئرستین در مصرف خوراکی جلوگیری می کند (Barbosa et al., 2019). اما در پژوهش حاضر از نانوذرات آلژینات/کیتوزان و آلژینات/کیتوزان تیوله با یک غلظت مشخص استفاده شد که با روش ژلی شدن یونی تهیه شده بودند و مشخص شد که نانوذرات حاوی کوئرستین دارای خواص آنتی اکسیدانی خوبی هستند که برای نانوذره ی تیوله این مقدار بیشتر بود.

در مطالعه دیگری به موش‌های صحرایی نر با هورمون (تستوسترون) و عامل سرطان‌زا (MNU) سرطان پروستات را القا کردند و آنها را به طور همزمان با کوئرستین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) سه بار در هفته تحت درمان قرار دادند. فعالیت آنتی اکسیدانی کوئرستین در مقایسه با عوامل سرطان زا و تستوسترون با اندازه گیری بافت شناسی و نشانگرهای استرس اکسیداتیو مانند گلوتاتیون، پراکسیداسیون لیپیدی و پراکسید هیدروژن در موش های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.آنها دریافتند که موش‌های تحت درمان با عوامل سرطان‌زا و تستوسترون در مقایسه با موش های تحت درمان با کوئرستین دارای سطوح بالاتری از پراکسیداسیون لیپیدی و پراکسید هیدروژن و سطوح پایین‌تری از گلوتاتیون هستند (Sharmila et al., 2014). اما در پژوهش حاضر از کوئرستین بارگذاری شده در نانوذرات استفاده شد و همچنین مدل حیوانی مورد استفاده قرار نگرفت و همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات بر اساس توانایی روبش گری کاتیون ABTS اندازه گیری شد که برای نانوذره ی غیر تیوله ٪۷۹/۸۵ و نانوذره ی تیوله ٪۸۴ بدست آمد.

منابع

Aluani, D., Tzankova, V., Kondeva-Burdina, M., Yordanov, Y., Nikolova, E., Odzhakov, F., Apostolov, A., Markova, T., & Yoncheva, K. (2017). Evaluation of biocompatibility and antioxidant efficiency of chitosan-alginate nanoparticles loaded with quercetin. *International journal of biological macromolecules*, *103*, 771-782.

Barbosa, A. I., Costa Lima, S. A., & Reis, S. (2019). Application of pH-responsive fucoidan/chitosan nanoparticles to improve oral quercetin delivery. *Molecules*, *24*(2), 346.

Boots, A. W., Haenen, G. R., & Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*, *585*(2-3), 325-337.

Chandy, T., & Sharma, C. P. (1990). Chitosan-as a biomaterial. *Biomaterials, artificial cells and artificial organs*, *18*(1), 1-24.

Ching, S. H., Bansal, N., & Bhandari, B. (2017). Alginate gel particles–A review of production techniques and physical properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, *57*(6), 1133-1152.

Fasolo, D., Schwingel, L., Holzschuh, M., Bassani, V., & Teixeira, H. (2007). Validation of an isocratic LC method for determination of quercetin and methylquercetin in topical nanoemulsions. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *44*(5), 1174-1177.

Jain, D., & Bar-Shalom, D. (2014). Alginate drug delivery systems: application in context of pharmaceutical and biomedical research. *Drug development and industrial pharmacy*, *40*(12), 1576-1584.

Kumar, M. R., Muzzarelli, R. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical reviews*, *104*(12), 6017-6084.

Kumar, V., Lemos, M., Sharma, M., & Shriram, V. (2013). Antioxidant and DNA damage protecting activities of Eulophia nuda Lindl. *Free Radicals and Antioxidants*, *3*(2), 55-60.

Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, *37*(1), 106-126.

Li, P., Dai, Y.-N., Zhang, J.-P., Wang, A.-Q., & Wei, Q. (2008). Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. *International journal of biomedical science: IJBS*, *4*(3), 221.

Luca, S. V., Macovei, I., Bujor, A., Miron, A., Skalicka-Woźniak, K., Aprotosoaie, A. C., & Trifan, A. (2020). Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Critical reviews in food science and nutrition*, *60*(4), 626-659.

Saboktakin, M. R., Tabatabaie, R. M., Maharramov, A., & Ramazanov, M. A. (2011). Development and in vitro evaluation of thiolated chitosan—poly (methacrylic acid) nanoparticles as a local mucoadhesive delivery system. *International journal of biological macromolecules*, *48*(3), 403-407.

Sharmila, G., Athirai, T., Kiruthiga, B., Senthilkumar, K., Elumalai, P., Arunkumar, R., & Arunakaran, J. (2014). Chemopreventive effect of quercetin in MNU and testosterone induced prostate cancer of Sprague-Dawley rats. *Nutrition and cancer*, *66*(1), 38-46.

Suryani, H. K., Ihsan, S., & Indalifiany, A. (2015). PREPARATION OF THEOPHYLLINE NANOPARTICLES BY IONIK GELATION TECHNIQUE USING CHITOSAN-ALGINATE AND ITS IN VITRO STABILITY TEST.

Terao, J., Piskula, M., & Yao, Q. (1994). Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *308*(1), 278-284.

Tonglairoum, P., & Opanasopit, P. (2014). Thiomers: a new generation mucoadhesive polymer for transmucosal drug delivery system. *Thai Bull Pharm Sci*, *8*, 19-28.

Venkatesan, J., & Kim, S.-K. (2010). Chitosan composites for bone tissue engineering—an overview. *Marine drugs*, *8*(8), 2252-2266.

Yadav, S., Mehrotra, G., Bhartiya, P., Singh, A., & Dutta, P. (2020). Preparation, physicochemical and biological evaluation of quercetin based chitosan-gelatin film for food packaging. *Carbohydrate polymers*, *227*, 115348.

Zhao, X., Deng, Y., Xue, X., Liao, L., Zhou, M., Peng, C., & Li, Y. (2022). Research Progress of Quercetin Delivery Systems. *Current Pharmaceutical Design*, *28*(9), 727-742.

Synthesis of quercetin nanocapsules and evaluation of its antioxidant properties and bioavailability for targeted drug delivery

Hanieh khabiri [1] , Malihe Sadat Atri[2] , Ali Taravati [3*]

[1] Department of Molecular and Cell Biology,Faculty of Basic Sciences,University of Mazandaran,Babolsar,Iran

Abstract:

Flavonoids are plant secondary metabolites that have many medicinal and biological functions. Among flavonoids, quercetin is one of the main flavonoids that are present in onions, apples and many other plant parts. The medicinal effects of quercetin, such as antioxidant, anti-inflammatory effects, etc., prove that quercetin has a good therapeutic potential. Despite its beneficial effects, quercetin has disadvantages such as poor solubility, low bioavailability, etc., to overcome them, quercetin is encapsulated in polymers. Recently, the idea of using nanoparticles made of natural biodegradable polymers such as chitosan and alginate for drug delivery has been considered, and the adhesive polymer drug delivery system has become more popular due to its advantages over classical methods. Modified mucoadhesive polymers have been developed to bind more strongly to the mucosal surface, such as thiolated polymers. Based on this, in this research, chitosan/alginate nanoparticles and thiolated chitosan/alginate nanoparticles were synthesized and investigated for quercetin encapsulation. These nanoparticles were synthesized by ionic gelation method and thioglycolic acid was used to add thiol group to chitosan. The antioxidant properties of quercetin-containing nanocapsules were measured based on ABTS radical scavenging ability. Fourier transform spectroscopy (FT-IR) was used to investigate synthetic nanoparticles. The antioxidant properties of thiolated and non-thiolated nanoparticles were obtained as 84% and 79.85%, respectively. Based on the results of this research, the nanoparticle synthesized from thiolated chitosan can be a good candidate for quercetin drug delivery purposes.

Keywords: Alginate; Nanoparticle; Quercetin; Thiolated Chitosan

[*]E-mail: a.taravati@umz.ac.ir

شگفتی طبیعت در درمان دیابت

مبینا اکرمی زاده*

گروه‌زیست شناسی، دانشکده‌علوم پایه، دانشگاه پیام نور، اصفهان

چکیده

دیابت نوع ۲ شایع ترین نوع دیابت است که شیوع آن به سرعت در حال افزایش است و از آن می توان به عنوان یک معضل عمده بهداشتی نام برد.دراین مقاله اطلاعات از جستجوی ادبیات پایگاه هایی نظیر pumbed-Google scholar با جستجو نام علمی و عمومی ادویه ها و کلماتی نظیر ضد دیابت ،هیپوگلیسمی،ضد قند خون ،دیابت نوع II به عنوان کلید واژه استفاده شدکه در برخی از گیاهان و ادویه ها خاصیت ضد دیابت از خود نشان داده اند که ممکن است به علت ماهیت القا کننده بر روی سلول ها B پانکرانس برای ترشح انسولین یا ترکیبات فعال زیستی مانند فلاونوئیدها ،الکالوئیدها ،آنتوسیانین ها که به عنوان مولکول ها انسولین مانند یا ترشح کننده انسولین عمل می کنند.که می توان نتیجه گرفت داروها گیاهی به علت قیمت کمتر و ارزان تر کاندید مناسبی برای درمان بیماری دیابت است چرا که داروها شیمیایی عوارض جانبی نیز دارند و استفاده کردن از ادویه ها در رژیم غذایی بیماران دیابتی علاوه بر خوشمزه کردن غذا به درمان این بیماران کمک فراوانی می کنند.

واژگان کلیدی: ضد دیابت ، هیپوگلیسمی، ضدهیپرگلیسمی، دیابت نوع II ، سلول بتا

* Mobinaakrami.68@gmail.com

۱. مقدمه

شیوع دیابت در سراسر جهان به سرعت در حال افزایش است . به طوری که پیش بینی میشود شیوع دیابت از ۳۸۲میلیون نفر فعلی به ۴۷۱ میلیون نفر تا سال ۲۰۳۵ افزایش یابد.اثرات نامطلوب هیپر گلیسمی ممکن است از ۴ مسیر متابولیک زیر باشد:

۱-فعال سازی پروتئین کیناز c

۲-افزایش مسیر هگزوز امین توسط ایزوفرم ها

۳-افزایش تشکیل محصول نهایی گلیکاسیون پیشرفته

۴-افزایش فعالیت مسیر آلدوز ردوکتاز

با اصطلاح رژیم غذایی در کنار دارودرمانی می توان به عنوان یک قدم موثر نام برد.ازویژگی ها پاتوفیزیولوژیک دیابت نوع II اختلال در ترشح انسولین است و افزایش مقاومت به انسولین است. از آنجا که عملکرد سلول ها بتا در طول زمان کاهش می یابد،هر دو سطح گلوکزخون ناشتا و گلوکز پس از غذا افزایش می یابد و از کنترل خارج می شود.اثرات مقاومت به انسولین بر اساس عملکرد فیزیولوژیک آن متفاوت است.اختلال در جذب گلوکز در ماهیچه ،تولید گلوکز توسط کبد،و همچنین متابولیسم لیپیدها که علاوه بر مقاومت به انسولین بر عملکرد سایر بافت ها مانند پانکرانس ،کلیه ،عروق مغزی،سلول ها اندوتلیال ،غده هیپوفیز و غدد جنسی هم اثر میگذاردوفرد دچار عوارض ثانویه دیابت شامل رتینوپاتی ،بیماری ها قلبی عروقی،آلزایمر و هم چنین در معرض سرطان کبد،پانکرانس و آندومتر را افزایش می دهد.بیماران دیابتی مستعد ابتلا به عفونت ها مثانه ،پوست و واژن هستند.طبیعت می توان گفت منبع برجسته داروها ضدیابت است و متعالات متعددی نشان داده شده است که میوه ها و سبزیجات به دلیل فعالیت شبه انسولین یا ترشح ترکیبات زیت فعال مانند آنتوسیانین ها و آنتوسیاندین ها که در آن ها وجود دارد به عنوان ترکیبات ضددیابتی می توان از آن ها نام برد.

استفاده از گیاهان دارویی به علت هزینه کم ، در دسترس بودن آسان و عوارض کم جانبی و دارا بودن پلی ساکاریدها ،صمغ گالاکتومان،پپتیدوگلیکان،گوانیدین ها ،گلیکوپپتیدها ،تری پنوئیدها،آلکالوئیدها،اسیدهاامینه ها،فلاوونوئیدهاکارتنوئیدها و یون ها دارای فعالیت ضد دیابت هستند (ماموسوری و همکاران ۱۳۸۹). آلکالوئیدها سبب مهار a گلوکوزیداز و کاهش انتقال گلوکز از طریق اپی تلیوم روده می شوند.درحالی که پلی ساکاریدها ،تری پنوئیدهاو گلیکوزیدها استروئیدی سطح انسولین سرم را افزایش می دهند.فلاونوئیدها متقابلا سطح گلوکز را سرکوب می کنندو با افزایش ترشح انسولین ازجزایر پانکرانس فعالیت گلوکوکیناز کبدی را رافزایش می دهند و اثرات مثبت سایر ادویه ها تا حد زیادی به ترکیبات پیچیده مثل فنول بستگی دارد.فنولیک ها به ترکیباتی که دارای یک یا چند حلقه متصل به گروه هیدروکسیل گفته می شود.ترکیبات فنلی شامل پلی فنل ها،اینلوئیدها و ترکیبات ارگانوسولفوردارهستند که به دلیل خواص آنتی اکسیدان فرد را در برابر بیماری دیابت حفظ میکنند.

۲. مواد و روش‌ها

با استفاده از جستجو ادبیاتی درpubmed-Google schalar بر اساس نام‌های رایج آلوئه ورا، زیره سیاه، دارچین، سیر، زنجبیل، زعفران، موسیر، زردچوبه، چای سبز، اسفناج، برگ کاری ، فلفل سیاه، خردل و میخک.

۳. نتایج

آلوئه ورا: بر اساس مطالعات انجام داده نشان داده شده است که عصاره آلوئه را آنزیم A گلیکوزیداز را با IC50 مهار می کند (اوکایر و همکاران ۲۰۰۶) و در یک مطالعه عصاره آبی آلوئه را باعث کاهش قابل توجهی در سطح قند خون موش ها دیابتی نشان داده شد(رحمان و همکاران ۲۰۱۱)و حتی می تواند بیماری شبکیه چشم حاصل از دیابت را نیز درمان کند(صابری و همکاران ۱۳۹۱).

زیره سیاه: در چندین مطالعه نشان داده شده است (احمد و همکاران ۲۰۱۳)که زیره سیاه جذب گلوکز روده ای را مهارمی کند و از آن به عنوان یک منبع امیدوار کننده برای دیابت می توان نام برد.

زیره: در طب عامیانه هم به عنوان منبع کاهش کلسترول خون و هم منبع کاهش قند در نظر گرفته شده است و در یک مطالعه بخش هایی از لوزالمعده موش ها آلوکساناته شده در معرض زیره سیاه به مدت دو ۲ هفته سبب کاهش قابل توجه در دژنراسیون واکوئلی جزایر سللول ها لانگرهانس شد (شفی و همکاران ۲۰۱۱).

سیر: سیر علاوه بر کاهش عوارض دیابت ،موجب جلوگیری از تصلب شرایین،و خطرات نفروپاتی کاهش می دهد.پیشنهاد شده است که تنظیم انسولین بیان ژن GluT-4 و مهار فعالیت آلفا گلوکوزیداز سبب تنظیم قند خون می شود.و هم چنین ترکیبات گوگردی S آلیل سیستئین سولفوکسیدجدا شده از سیر به طور قابل توجهی ترشح انسولین را از سلول ها b جزایر لانگرهانس تحت تاثیر قرار می دهد.

دارچین: به عنوان یک دارو عامیانه شناخته شده است و توسط سازمان غذا و دارو ایالات متحده آمریکا به عنوان یک غذا امن شناخته شده است.(تولیت و همکاران)آزمایشات نشان داده شده است که عصاره دارچین با دوز ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن باعث سرکوب مالتوز و ساکارز پس از غذا شد.عصاره مخمری دارچین سبب فعالیت مهاری a گلوکوزیداز با مقدار IC50 می شودو دارای نقش بالقوه در پیشگیری از مقاومت به انسولین و افزایش گیرنده انسولین GluT-4 و تری استر پرولین و سنتز گلیکوژن می شود(حسن زاده و همکاران ۱۳۹۱)وهم چنین موجب تنظیم سنتز سیتوکین ها پیش التهابی می شود.علاوه بر این نشان داده شده است که پلی مرها پلی فنل محلول در آب از دارچین دارای افزایش انسولین است در ۵۰ تا ۷۰ درصد از زنان مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک مقاومت به انسولین نشان داده شده ترکیبات پلی فنول (پروسیاندین A)محلول در آب تقویت کننده انسولین برای زنان مبتلا به این سندروم باشد(وانگ و همکاران)و از آن به عنوان به عنوان عامل جدیدی برای درمان دیابت نام برد.

زنجبیل و زردچوبه: هردو طبقه بندی علمی و یکسانی دارند و اجزای فعال بیولوژیک زنجبیل شامل جینجرول،زیرومبون و شوگاول است .پیشنهاد می شود که جینجرول برجسته ترین جز موجود در زنجبیل برای ترویج جذب گلوکز از خون است

(کریمی پور و همکاران ۱۳۸۶). در حالی که زردچوبه حاوی کورکومین ،دمتوکسی کورکومین و بیس متوکسی کورکومین است. زنجبیل دارای اثرات محافظتی بر روی کبد،کلیه ،چشم دیابتی است.عصاره زنجبیل دارای فعالیت مهاری آلفا گلوکوزیداز و آلفا آمیلاز با مقدار IC50 ۳/۱۸۰ میکروگرم در میلی لیتر بود (لی وهمکاران ۲۰۲۱۲) و از آنجا که زنجبیل انسولین تروپیک است مشخص شده است که دارای خواص ضد دیابتی بهتری از سیر دارد.زنجبیل دارای پتانسیل مفیدی برای معکوس کردن پروتئینوری است و آن را کاهش می دهد.در یک مطالعه بالینی مشخص شده است که مصرف عصاره زنجبیل بر مردان دیابتی سبب تمایز سلول ها چربی پیش آدیپوسیت و افزایش قدرت جنسی در مردان می شود (شالبی و هامونیه ۲۰۱۰).حالت های عملکرد زنجبیل بر کنترل قند خون عبارتند از(محمدی و همکاران ۱۳۹۷):

- مهار آنزیم ها یونی آلفا آمیلاز و آلفا گلیکوزداز در هضم کربوهیدرات
- افزایش ترشح و حسلسیت انسولین
- فعال سازی انتقال GluT-4 برای جذب گلوکز

کورکومین یکی از اجزا اصلی پودر ریزوماتوز زردچوبه است (پادارو و همکاران ۲۰۱۴)که موجب جذب گلوکز از روده می شود و هم چنین به علت استرتپتوزتوسین موجود در زردچوبه موجب عملکرد سلول ها بتا جزایر لانگرهانس می شود (چانگ و همکاران ۲۰۱۲).

چای سبز: به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی که دارد به عنوان یک نامزد مورد مناسب برای درمان ضد دیابت مورد استفاده قرار می گیرد چرا که موجب افزایش بیان GluT-4 میشود.مطالعات متعدد نشان می دهد که مصرف چای سبز یا ماده اصلی آن کاتچین قند خون را کاهش میدهد.و موجب کاهش آسیب ها کلیوی و نفروپاتی حاصل از دیابت می شود.

زعفران: عصاره آبی زعفران به طور معنی داری سطح گلوکز خون را کاهش و انسولین سرم را افزایش می دهد.زعفران و ترکیبات کروسین و سافرانال باعث کاهش سطح گلوکز خون ناشتا در افراد دیابتی می شود.عصاره اتانولی زعفران به طور قابل توجهی موجب کاهش قند خون ناشتا و افزایش انسولین سرم در موش ها صحرایی دیابتی شد(مهاجری و همکاران ۱۳۸۷)عصاره هیدرومتانولی زعفران نیز موجب کاهش قابل توجهی در گلوکز و کلسترول سرم موش ها صحرایی سالم شد.

موسیر: موسیر سرشار از فلاونوئیدها از جمله کورستین است (گریفث و همکاران ۲۰۰۲)که این کورستین به طور قابل توجهی سطح گلوکز ،کلسترول و تری گلیسرید پلاسما را کاهش می دهدو فعالیت گلوکوزناز کبدی را در موش ها صحرایی افزایش داد.یک مطالعه دیگر نشان داده است که عصاره آبی موسیر تاثیر هیپوگلیسمی برای انسولین ناشی از فروکتوز دارد.

اسفناج: اثر هیپوگلیسمی ممکن است از طریق اثر انسولین میمتیک یا مکانسیم ها دیگر مانند تحریک جذب گلوکزتوسط بافت محیطی،مهار تولید گلوکز درون زا یا فعال شدن گلوکونئوژنز در کبد و عضله می شود.

میخک: جوانه ها گل معطر یک درخت همیشه سبز استوایی استکه از اثرات مفید آن می توان به عنوان یک ضد قند خون،کاهش چربی خون،محافظ کبد و دارای خواص آنتی اکسیدان است.میخک می تواند بیان آنزیم ها گلوکونئوژنیک کلیوی مثل فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز و گلوکز ۶ فسفاتاز را کنترل کند.

خردل: دانه ها خردل حاوی ترکیبات شیمیایی از جمله کاروتن و ترکیبات فنولی است که با تثبیت انزیم ها گلوکز به سطح طبیعی قند خون کمک میکند.

فلفل سیاه: به پادشاه ادویه ها معروف است و دارای خواص ضد سرطان،ضدمیکروب و ضد التهابی است.پیرین ترکیبات فنلی فعال در فلفل سیاه است که تعیین کننده اثر تنظیمی بر گلوکز خون است.زیرا پیرین به شدت موجب افزایش فراهم زیستی فیتوکمیکال می شود (میرمالک و همکاران ۱۳۹۹).

برگ کاری: به دلیل معطر بودن به ادویه آشپزی معروف است.این منبع غنی از آلکالوئیدها کاربازول فعال بیولوژیکی است و دارای فعالیت ها دارویی مانند آنتی اکسیدان ،ضد التهاب ،محافظ کبد،ضد تومور و کاهش دهنده سطح گلوکز و چربی خون است.برگ ها کاری سرشار از مواد معدنی و عناصر کمیاب هستندکه برای حفظ نورموگلیسمی مهم هستند که این کار با فعال شدن سلول ها بتا لانگرهانس صورت میگیرد که متاسفانه تحقیقات بالینی کمی در این زمینه صورت گرفته است.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

به طور کلی این بررسی نشان میدهد که گیاهان دارویی نقش برجسته در مراقبت از سلامت انسان ها دارندو بدلیل عوارض جانبی کمتر،تداخلات کمتر با داروها،هزینه نسبتا کم می توان در کنار داروها به عنوان یک درمان مناسب برای دیابت به کاربرد.(نیک روش و همکاران)و افزودن چاشنی ها به غذاها به عنوان یک راه خوشمزه و معقول برای حفظ بدن عمل می کند و ادویه ها سرشار از ترکیبات آنتی اکسیدان هستند و تاثیر مثبتی در مدیریت دیابت برعهده دارند.به نظر میرسد اثر ضد دیابتی از طریق تحریک پانکرانس برای ترشح انسولین یا تداخل جذب گلوکز یا عملکرد نگهدارنده انسولین ترکیبات زیست فعال مثل فنول ها هستند و با مطالعات بالینی بیشتر از ادویه جات به عنوان یک جزکاربردی در مدیریت و درمان دیابت نام برد.با توجه به وضعیت تحریم دارو در ایران و افزایش قیمت داروها شیمیایی می توان به راحتی از ظرفیت منابع طبیعی موجود در کشور ایران استفاده کرد و از این منابع برای درمان بیماری دیابت مورد استفاده قرار گرفت.

منابع

آراسته و همکاران.اثرات عصاره هیدرومتانولی زعفران بر روی موش ها دیابت شده.مجله boil سال ۲۰۰۸.پیاپی ۳.صفحات ۱۱۰۲-۱۱۰۸

تولیت مریم و همکاران.تاثیر دارچین در میزان قند خون ناشتا بیماران دیابتی نوع ۲ .همایش ملی گیاهان دارویی .۱۳۸۹.دوره برگزاری ۱

حسن زاده فرزانه و همکاران .بررسی تاثیر دارچین بر هموگلوبین گلیکوزیله بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲.نشریه طب مکمل سال ۱۳۹۱،دوره۲،شماره ۴،صفحات ۲۵-۳۲

حسن زاده مجید. بررسی تاثیر دارچین بر هموگلوبین گلیکوزیله بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲.همایش کنگره بین الملل طب مکمل،سال ۱۳۹۴،دوره ۰ شماره۱

صابری میهن و همکاران.بررسی تاثیر آلوئه را بر ضخامت شبکیه موش صحرایی نر با دیابت .سال ۱۳۹۱،دوره ۱۳،شماره ۴،صفحات ۲۹۶-۳۰۲

میرمالک حوریه السادات .بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره مایی جوشیده و نجوشیده زردچوبه ،فلفل قرمز،فلفل سیاه .نشریه گیاهان دارویی سال ۱۳۹۹،دوره ۱۹،شماره ۷۴،صفحات ۱۴۵-۱۵۴

ماسوری ثریا و همکاران.درمان ها طبیعی برای دیابت .همایش کنگره بین المللی سندروم متابولیک سال ۱۳۸۹ دوره ۰ شماره ۲

محمدی حمزه و همکاران.نشریه مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران.سال ۱۳۹۷ ،دوره ۲۸،شماره ۱۷۰،صفحات ۱۰۶-۹۴

نیک روش محمد رضا و همکاران ،مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند سال ۱۳۸۲،دوره ۱۰ ،شماره ۲،پیاپی ۱۶،صفحات ۵-۹

Ahmad, N.,et.al., 1999. Effect of Momordica charantia (Karolla) extracts on fasting and postprandial serum glucose levels in NIDDM patients. Bangladesh. Med. Res. Counc. Bull. 25, 11-13.

Arasteh, A.,et.al., 2010. Crocus sativus on serum glucose, insulin and cholesterol levels in healthy male rats. J. Med. Plant. Res. 4, 397-402.

Cheng, H.L.,et.al., 2008. A cell-based screening identifies compounds from the stem of Momordica charantia that overcome insulin resistance and activate AMPactivated protein kinase. J. Agric. Food. Chem. 56, 6835-6843.

Chang,et.al., 2013. Herbal therapies for type 2 diabetes mellitus: chemistry, biology, and potential application of selected plants and compounds. Evid. Based. Complement. Alternat. Med. 2013, 378657.

Griffiths, G.,et.al., 2002. Onions-A global benefit to health. Phytother. Res. 16, 603-615.

Li, J.,et.al., 2012a. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic action of cinnamaldehyde in C57BLKS/J db/db mice. J. Tradit. Chin. Med. 32, 446452.

Mohajeri, D. et.al. 2008. Anti-diabetic activity of Crocus sativus L. (Saffron) stigma ethanolic extract in alloxan-induced diabetic rats. Res. J. Biol. Sci. 3, 1102-1108.

Okyar, A., act.al, N., 2001. Effect of Aloe vera leaves on blood glucose level in type I and type II diabetic rat models. Phytother. Res. 15, 157-161.

Pawar, H.,et.al., 2014. Phytochemical evaluation and curcumin content determination of turmeric rhizomes collected from Bhandara District of Maharashtra (India). Med. Chem. 4, 588-591

Rahman, I.U.,et.al., 2011. Bitter melon (Momordica Charantia) reduces serum sialic acid in type 2 diabetics: evidence to delay the process of Atherosclerosis. Chin. Med. 2, 125-129.

Sekiya, K.,et.al., 2004. Enhancement of insulin sensitivity in adipocytes by ginger. Biofactors. 22, 153-156.

Shalaby, M.A., Hamowieh, A.R., 2010. Safety and efficacy of Zingiber officinale roots on fertility of male diabetic rats. Food. Chem. Toxicol. 48, 2920-2924.

Wang, J.G., et.al. 2007. The effect of cinnamon extract on insulin resistance parameters in polycystic ovary syndrome. Fertil Steril, 88(1): 240-243.

Welihinda, J., Arvidson, G., Gylfe, E., Hellman, B., Karlsson, E., 1982. The insulin-releasing activity of the tropical plant Momordica charantia. Acta. Biol. Med. Ger. 41, 1229-1240.

The wonder of nature in the treatment of diabetes

Mobina Akramizadeh*

Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payam Noor University, Isfahan

Abstract

Type 2 diabetes is the most common type of diabetes, the prevalence of which is increasing rapidly, and it can be called a major health problem. In this article, information is obtained from the literature search of databases such as pumbed-Google scholar by searching scientific and generic names. Spices and words such as antidiabetic, hypoglycemic, antidiabetic, type II diabetes were used as key words, some herbs and spices have shown antidiabetic properties, which may be due to the inducing nature of the cells. Pancreas B for the secretion of insulin or bioactive compounds such as flavonoids, alkaloids, anthocyanins that act as insulin-like or insulin-secreting molecules. It can be concluded that herbal medicines are suitable candidates for the treatment of diseases due to their lower and cheaper prices. It is diabetes because chemical drugs also have side effects, and using spices in the diet of diabetic patients, in addition to making the food delicious, helps a lot in the treatment of these patients

Keywords: Antidiabetic, hypoglycemic, antihyperglycemic, type II diabetes, beta cell

* Mobinaakrami.68@gmail.com

کاربرد گیاه درمنه خزری در طب سنتی و مدرن و صنایع آرایشی بهداشتی

سودابه نظرپور، عذرا صبورا*

گروه علوم گیاهی ، دانشکده علوم زیستی، ، دانشگاه الزهرا (س) تهران

چکیده

گیاه درمنه خزری (*Artemisia annua* L.) گیاهی علفی یک‌ساله با ارتفاع ۳۰ تا ۲۰۰ سانتی‌متر، ساقه آن قائم، فاقد کرک، برگ‌های معطر، صاف و دندانه‌دار ، ساقه به رنگ قهوه‌ای یا بنفش مایل به قهوه‌ای جز خانواده Asteracea می‌باشد. این گیاه دارای پراکنش فراوانی در سطح جهان است و در اکثر استان‌ها از جمله تهران، گلستان، کردستان، گیلان و مازندران رویش دارد. گیاه درمنه خزری به‌واسطه داشتن ترکیبات مختلف دارویی مانند سسکوئی‌ترپن‌ها، فلاونوئیدها برای درمان بیماری‌های مختلف مانند مالاریا، سرطان، غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد .گیاه درمنه خزری یکی از گیاهان دارویی مهم است که در طب سنتی، پزشکی، صنعت و تجارت مورد توجه است. در سال‌های اخیر گرایش افراد برای درمان بیماری‌های مختلف از طریق طب سنتی و استفاده از گیاهان دارویی افزایش یافته است، لذا شناخت گیاه دارویی درمنه خزری و ترکیبات آن اهمیت بسیار دارد.

واژگان کلیدی: *Artemisia annua*، گیاه‌شناسی، اهمیت دارویی، طب سنتی

* e-mail: saboora@alzahra.ac.ir

۱. مقدمه

درمنه خزری (*Artemisia annua* L.) به‌عنوان گیاهی شناخته شده است که در پزشکی و داروسازی جایگاه خاص خود را دارد. این گیاه دارای پراکنش وسیعی در جهان بوده و در مناطق مختلف کشور ایران رویش دارد. درمنه خزری به‌واسطه ترکیبات متعددی مانند سسکوئی‌ترپن‌ها و فلاونوئیدها و دیگر ترکیبات دارویی که در بخش‌های مختلف گیاه وجود دارد در درمان بیماری‌های متعدد مانند مالاریا، سرطان و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه یکی از گیاهان دارویی است که دارای اهمیت اقتصادی، تجاری، صنعتی بوده، همچنین گزارش‌هایی موجود است که نشان می‌دهد در طب سنتی و داروسازی از دیرباز استفاده‌های فراوانی داشته است. بیماری مالاریا یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در جهان است و افراد زیادی از این بیماری رنج می‌برند (Ekiert et al., 2021; Soni et al., 2022). امروزه گرایش افراد برای درمان و کنترل این بیماری از طریق روش‌های طب سنتی و استفاده از گیاهان دارویی از جمله مصرف مشتقات شیمیایی خاص یا عصاره گیاه درمنه خزری افزایش یافته است. قیمت بالای سنتز شیمیایی آرتمیزینین، ترکیب اصلی این گیاه، موجب توجه پژوهشگران به استخراج مواد مؤثره گیاه و استفاده از روش‌های مرسوم زیست‌فناوری برای افزایش متابولیت‌های ارزشمند آن شده و لزوم مطالعه خواص مختلف بیوشیمیایی و استفاده از آن را در درمان بیماری‌ها به‌ویژه مالاریا را آشکار می‌کند. برنامه‌ریزی‌های دقیق برای بررسی اثرات زیستی گیاهان دارویی می‌تواند منجر به توسعه اقتصادی، بهداشتی، اشتغال، امنیت غذایی و حفظ ذخیره ژنتیکی در عرصه ملی و جهانی شود.

گیاه‌شناسی

درمنه خزری گیاهی است یک‌ساله که اغلب به ارتفاع بیش از ۲ متر می‌رسد، ساقه آن قائم، فاقد کرک، معمولاً تک ساقه با شاخه‌های متناوب و به رنگ قهوه‌ای یا بنفش مایل به قهوه‌ای، برگ‌های معطر، صاف و دندانه‌دار است. میوه سیپسلا زرد مایل به قهوه‌ای (میوه کوچک، خشک و جداره نازک) به طول ۰/۶ تا ۰/۸ میلی‌متر، دارای سطح براق به شیارهای عمودی و حاوی یک دانه و فاقد پاپوس است. شکل زیر تصویری از گیاه درمنه خزری و بخش‌های مختلف گیاه را نشان می‌دهد (Das et al., 2012; Garcia, 2015).



شکل ۱. نمایی از اندام هوایی و برگ-های گیاه درمنه خزری (Hussain, 2020; Garcia, 2015)

پراکنش

گیاه درمنه خزری به طور طبیعی در جنوب شرقی اروپا و غرب آسیا در منطقه معتدل رویش دارد. در اواخر قرن نوزدهم به اروپای غربی و جنوب اروپا منتقل شد و سپس به روسیه، ایران، افغانستان، پاکستان و چین گسترش یافت. گیاه درمنه بومی مناطق آسیا و کشورهای اروپایی و آمریکای شمالی می‌باشد. برخی از گونه‌های گیاه درمنه در همه یا اکثر استان‌های ایران پراکنده‌اند، اما برخی به مناطق خاصی محدود می‌شوند. گیاه درمنه خزری در ایران در اکثر استان‌ها از جمله تهران، گلستان، کردستان، گیلان و مازندران رویش دارد (Ekiert et al., 2021; Naghavi et al., 2014).

اکولوژی

گیاه درمنه خزری در آب و هوای معتدل رشد نسبتاً چشمگیری دارد و در دامنه تپه‌ها، حاشیه‌های جنگل و زمین‌های بایر رشد می‌کند. در موقعیت‌های باز و آفتابی در خاک‌های لومی حاصلخیز، شنی و خاک‌های آبرفتی که خنثی تا کمی اسیدی و رطوبت‌گیر هستند بهترین عملکرد را دارد. بسته به منطقه آب و هوایی، در ارتفاعات ۵۰ تا ۱۵۰۰ متر بالاتر از سطح دریا رشد می‌کند. تکثیر آن از طریق بذر می‌باشد (Garcia, 2015; Ekiert et al., 2021).

فیتوشیمی درمنه خزری

ترکیبات طبیعی گیاه درمنه به ۸ گروه دسته‌بندی می‌شوند: ۱. مونوترپن‌ها، ۲. سسکوئی‌ترپن‌ها، ۳. دی ترپن‌ها، ۴. استرول‌ها و تری‌ترپن‌ها، ۵. هیدروکربن‌های آلیفاتیک، الکل‌ها، آلدئیدها و اسیدها، ۶. الکل‌های معطر، کتون‌ها و اسیدها، ۷. فنیل‌پروپانوئیدها و ۸. فلاوونوئیدها.

مونوترپن‌ها اجزای اصلی اسانس درمنه را تشکیل می‌دهند و رایحه قوی و معطر را به گیاه می‌دهند. مونوترپن‌های اصلی عبارتند از: کتون درمنه (Artemisia ketone)، کامفور (chomphor)، کامفن (champhene)، بورنئول (borneol)، آلفا-پینن (α -pinene) ، ۱-۸ سینئول (1-8-cineole). مونوترپن‌های جزئی شامل آلفا میرسن (α-myrcene)، آلفا ترپینن (α-terpinene)، کریزانتنون (chrysanthenone)، آلفا کوپن (α-copaene)، Carvone، Limonene، α-terpinene و Myrtenol می‌باشند (Mirbehbahani et al., 2020; Septembre-Malaterre et al., 2020).

بیش از ۳۰ سسکوئی‌ترپن در این گونه از درمنه شناسایی شده است که اغلب در قسمت‌های هوایی قرار دارند. سسکوئی‌ترپن‌ها شامل، velleral، sabinene، cissabinene hydrate و germacrene A هستند. Isofraxidin ترکیب دیگری در گیاه درمنه می‌باشد که یک کومارین با فعالیت ضد التهابی و ضد توموری است. کتون درمنه فعالیت ضد قارچی و وله‌رال دارای فعالیت ضد باکتریایی می‌باشد.

ترکیبات شیمیایی اصلی گیاه درمنه آرتمیزینین، آرتینوئین B و آرتمیزینیک اسید هستند. آرتمیزینین حاوی یک پل پراکسید (C-O-O-C) در فرمول خود (C15H22O15) است. آرتمیزینین دارای خواص ضد لیشمانیا، ضد التهاب، ضد تومور، ضد باکتری، ضد عفونت، ضد انگل، ضد فیبروتیک، ضد قارچ و دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Mirbehbahani et al., 2020). آرتمیزین و مشتقات آن دارای فعالیت ضد مالاریا از نوع مغزی در برابر سویه مقاوم به کلروکین بوده اثرات ضد ویروسی، ضد سرطان و ضد شیستوزومی نیز دارد (Rafiqi et al., 2019). درمنه در چین برای درمان هپاتیت B نیز مؤثر بوده است (Alesaeidi and Miraj, 2016). آرتینوئین B نیز دارای خواص ضد ویروس، ضد تومور، ضد التهاب، لارو کش (larvicidal) می‌باشد. آرتمیزینیک اسید نیز حائز ویژگی تنظیم‌کننده تمایز سلول‌های چربی است (Septembre-Malaterre et al., 2020).

حدود ۴۰ فلاونوئید مختلف در گیاه درمنه خزری وجود دارد، علیرغم وجود فراوانی انواع فلاونوئیدها در گیاه درمنه این ترکیبات دارای پتانسیل درمانی قابل توجه می‌باشند. فلاونوئیدهای گیاه درمنه دارای خواص ضد التهابی قوی، ضد سرطانی قوی و آنتی‌اکسیدانی مؤثری هستند (Ferreira et al., 2010).

طب سنتی و مدرن

گیاه درمنه (*Artemisia anuua*) به مدت ۲ هزار سال به‌عنوان گیاه دارویی مهم شناخته شده است. درمنه در کتاب‌های دارویی باستانی کشورهای مختلف آسیا و اروپا مورد بحث قرار گرفته است و در طب سنتی قدیم و مدرن برای درمان و جلوگیری از تب و لرز استفاده شده است (Rafiqi et al., 2019). استفاده از پودر برگ خشک آن در درمان اسهال گزارش شده است. کل گیاه گلدار به‌عنوان ضد کرم، ضد نفخ، ضد عفونی‌کننده، ضد اسپاسم، تب بر، محرک، مقوی و اشتها آور مورد استفاده قرار می‌گیرد. دم‌کرده چای درمنه در کشورهای آفریقایی برای درمان مالاریا استفاده می‌شود. گزارش شده است که آرتمیزینین برای کشتن سلول‌های سرطان سینه انسان نیز مؤثر است. گزارش‌های اتنوبوتانی در آفریقا نشان داده است که چای درمنه در برابر ویروس HIV هم مؤثر است (Nigam et al., 2019). در چین، از تهیه محلول آبی (دمنوش) گیاه خشک در برابر تب، مالاریا، بیماری‌های پوستی، یرقان و بواسیر استفاده می-

شده است (Das, 2012). از گیاه کامل درمنه در پاکستان برای تب، مالاریا، سرفه، سرماخوردگی، اسهال و برای عطر و در چین برای مالاریا، تب، سوء هاضمه، سل، شست‌وشوی زخم و نیش پشه استفاده می‌شود. از بخش هوایی گیاه در پاکستان برای دیابت، فشار خون، اسهال خونی و سرفه استفاده می‌شود (Hussain, 2020).

ارزش اقتصادی، تجاری، صنعتی

اسانس گیاه درمنه خزری مخلوطی از ترکیبات تجاری مفید مانند آرتمیزینیک الکل، بورنئول و کتون کافور است. به دلیل ارزش اقتصادی بالای آرتمیزینین، اطلاعات تجاری در مورد سایر مولکول‌های زیستی بسیار محدود بوده و از آن‌ها در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی و غذایی نیز استفاده می‌کنند (Soni et al., 2022).

گیاه درمنه خزری نه تنها در صنعت داروسازی بلکه در صنعت آرایشی و بهداشتی نیز استفاده می‌شود. پایگاه داده CosIng اروپا (مواد آرایشی) نشان می‌دهد که گیاه درمنه خزری گونه‌ای مجاز برای استفاده در ۱۲ محصول شیمیایی است از جمله برای محافظت و مراقبت از پوست و مو، مواد ضد باکتری، آنتی‌اکسیدان‌ها، پوشش‌دهنده‌ها، معطر کننده‌ها، ضد شوره‌ها، مرطوب‌کننده‌ها و نرم‌کننده‌ها. برای تولید این محصولات اغلب از عصاره یا اسانس گیاه استفاده می‌شود. گیاه درمنه خزری به عنوان یک ماده در لوازم آرایشی مراقبت از پوست مانند شامپوها، اسانس‌ها، سرم‌ها، کرم‌های دست و دور چشم، ماسک‌ها، لوسیون‌ها و تونیک‌ها استفاده می‌شود. این محصولات در مرطوب کردن پوست دست، سر، صورت و کل بدن مؤثر هستند. آن‌ها همچنین دارای اثر محافظتی و پاک‌کنندگی هستند. لوازم آرایشی که دارای عصاره گیاه درمنه خزری در ترکیب خود هستند را می‌توان در پیشنهادات بسیاری از شرکت‌های خارجی فعال در اروپا، آسیا و آمریکای شمالی یافت.

قسمت‌های سبز گیاه درمنه خزری به عنوان سبزی مصرف می‌شود. این گونه همچنین به عنوان منبع رنگ سبز و به عنوان یک ماده در ورموت (شراب شیرین افسنطین) استفاده می‌شود (Ekiert et al., 2021).

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه گیاه درمنه خزری یکی از گیاهان دارویی مهم و معطر بوده و دارای ارزش‌های پزشکی، اقتصادی، تجاری و صنعتی است و به ویژه در سال‌های اخیر با شیوع پاندمی کرونا اثرات درمانی آن آشکار شده است، همچنین دارای ترکیب دارویی مهم و ارزشمند و گران‌قیمتی بنام آرتمیزینین است که به‌واسطه این ترکیب در درمان بیماری‌های مختلف از جمله مالاریا دارای استفاده‌های فراوان می‌باشد، شناسایی مسیر تولید آرتمیزینین در این گیاه اهمیت فراوانی دارد. با توجه به اینکه تولید مواد دارویی از عصاره طبیعی از طریق روش‌های زیست فناوری و با استفاده از گیاه رویش‌یافته در طبیعت بیشتر مقرون به صرفه است. از این‌رو باید سعی شود ضمن کشت و تکثیر گیاه درمنه خزری در مناطق قابل کشت ایران و بهینه‌سازی روش‌های تولید و استخراج ترکیب دارویی از گیاه، منبع درآمدی مناسبی برای روستائیان فراهم ساخت. روش‌های مختلف و مؤثر از جمله دستکاری‌های ژنتیکی، نانوتکنولوژی و غیره می‌تواند در تولید وسیع و کم‌هزینه آرتمیزینین استفاده شود.

منابع

Alesaeidi, S., Miraj, S. 2016. A systematic review of anti-malarial properties, immunosuppressive properties, anti-inflammatory properties, and anti-cancer properties of *Artemisia annua*. Electronic Physician. 8(10): 3150.

Das, S. 2012. *Artemisia annua* (Qinghao): a pharmacological review. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 3(12): 4573-4577.

Ekiert, H., Swiatkowska, J., Klin, P., Rzepiela, A., Szopa, A. 2021. *Artemisia annua*–Importance in Traditional Medicine and Current State of Knowledge on the Chemistry, Biological Activity and Possible Applications. Planta Medica. 87(08): 584-599.

Ferreira, J.F., Luthria, D.L., Sasaki, T., Heyerick, A. 2010. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. Molecules. 15(5): 3135-3170.

Garcia, L.C. 2015. A Review of *Artemisia annua* L.: Its genetics, biochemical characteristics, and anti-malarial efficacy. International Journal of Science and Technology. 5(2): 38-46.

Hussain, A. 2020. The genus Artemisia (Asteraceae): A review on its ethnomedicinal prominence and taxonomy with emphasis on foliar anatomy, morphology, and molecular phylogeny. Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences: B. Life and Environmental Sciences. 57(1): 1-28.

Mirbehbahani, F.S., Hejazi, F., Najmoddin, N., Asefnejad, A. 2020. *Artemisia annua* L. as a promising medicinal plant for powerful wound healing applications. Progress in Biomaterials. 9(3): 139-151.

Naghavi, M.R., Alaeimoghadam, F., Ghafoori, H. 2014. Artemisia species from Iran as valuable resources for medicinal uses. World Academy of Science, Engineering and Technology. International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering. 11: 1058-1064.

Nigam, M., Atanassova, M., Mishra, A.P., Pezzani, R., Devkota, H.P., Plygun, S., Salehi, B., Setzer, W.N., Sharifi-Rad, J. 2019. Bioactive compounds and health benefits of Artemisia species. Natural Product Communications. 14(7): 1-17.

Rafiqi, U.N., Gul, I., Saifi, M., Nasrullah, N., Ahmad, J., Dash, P., Abdin, M.Z. 2019. Cloning, identification, and in silico analysis of terpene synthases involved in the competing pathways of artemisinin biosynthesis pathway in *Artemisia annua* L. Pharmacognosy Magazine. 15(62): 38-46.

Soni, R., Shankar, G., Mukhopadhyay, P., Gupta, V. 2022. A concise review on *Artemisia annua* L.: A major source of diverse medicinal compounds. Industrial Crops and Products. 184: 1-9.

The application of *Artemisia annua* in traditional and modern medicine and cosmetic industries

Sodabeh Nazarpoor, Azra Saboora*

Department of Plant Sciences,Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran

Abstract

Artemisia annua L. is an annual herbaceous plant with a height of 30 to 200 cm, its stem is straight, hairless, fragrant, smooth and serrated leaves, the stem is brown or purple-brown in color. It is a member of the Asteracea family. This plant has a wide distribution in the world and grows in most provinces including Tehran, Golestan, Kurdistan, Gilan and Mazandaran. *Artemisia annua* due to having various medicinal compounds such as sesquiterpenes, flavonoids is used to treatment various diseases such as malaria, cancer, etc. It is one of the important medicinal plants that is of interest in traditional medicine, medicine, industry and trade. In recent years, the tendency of people to treat this disease to traditional medicine and the use of medicinal plants has increased, so it is important to know about *Artemisia annua* and its compounds.

Keywords: *Artemisia annua*, Botanical, Medicinal importance, Traditional medicine

* e-mail: saboora@alzahra.ac.ir

کلروژنیک اسید در گیاه قهوه: استخراج، اندازه گیری، خواص

سیده فاطمه صادقی* ، ابراهیم هنرمند

[1] گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم

چکیده

تحقیق حاضر به منظور آشنایی با قهوه و ترکیبات موجود در آن می‌باشد. در این تحقیق، شکل و لایه های درونی میوه و دانه قهوه و اثرات متابولیک و فیزیولوژیکی قهوه بر سلامت انسان ها مورد بررسی قرار گرفته است. لازم به ذکر است مصرف قهوه می تواند درکنترل یا پیشگیری از بیماری های مختلف مانند سکته، بیماری های قلبی و عروقی، آلزایمر، دیابت، پوکی استخوان، سرطان، آسیب های کبدی، افسردگی و اختلالات عصبی و رفتار خودکشی بسیار موثر باشد. مصرف قهوه همچنین به دستگاه گوارش و میکروبیوت های روده برای یک هضم بهترکمک می کند. در این مقاله، اصلی ترین اجزای زیست فعال قهوه از جمله ترکیبات فنلی، الکانوئید ها ودیترپن ها مورد بررسی قرار گرفته است. یکی ازمهم ترین ترکیبات فنلی که در قهوه دارای بالاترین غلظت می‌باشد، کلروژنیک اسید (CGA) نام دارد. دراین تحقیق، به ویژگی های CGA و ساختار مولکولی آن اشاره شده است. همچنین تاثیرات مصرف CGA بر بدن انسان و نیز روش های استخراج و اندازه گیری آن در قهوه مورد بررسی قرار گرفته است. در نتیجه مطالعات صورت گرفته در سال های اخیر مفهوم جدیدی از قهوه ایجاد شده است، مفهومی که با باور رایجی که قهوه بیشتر مضر است، مطابقت ندارد. این دیدگاه با کشف یک سری از اجزای گیاهی با مشخصات مفید پشتیبانی می شود.

واژگان کلیدی: کلروژنیک اسید، ترکیبات قهوه، متابولیت های قهوه، استخراج، اندازه گیری

* E-mail: fatemesadatsadeghi1378@gmail.com

۱.مقدمه

قهوه شامل مخلوط پیچیده ای از ترکیبات است که بین آن ها،کافئین به طورگسترده ای شناخته شده است. قهوه همچنین غنی از بسیاری مواد فعال زیستی با طیف وسیعی از اثرات فیزیولوژیکی می‌باشد. این فهرست شامل ۱۰۰۰ ماده گیاهی است. از جمله این مواد می توان به فنل ها (شامل کلروژنیک اسید وکافئیک اسید)، لاکتون ها، دیترپن ها(کافستول و کاهوئول)، نیاسین و پیش ساز ویتامین B_3 تریگونلین اشاره کرد. علاوه بر این، قهوه سرشار ازویتامین B_3 ،منیزیم و پتاسیم است(Spiller 2019; Gómez-Ruiz, Leake, and Ames 2007). فرآوری استخراج قهوه شامل عملیات سریالی متفاوتی از جمله برداشت، شستشو، خشک کردن و خمیرسازی است تا دانه های قهوه مطابق با استانداردهای صنعتی و تجاری به دست آید.(Rezende, Rosado, and Gomes 2007)

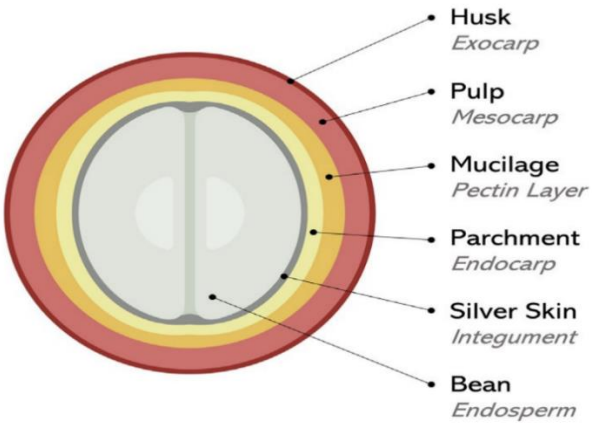
ساختار اصلی میوه قهوه درشکل (۱) نشان داده شده است. میوه بالغ درخت قهوه دارای پوسته یا اگزوکارپ است. لایه زیرین آن، مزوکارپ یک پالپ گوشتی است که به راحتی قابل جدا شدن است و عمدتاًاز کربوهیدرات هایی مانند گلوکز، فروکتوز و پکتین تشکیل شده است. لایه پکتین که به عنوان موسیلاژ نیز شناخته می شود حاوی پروتئین، چربی، مواد معدنی لیپیدی، تانن ها، پلی فنول ها و کافئین است. (Janissen and Huynh 2018; Murthy and Naidu 2012) اندوکارپ یا پوست یک لایه پلی ساکارید است؛ یک کاغذ نازک مایل به زردکه به راحتی خرد می شود و از لیگنوسلولز ساخته شده است. لایه‌ای که دانه قهوه را احاطه کرده است، پوست نقره ای نیز نامیده می‌شود و از پلی ساکاریدهایی مانند سلولز و همی سلولزها و همچنین مونوساکاریدها، پروتئین ها و پلی فنل ها تشکیل شده است. دانه قهوه دو نیمکره از دانه های بیضوی می‌باشدکه حاوی آندوسپرم و جنین است.(da Silva et al. 2012; Janissen and Huynh 2018)

اجزای زیست فعال قهوه شامل ترکیبات فنلی (اسیدکلروژنیک، کافستول وکاهوئول)،آلکالوئیدها(کافئین و تریگونلین)، دیترپن ها (کافستول و کاهوئول) و سایر متابولیت های ثانویه است.(de Melo Pereira et al. 2020) در بین تمام ترکیبات گیاهی، قهوه دارای بالاترین غلظت از اسیدهای کلروژنیک می‌باشد. (Ma et al. 2016) CGA یک ترکیب فنلی طبیعی با ساختارمولکولی نشان داده شده در شکل (۲) است که یک استر از کافئیک اسید وکوینیک اسید می‌باشد.کلروژنیک اسید به گروه بزرگی از ترکیبات پلی فنلی طبیعی تعلق دارند و از نظر شیمیایی خانواده ای از استرهای مختلف (تک، دی، سه و استرهای مخلوط) است. (Tomac and Šeruga 2016; Ma et al. 2016)

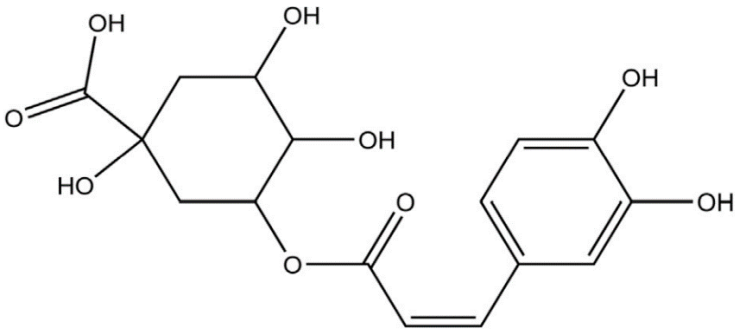
روش های متعددی برای اندازه گیری و تعیین غلظت کلروژنیک اسید و ایزومرهای آن در دانه های قهوه وجود دارد. متداول ترین روش های مورد استفاده شامل؛ طیف سنجی مادون قرمز، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (Ayelign and Sabally 2013)، الکتروفورز مویرگی (Hurtado-Fernández et al. 2010) واسپکتروسکپی UV-ViS می‌باشد(Abebe 200). اگرچه ثابت شد که این روش ها برای تعیین کمیت CGA و محصولات مشتق شده از آن کارآمد هستند اما تعدادی از کمبودهای آن ها شناسایی شدند که عمدتاً زمان بر، پر زحمت و نیازمند ابزارهای گران قیمت هستند. (Munteanu and Apetrei 2021) درسال

های اخیر روش های الکتروشیمیایی برای تعیین ترکیبات فنلی در مقیاس وسیعی توسعه یافته است که دارای یک سری مزایا از جمله سادگی، حساسیت بالا، پاسخ سریع و کاهش هزینه است(Apetrei and Apetrei 2019). روش های الکتروشیمیایی مختلفی از جمله ولتامتری چرخه ای، ولتامتری موج مربعی و ولتامتری پالس تفاضلی وجود دارد که با الکترود های کار مختلفی می توان میزان کلروژنیک اسید را در نمونه قهوه مورد نظر، اندازه گیری کرد.(Tomac and Šeruga 2016)

هدف این مقاله، جمع آوری مطالعات انجام شده روی قهوه و آشنایی با ترکیبات آن از جمله کلروژنیک اسید و خواص و روش های اندازه گیری آن و همچنین تاثیرات مصرف قهوه بر سلامتی وکنترل بیماری ها می‌باشد.



شکل۱ میوه و ساختار آن



شکل۲ ساختار مولکولی کلروژنیک اسید

۲.مواد و روش ها

۱.۲.پایگاه های مورد مطالعه

برای جمع آوری اطلاعات، در پایگاه های داده اطلاعاتی مختلفی از جمله" PubMet " و " ScienceDirect "جستجو برای مقالات مروری و پژوهشی و نیزکتب منتشر شده از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۲۲ صورت گرفته است. در این جستجو و جمع آوری مقالات، محدودیتی در نام نویسنده و عنواین دیگر اعمال نشده است. برای اطمینان از جمع آوری همه مقالات مرتبط، از موتور جستوی Google Scholar نیز استفاده شده است.

۲.۲.روش مطالعه

برای این جستجو از کلمات کلیدی " قهوه"، " بیماری"، " کلروژنیک اسید" و" ترکیبات قهوه" استفاده شده است. حدود ۳۰۰ مقاله مرتبط با این کلمات کلیدی بدست آمد که با مطالعه و بررسی چیکده این مقالات، ۵۰ مقاله مرتبط با موضوع مدنظر بدست آمد. هنگامی که بیش از یک مقاله با نتیجه گیری و نکات مشابه باهم بدست آمده بود، جدیدترین مورد منتشر شده اولویت داشت. با مطالعه کامل متن این مقالات و استفاده ازمطالب و نکات مهم آن ها، مقاله مروری مفیدی در مورد قهوه و ساختار مولکولی و نیز ترکیبات موثره آن، از جمله کلروژنیک اسید و نحوه استخراج و اندازه گیری آن بدست آمد.

۳.نتایج

۱.۳. استخراج کلروژنیک اسید از قهوه

استخراج اولین گام در جداسازی ترکیبات فنلی از بقایای کشت و صنعت و مواد گیاهی می‌باشد. تکنیک های مختلفی برای بازیابی ترکیبات فنولی(کلروژنیک اسید) از منابع طبیعی استفاده شده است؛ مانند استخراج جامد-مایع با حلال های آلی، استخراج به کمک اولتراسوند، استخراج به کمک مایکروویو، استخراج سیالات فوق بحرانی و فرآیندهای فشار بالا . (Cortazar et al. 2005; Markom et al. 2007; Martins et al. 2010)

۱.۱.۳ تکنیک استخراج جامد-مایع

استخراج جامد-مایع با استفاده از متانول به عنوان حلال آلی، یک روش کارآمد برای استخراج ترکیبات فنلی از تفاله قهوه مصرف شده بود. استخراج ترکیبات فنلی تحت تأثیر غلظت متانول، نسبت حلال به جامد و زمان استخراج می‌باشد.(Pinelo et al. 2007) نتایج حاصل از ارزیابی اثر متغیرهای فرآیند (غلظت متانول، زمان و نسبت حلال به جامد) بر استخراج ترکیبات فنلی در جدول(۱) مشاهده می شود.(Mussatto et al. 2011) برای انجام واکنش، حلال استخراج

وتفاله قهوه مصرف شده(SCG)در فلاسک های ارلن ریخته شد و درب آن به درستی پوشیده شد. در مدت زمان مورد نظر در یک حمام آب با هم زدن مغناطیسی در دمای مشخص نگهداری شدند. سپس محتوی کل هر فلاسک سانتریفیوژ شده و مایع رویی(عصاره SCG) از طریق فیلترهای میکرومتری فیلتر شد و تا زمان آنالیز در دمای محیط و در تاریکی نگهداری شدند(Mussatto et al. 2011). محتوای کل ترکیبات فنلی در عصاره SCG با استفاده از معرف-Ciocalteu Folinبر اساس روش رنگ سنجی توصیف شده توسط Singleton و Rossi تعیین شد.(Singleton and Rossi 1965)

جدول ۱.نتایج حاصل از ارزیابی اثر متغیرهای فرآیند (غلظت متانول، زمان و نسبت حلال به جامد) بر استخراج ترکیبات فنلی

سنجش	غلظت متانول (درصد)	زمان (دقیقه)	نسبت حلال/جامد (mg/L)	فنل کل (mg GAE/ g SCG)
۱	۶۰	۳۰	۱۰	۸/۱
۲	۶۰	۹۰	۱۰	۱۰/۷
۳	۶۰	۳۰	۳۰	۹/۷
۴	۱۰۰	۳۰	۱۰	۲/۹
۵	۱۰۰	۹۰	۱۰	۲/۶
۶	۱۰۰	۳۰	۳۰	۳/۲

۲.۳. اندازه گیری کلروژنیک اسید

۱.۲.۳. تعیین غلظت CGA به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا(HPLC)

یکی از مهم‌ترین و پرکاربرد ترین روش های غیر الکتروشیمی، برای جداسازی و تعیین غلظت ترکیبات موجود در یک نمونه، روش HPLC می باشد. برای انجام این روش پس از آماده سازی نمونه و استخراج CGA از دانه قهوه، چند میکرولیتر از نمونه فیلتر شده و مقداری آب دیونیوزه، در فلاسک های حجمی تمیز با حجم مشخص پیپت می شود. شرایط HPLC برای این روش به این شرح می باشد: ستون فاز معکوس باشد، آشکارساز آرایه فوتودیود تنظیم شده در طول موج مشخص، فشار و سرعت جریان تنظیم شده، فاز متحرک نیز شامل آب، اسید استیک، متانول و حجم نمونه مورد نیاز نیز چند میکرولیتر می باشد. با استفاده از کروماتوگرام های حاصل از انجام HPLC و بدست آوردن نقاط پیک آن، منحنی کالیبراسیون مناطق اوج در مقابل غلظت استانداردها رسم می شود و سطح CGA نمونه های مختلف با استفاده از معادله رگرسیون بهترین خط عبوری محاسبه خواهد شد.(Ayelign and Sabally 2013)

۲.۲.۳. تعیین غلظت CGA به روش الکتروشیمیایی

یکی از بهترین، سریع ترین، حساس ترین وقابل اعتماد ترین روش های اندازه‌گیری CGA در گیاه قهوه استفاده از روش های الکتروشیمیایی می باشد. ولتامتری یکی از روش های الکتروشیمی می‌باشدکه برای اجرای آن به سه الکترود کار، کمکی و رفرنس نیاز داریم. مهم ترین الکترود، الکترودکار است که در مقاله "رفتارالکتروشیمیایی و تعیین اسید کلروژنیک بر اساس نانولوله های کربنی چند جداره اصلاح شده با الکترود صفحه نمایش چاپ شده" الکترود کار مورد استفاده برای تعیین اسید های کلروژنیک، الکترود چاپ روی صفحه اصلاح شده با نانولوله های کربنی چند جداره (MWCNTs/SPE) می‌باشد. این الکترود خواص انتقال الکترون را بهبود می‌بخشد و منجر به حساسیت بالا، حد تشخیص پایین و کاهش پتانسیل می‌شود. در این مقاله، پس از انجام روش الکتروشیمی ولتامتری با تکنیک DPV، یک جفت پیک ردوکس از CGA در MWCNTs/SPE در بافر اسید استیک-استات سدیم و PH مشخص، مشاهده شد. در شرایط بهینه روش پیشنهادی، محدوده خطی از ۰.۱۷ تا ۱۵۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر را نشان داد حد تشخیص CGA می تواند به ۰.۱۲ میکروگرم در میلی لیتر برسد.(Ma et al. 2016)

۳.۳. بررسی اثرات متابولیک و فیزیولوژیکی قهوه بر سلامت انسان

۱.۳.۳ پیشگیری از بیماری های عصبی (پارکینسون، آلزایمر، اختلالات شناختی و زوال عقل)

پارکینسون دومین اختلال شایع عصبی در جوامع سالخورده است. مطالعات اخیر ارتباط معکوس قابل توجهی را بین مصرف کافئین قهوه و خطر ابتلا به بیماری پارکینسون نشان می دهد.(Cho et al. 2018) اثر قهوه در برابر ایجاد بیماری پارکینسون ممکن است با تنظیم انتقال عصبی تحریکی در مغز و کنترل حرکت و رفتار مرتبط باشد. (Simon et al. 2017) یکی دیگر از اختلالات عصبی مزمن با شیوع بالا، بیماری آلزایمر است. شواهد اپیدمیولوژیک نشان می دهد که کافئین قهوه از اختلال حافظه محافظت می کند و خطر ابتلا به بیماری آلزایمر را کاهش می دهد. (Acquas, Tanda, and Di Chiara 2002)

۲.۳.۳ فعالیت ضد سرطانی

فعالیت آنتی اکسیدانی قهوه عمدتاً به ترکیبات فنلی نسبت داده می‌شود. از مهم ترین ترکیبات فنلی موجود در قهوه می توان به کلروژنیک اسید اشاره کرد. سرطان در نتیجه آسیب DNA ناشی از پروکارسینوژن ها یا گونه های فعال اکسیژن ایجاد می‌شود که شامل چندین مرحله از جمله جهش های اضافی در DNA، فعال سازی پروتونکوژن و غیرفعال سازی ژن سرکوب گر تومور می شود. ژن های پایداری ژنومی، محافظت از سلول ها در برابر آسیب های ناشی از ROS خود را به

عنوان مکانیزمی در برابر القای سرطان نشان می دهد.کلروژنیک اسید موجود در قهوه، به عنوان یک ضد سرطان بالقوه عمل می کند و ممکن است با یک اثر آنتی اکسیدانی مستقیم برکاهش ROS تأثیر بگذارد. (Boettler et al 2011)

۳.۳.۳ کاهش خطر ابتلا به بیماری های قلبی و عروقی

درمیان اجزای قهوه، اسید کلروژنیک برای ارائه خواص درمانی که سلامت قلب و عروق را ارتقا می دهد، شناخته شده است. حدود یک سوم کلروژنیک اسید موجود در قهوه در روده کوچک جذب می شود، در حالی که باقیمانده توسط میکروبیوتای روده در روده بزرگ متابولیزه می‌شود.(Bhandarkar, Brown, and Panchal 2019) اثرات مفید اسید کلروژنیک شامل تعدیل متابولیسم گلوکز و لیپید،کاهش انتشار گلوکز درکبد و در نهایت کاهش جذب گلوکز می باشد. چنین اثرات درمانی منجر به بسیاری از مزایای سلامت قلب و عروق می شود که شامل کاهش غلظت تری گلیسیرید و افزایش غلظت کلسترول لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL)، افزایش اکسیداسیون چربی وکاهش خطر ابتلا دیابت نوع ۲ می‌شود (Bhandarkar, Brown, and Panchal 2019).

٤.بحث و نتیجه گیری

قهوه یک نوشیدنی است که در سراسر جهان مصرف می شود و بعلت پیامدهای آن برای سلامتی، بیشترین طرفدار را دارد. دیدگاه جهانی در مورد تأثیر قهوه بر سلامتی از تعادلی که عمدتاً مضر است به سمت یک نمایه سودمند جا به جا شده است. داده ها به نفع این دیدگاه خوش بینانه از مزایای نسبتاً واضح ناشی از محافظت از کبد، دیابت و کاهش خطر پارکینسون یا مشاهدات اخیر در مورد مرگ و میر جهانی ناشی می شوند. علاوه بر این، به نظر می رسد توصیف سنتی قهوه به عنوان یک عامل خطربرای فشار خون بالا، پوکی استخوان یا بیماری های قلبی عروقی از بین رفته است. از آنجایی که قهوه منبعی غنی از اسیدهای کلروژنیک است، در مطالعات بررسی شده روش های مختلف استخراج و اندازه‌گیری غلظت CGA را بررسی کردیم زیرا میزان این ماده در قهوه بر میزان اثر بخشی آن موثر است. در نتیجه مطالعه برای تاثیر مصرف قهوه بر اندام های هدف در می‌یابیم، رابطه مستقیمی در روند افزایش سطح متابولیت های پلاسما خون با افزایش مصرف اسیدهای کلروژنیک وجود دارد.

تشکر و قدردانی

از حمایت های دانشگاه قم و راهنمایی ها و نظرات ارزشمند جناب دکتر رضا شیخ اکبری در تدوین و نگارش این مقاله تشکر و قدرانی می کنم.

منابع

Abebe, Belay. 2009. 'Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy', *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 3: 34-240.

Acquas, Elio, Gianluigi Tanda, and Gaetano Di Chiara. 2002. 'Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naive and caffeine-pretreated rats', *Neuropsychopharmacology*, 27: 182-93.

Apetrei, Irina Mirela, and Constantin Apetrei. 2019. 'Development of a novel biosensor based on tyrosinase/platinum nanoparticles/chitosan/graphene nanostructured layer with applicability in bioanalysis', *Materials*, 12: 1009.

Ayelign, Abebe, and Kebba Sabally. 2013. 'Determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans using HPLC', *American Journal of Research Communication*, 1: 78-91.

Bhandarkar, Nikhil S, Lindsay Brown, and Sunil K Panchal. 2019. 'Chlorogenic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet–induced cardiovascular, liver, and metabolic changes in rats', *Nutrition research*, 62: 78-88.

Boettler, Ute, Katharina Sommerfeld, Nadine Volz, Gudrun Pahlke, Nicole Teller, Veronika Somoza, Roman Lang, Thomas Hofmann, and Doris Marko. 2011. 'Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression', *The Journal of nutritional biochemistry*, 22: 426-40.

Cho, Bang-Hoon, Seong-Min Choi, Joon-Tae Kim, and Byeong C Kim. 2018. 'Association of coffee consumption and non-motor symptoms in drug-naïve, early-stage Parkinson's disease', *Parkinsonism & Related Disorders*, 50: 42-47.

Cortazar, E, L Bartolomé, A Delgado, N Etxebarria, LA Fernández, A Usobiaga, and O Zuloaga. 2005. 'Optimisation of microwave-assisted extraction for the determination of nonylphenols and phthalate esters in sediment samples and comparison with pressurised solvent extraction', *Analytica Chimica Acta*, 534: 247-54.

da Silva, Marliane CS, Juliana Naozuka, José Maria R da Luz, Laélia S de Assunção, Pedro V Oliveira, Maria CD Vanetti, Denise MS Bazzolli, and Maria CM Kasuya. 2012. 'Enrichment of Pleurotus ostreatus mushrooms with selenium in coffee husks', *Food chemistry*, 131: 558-63.

de Melo Pereira, Gilberto V, Dão Pedro de Carvalho Neto, Antonio I Magalhães Júnior, Fernanda Guilherme do Prado, Maria Giovana B Pagnoncelli, Susan Grace Karp, and Carlos Ricardo Soccol. 2020. 'Chemical composition and health properties of coffee and coffee by-products', *Advances in food and nutrition research*, 91: 65-96.

Gómez-Ruiz, José Ángel, David S Leake, and Jennifer M Ames. 2007. 'In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites', *Journal of agricultural and food chemistry*, 55: 6962-69.

Hurtado-Fernández, Elena, María Gómez-Romero, Alegría Carrasco-Pancorbo, and Alberto Fernández-Gutiérrez. 2010. 'Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant

phenolic compounds from plant food material', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53: 1130-60.

Janissen, Brendan, and Tien Huynh. 2018. 'Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review', *Resources, Conservation and recycling*, 128: 110-17.

Ma, Xiao-Yan, Hong-Qiao Yang, Hua-Bing Xiong, Xiao-Fen Li, Jing-Ting Gao, and Yun-Tao Gao. 2016. 'Electrochemical Behavior and Determination of Chlorogenic Acid Based on Carbon Nanotubes Modified Screen-Printed Electrode'.

Markom, Masturah, Masitah Hasan, Wan Ramli Wan Daud, Harcharan Singh, and Jamaliah Md Jahim. 2007. 'Extraction of hydrolysable tannins from Phyllanthus niruri Linn.: Effects of solvents and extraction methods', *Separation and purification technology*, 52: 487-96.

Martins, Silvia, Cristóbal N Aguilar, Iliana de la Garza-Rodriguez, Solange I Mussatto, and José A Teixeira. 2010. 'Kinetic study of nordihydroguaiaretic acid recovery from Larrea tridentata by microwave-assisted extraction', *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85: 1142-47.

Munteanu, Irina-Georgiana, and Constantin Apetrei. 2021. 'Electrochemical determination of chlorogenic acid in nutraceuticals using voltammetric sensors based on screen-printed carbon electrode modified with graphene and gold nanoparticles', *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 8897.

Murthy, Pushpa S, and M Madhava Naidu. 2012. 'Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review', *Resources, Conservation and recycling*, 66: 45-58.

Mussatto, Solange I, Lina F Ballesteros, Silvia Martins, and José A Teixeira. 2011. 'Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds', *Separation and purification technology*, 83: 173-79.

Pinelo, Manuel, Abigaille G Tress, Mads Pedersen, Anis Arnous, and Anne S Meyer. 2007. 'Effect of cellulases, solvent type and particle size distribution on the extraction of chlorogenic acid and other phenols from spent coffee grounds', *Am. J. Food Technol*, 2: 641-51.

Rezende, Alberto Martins, Patrícia Lopes Rosado, and Marília Fernandes Maciel Gomes. 2007. *Café para todos: a informação na construção de um comércio de café mais justo* (SEGRAC).

Simon, David K, Cai Wu, Barbara C Tilley, Katja Lohmann, Christine Klein, Haydeh Payami, Anne-Marie Wills, Michael J Aminoff, Jacquelyn Bainbridge, and Richard Dewey. 2017. 'Caffeine, creatine, GRIN2A and Parkinson's disease progression', *Journal of the neurological sciences*, 375: 355-59.

Singleton, Vernon L, and Joseph A Rossi. 1965. 'Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents', *American journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-58.

Spiller, Monica Alton. 2019. 'The chemical components of coffee', *Caffeine*: 97-161.

Tomac, Ivana, and Marijan Šeruga. 2016. 'Electrochemical properties of chlorogenic acids and determination of their content in coffee using differential pulse voltammetry', *Int. J. Electrochem. Sci*, 11: 2854.

Chlorogenic acid in coffee plant: extraction, measurement, properties

Sayede Fatemeh Sadeghi[1]*, Ebrahim Honarmand[1]

[1] Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, University of Qom, Qom

Abstract

The purpose of this research is to get familiar with coffee and its compounds. In this research, the shape and inner layers of coffee fruit and coffee beans and the metabolic and physiological effects of coffee on human health have been investigated. It should be noted that coffee consumption can be very effective in controlling or preventing various diseases such as stroke, cardiovascular diseases, Alzheimer's, diabetes, osteoporosis, cancer, liver damage, depression and nervous disorders and suicidal behavior. Coffee consumption also helps the digestive system and intestinal microbiota for a better digestion. In this article, the main bioactive components of coffee, including phenolic compounds, alkanoids and diterpenes, have been investigated. One of the most important phenolic compounds that has the highest concentration in coffee is called chlorogenic acid (CGA). In this research, the characteristics of CGA and its molecular structure are mentioned. Also, the effects of CGA consumption on the human body and its extraction and measurement methods in coffee have been investigated. As a result of studies conducted in recent years, a new concept of coffee has been created, a concept that does not correspond to the common belief that coffee is more harmful. This view is supported by the discovery of a series of plant components with beneficial properties.

Keywords: Chlorogenic acid, coffee compounds, coffee metabolites, extraction, measurement

E-mail: fatemesadatsadeghi1378@gmail.com

کیتوزان برای تقویت ترکیبات فنولی و تیمول گیاهچه‌های زنیان رشدیافته تحت تنش خشکی در کشت درون شیشه

رویا رضوی زاده[1*]، زهرا مسیبی[1]، فاطمه ادب آوازه[1،2]

[1] گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
[2] گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

چکیده

امروزه تولید انبوه متابولیت‌های ثانویه از جمله فلاونوئیدها، ترپن‌ها و آلکالوئیدها در گونه‌های دارویی با ارزش، کمیاب و یا در معرض انقراض از طریق کشت بافت گیاهی مورد توجه زیادی قرار گرفته است. در این پژوهش، اثر کیتوزان بر افزایش متابولیت-های ثانویه و مواد مؤثره اصلی گیاه زنیان تحت تنش خشکی در شرایط کشت درون شیشه مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، بذرهای زنیان در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف کیتوزان (۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) و مانیتول (۰ و ۳ درصد) کشت شدند. چهار هفته پس از تیماردهی، نتایج نشان داد که اعمال تنش خشکی و کیتوزان به‌تنهایی باعث افزایش معنی‌دار محتوای فنول و آنتوسیانین شد. در برهمکنش بین خشکی و کیتوزان نیز مشخص گردید که کیتوزان در شرایط تنش خشکی اثر معنی‌داری بر تجمع ترکیبات فنولی نداشته و میزان آنتوسیانین را نیز کاهش داده است. همچنین نتایج نشان داد اعمال کیتوزان به‌تنهایی و یا در ترکیب با مانیتول باعث افزایش قابل‌توجهی در میزان تیمول و پاراسیمن و کاهش گاماترپینن در گیاهچه‌های زنیان شد. بر اساس نتایج حاصل، به نظر می‌رسد که کیتوزان و مانیتول در غلظت‌های بهینه می‌توانند محرک‌های ارزشمندی برای سنتز و بهبود متابولیت‌های ثانویه‌ی در شرایط آزمایشگاهی باشند.

واژگان کلیدی: ترکیبات فنولی، تنش خشکی، تیمول، زینان، کیتوزان

* e-mail: razavi.roya@pnu.ac.ir

۱. مقدمه

امروزه با توجه به تنوع زیستی گونه‌های گیاهی، هزینه نسبتاً کمتر استفاده از داروهای گیاهی به‌جای داروهای مصنوعی فرآوری شده و همچنین عوارض جانبی بسیاری از داروهای مصنوعی، گیاهان دارویی با خواص آنتی‌اکسیدانی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. به‌خوبی مشخص شده است که فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به متابولیت‌های ثانویه، به‌ویژه به غلظت اجزای فنولی بستگی دارد (Amorati and Valgimigli, 2018). لذا، شناسایی و بهبود محصولات دارویی طبیعی که بینش جدیدی در مورد توسعه داروهای زیستی ارائه می‌دهد با تکنیک‌های مرسوم و مدرن باید در اولویت برنامه‌های کشاورزی قرار گیرد.

زنیان (*Carum copticum* L.) از جمله گیاهان دارویی متعلق به تیره چتریان است که به دلیل خواص دارویی متعددی از جمله ضدنفخ، ضدباکتری، ضدقارچ، ضدالتهاب و مسکن، بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد (Cimanga et al., 2002). اسانس زنیان حاوی ترکیبات دارویی از جمله تیمول، کارواکرول، پاراسیمن، گاماتریپین، آلفا و بتاپینن با اثرات فارماکولوژیکی می‌باشد که باعث شده است تقاضا برای استفاده از آن در بین دانشمندان و داروسازان افزایش یابد. از آنجایی‌که استفاده از منابع گیاهی تنها منبع به‌صرفه اقتصادی دستیابی این ترکیبات می‌باشد، برداشت بیش از حد این گونه وحشی منجر به حذف کامل گیاه از طبیعت خواهد شد. علاوه بر این، وجود تنش‌های شدید از جمله خشکی در ایران نیز از مهم‌ترین عوامل تهدیدکننده رشد گیاه و تولیدات دارویی به شمار می‌رود. لذا، این پژوهش به‌منظور گسترش و بهره‌برداری از گیاه زنیان با هدف ایجاد یک شیوه کارا جهت تکثیر و تولید انبوه در شرایط آزمایشگاهی طراحی شد. به این منظور، برای تقویت ترکیبات فنولی و مواد مؤثره گیاهچه‌های زنیان رشدیافته تحت تنش خشکی از کیتوزان، برای به حداقل رساندن اثرات جانبی تنش خشکی و همچنین بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت در شیشه استفاده شد.

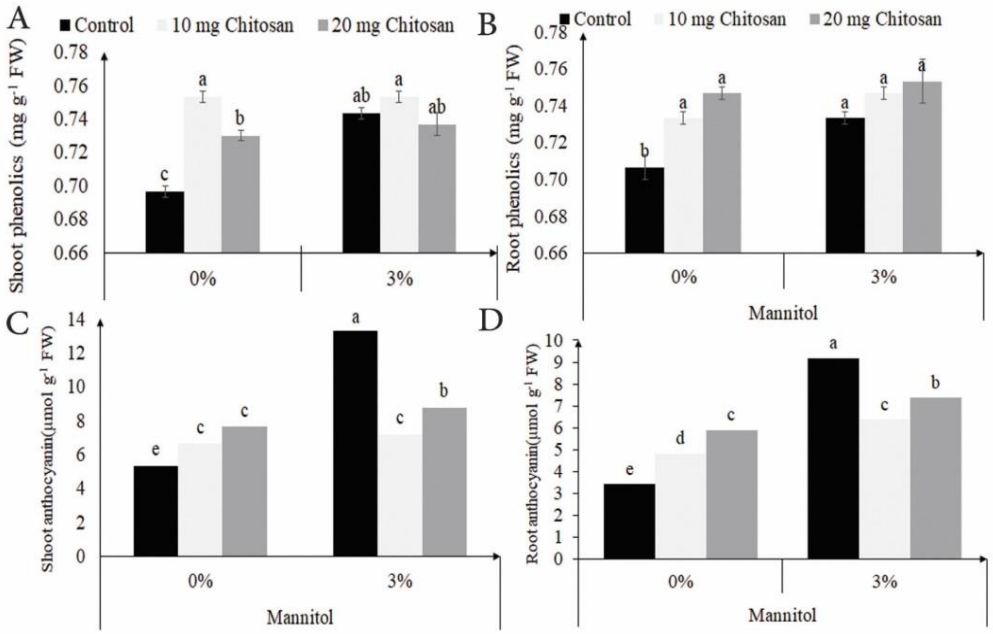
۲. مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه زنیان از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. تعدادی بذور پس از شستشو در محیط‌های کشت MS کشت و در اتاق رشد نگهداری شدند. سپس از گیاهچه‌های دو هفته‌ای، جداکشت تهیه و به محیط‌های حاوی ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان و ۰ و ۳ درصد مانیتول منتقل و به مدت چهار هفته در اتاق رشد نگهداری شد. میزان ترکیبات فنولی بر اساس روش Singleton و همکاران (۱۹۹۹) و آنتوسیانین بر اساس روش Wagner (۱۹۷۹) اندازه‌گیری شد. مواد مؤثره اسانس در گیاهچه‌های رشدیافته در محیط کشت حاوی ۳ درصد مانیتول و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان و گیاهچه‌های شاهد با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگراف جرم سنجی مورد شناسایی و ارزیابی قرار گرفت (Li, 2009). نتایج حاصل با استفاده از روش آماری آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح $P \leq 0.05$ با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

۳. نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد تنش خشکی باعث افزایش معنی‌دار محتوای فنول و آنتوسیانین اندام هوایی و ریشه شد. همچنین نتایج نشان داد که اثر کیتوزان به‌تنهایی و در ترکیب با مانیتول متفاوت است. هر دو غلظت کیتوزان به‌تنهایی باعث

افزایش میزان فنول و آنتوسیانین اندام هوایی و ریشه در مقایسه با گیاهان شاهد شد؛ در حالی‌که کیتوزان در شرایط تنش خشکی تأثیر معنی‌داری بر میزان فنول نداشته و میزان آنتوسیانین را نیز در اندام هوایی و ریشه کاهش داد (شکل ۱).



شکل ۱. اثر تنش خشکی و کیتوزان بر ترکیبات فنولی اندام هوایی (A) و ریشه (B)، محتوای آنتوسیانین اندام هوایی (C) و ریشه (D) گیاهچه زنیان در شرایط کشت در شیشه. مقادیر نشان‌دهنده میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد (SE) و حروف غیرمتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن می‌باشد ($p\leq 0/05$).

مقایسه ترکیبات اصلی اسانس در گیاهچه‌های زنیان تحت تنش خشکی و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان در جدول ۱ نشان داده شده است. تیمول، گاماترپینن و پاراسیمن بیشترین و مهم‌ترین ترکیبات اسانس گیاهچه‌های زنیان را تشکیل می‌دهند. داده‌های ارائه شده در جدول ۱ نشان می‌دهد تنش خشکی باعث افزایش گاماترپینن و پاراسیمن در گیاهچه‌های زنیان شد، در حالی‌که میزان تیمول نسبت به شاهد تغییر نکرد. همچنین نتایج نشان داد اعمال کیتوزان باعث بهبود میزان تیمول و پاراسیمن در شرایط تنش خشکی شد. کیتوزان به‌تنهایی نیز باعث افزایش معنی‌دار تیمول و پاراسیمن شد. در این پژوهش، محتوای تیمول در گیاهچه‌های تیمار شده با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان همراه با مانیتول یا بدون مانیتول نسبت به شاهد به ترتیب حدود ۲۳ و ۴۸ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت. برخلاف تیمول و پاراسیمن، میزان گاماترپینن تحت تیمار کیتوزان به‌تنهایی و همچنین در ترکیب با مانیتول کاهش یافت.

جدول ۱. ترکیبات اصلی اسانس گیاهچه‌های زنیان تحت تنش خشکی و کیتوزان

اسانس	گیاهچه شاهد	گیاهچه تیمار شده با ۳٪ مانیتول	گیاهچه تیمار شده با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان	گیاهچه تیمار شده با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان و ۳٪ مانیتول

تیمول	۱۴/۵	۱۴/۵	۲۱/۵	۱۷/۸
پاراسیمن	۱۰	۱۲/۱	۱۴/۵	۱۴
گاماترپینن	۱۵/۴	۱۶/۹	۱۲/۹	۱۱/۷

٤. بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر، کیتوزان به‌عنوان یک محرک زیستی کارآمد برای افزایش ترکیبات فنولی، ترپنوئیدها و آنزیم‌های آنتی-اکسیدان در گیاهان شناخته شده است (Malerba and Cerana, 2020; Hidangmayum et al., 2019). به‌نظر می‌رسد که کیتوزان از طریق مسیرهای سیگنالینگ مختلف مانند سنتز فسفولیپاز C، تحریک پروتئین کینازهای فعال شده میتوژن و پراکسیداز هیدروژن که منجر به شروع رویدادهای رونویسی ژن‌های دفاعی می‌شود بر رشد گیاه و سنتز متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارد (Ahmed et al., 2020). بسیاری از آزمایشات افزایش قابل‌توجهی در ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین گیاهان تیمار شده با کیتوزان از جمله *Scrophularia striata* (Kamalipourazad et al., 2016)، *Berberis vulgaris* L. (Özgen et al., 2012) و *Brassica oleracea* L. (Pérez-Balibrea et al., 2011) را نشان داده‌اند. یافته‌های ما نیز نشان داد که تیمار کیتوزان باعث افزایش معنی‌دار محتوای فنولی و آنتوسیانین در اندام هوایی و ریشه زنیان شد.

علاوه بر این، کیتوزان در ساختار خود دارای گروه‌های هیدروکسیل و آمینوی فراوانی است که می‌توانند با ROS واکنش دهد و رادیکال‌های ماکرومولکولی پایدار و نسبتاً غیرسمی را تشکیل دهد و از این طریق ممکن است توانایی گیاهان را در جاروب کردن رادیکال‌های آزاد، به‌ویژه تحت تنش غیرزیستی، بهبود بخشد (Hidangmayum et al., 2019). نتایج ما نشان داد کیتوزان باعث افزایش محتوای فنولی و متابولیت‌های ثانویه مانند تیمول و پاراسیمن تحت تنش خشکی می‌شود. نتایج مشابهی در آزمایش-های انجام شده با *Thymus daenensis* (Bistgani et al., 2017) و safflower (Golkar et al., 2019) گزارش شده است. مطالعات قبلی نشان داده شده است که احتمالاً کیتوزان با تغییر بیان و فعالیت آنزیم‌هایی مانند فنیل آلانین آمونیالیاز در بیوسنتز فنول‌ها و ترپنوئیدها تأثیر می‌گذارد (Ahmed et al., 2020).

نتایج این پژوهش همچنین نشان داد که تیمار کیتوزان به‌تنهایی و یا همراه با مانیتول باعث افزایش محتوای پاراسیمن و تیمول در گیاهچه‌های زنیان شد، در حالی‌که میزان گاماترپینن کاهش یافت. از آنجایی‌که گاماترپینن پیش‌ماده سنتز تیمول و پاراسیمن است، به‌نظر می‌رسد کیتوزان با تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های مسیر مربوطه در زنیان مصرف گاماترپینن را برای تولید تیمول و پاراسیمن القا کرده باشد.

تحقیقات بسیاری نشان داده است تیمول و سایر ترکیبات موجود در اسانس مانند پاراسیمن به دلیل بی‌خطر بودن برای سلامتی مصرف‌کنندگان و داشتن خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در صنایع غذایی و همچنین در جستجوی داروهای جدید طبیعی ارزشمند باشد. بنابراین، افزایش محتوای ترکیبات فنولی، تیمول و پاراسیمن با استفاده از کیتوزان به‌تنهایی یا همراه با تنش خشکی نشان می‌دهد که استفاده از کیتوزان در غلظت‌های خاص می‌تواند به عنوان یک الیسیتور جدید در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه با ارزش و داروهای آنتی اکسیدانی عمل کند.

منابع

Ahmed, K.B.M., Khan, M.M.A., Siddiqui, H., Jahan, A. 2020. Chitosan and its oligosaccharides, a promising option for sustainable crop production-a review. Carbohydrate Polymers. 227: 115331.

Amorati, R., Valgimigli, L. 2018. Methods to measure the antioxidant activity of phytochemicals and plant extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 66(13): 3324–3329.

Bistgani, Z.E., Siadat, S.A., Bakhshandeh, A., Pirbalouti, A.G., Hashemi, M. 2017. Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. The Crop Journal. 5(5): 407–415.

Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. Journal of Ethnopharmacology. 79: 213–220.

Golkar, P., Taghizadeh, M., Yousefian, Z. 2019. The effects of chitosan and salicylic acid on elicitation of secondary metabolites and antioxidant activity of safflower under *in vitro* salinity stress. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 137: 575–585.

Hidangmayum, A., Dwivedi, P., Katiyar, D., Hemantaranjan, A. 2019. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. Physiology and Molecular Biology of Plants. 25: 313–326.

Kamalipourazad, M., Sharifi, M., Maivan, H.Z., Behmanesh, M., Chashmi, N.A. 2016. Induction of aromatic amino acids and phenylpropanoid compounds in *Scrophularia striata* Boiss. cell culture in response to chitosan-induced oxidative stress. Plant Physiology and Biochemistry. 107: 374–384.

Li, X.M., Tian, S.L., Pang, Z.C. 2009. Extraction of *Cuminum cyminum* essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and system distillation. Food Chemistry. 115: 1114–1119.

Malerba, M., Cerana, R. 2020. Chitin- and chitosan-based derivatives in plant protection against biotic and abiotic stresses and in recovery of contaminated soil and water. Polysaccharides. 1: 21–30.

Özgen, M., Saraçoˆglu, O., Geçer, EN. 2012. Antioxidant capacity and chemical properties of selected barberry (*Berberis vulgaris* L.) fruits. Horticulture, Environment, and Biotechnology. 53: 447–451.

Pérez-Balibrea, S., Moreno, D.A., García-Viguera, C. 2011. Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. Food Chemistry. 129: 35–44.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Ravents, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymology. 299: 152–178.

Wagner, G.J. 1979. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. Plant Physiology. 64: 88–93.

Chitosan to enhance phenolic compounds and thymol of *Carum copticum* seedlings grown under *in vitro* drought stress

, Zahra Mosayebi[2], Fatemeh Adabavazeh[1,2*]Roya Razavizadeh[1]

[1] Department of Biology, Payame Noor University, 193953697 Tehran, Iran
[2] Department of Biology, Shahid Bahonar University, 7616914111 Kerman, Iran

Abstract

Nowadays, mass production of secondary metabolites such as flavonoids, terpenes and alkaloids in valuable, rare, or threatened medicinal species by plant tissue culture techniques has gained an increasing interest. In this study, the effect of chitosan on the increase of the secondary metabolites and main compounds of essential oils of *Carum copticum* under *in vitro* drought stress. For this purpose, seedlings of *C. copticum* were cultured in MS medium with different levels of chitosan (0, 10 and 20 mg/l) and mannitol (0 and 3%). After four weeks, the results indicated that the application of drought stress and chitosan alone induced a significant increase in phenolic and anthocyanin contents. In interaction between drought and chitosan, it was also determined that chitosan had no significant effect on accumulation of phenolic compounds under drought stress and reduced anthocyanin content. The result also showed that the application of chitosan either with or without mannitol caused a significant increase in the amount of thymol and p-cymene and a decrease in γ-terpinene in *C. copticum* seedlings. According to the results, it seems that chitosan and mannitol at optimal concentrations can be valuable elicitors for *in vitro* biosynthesis and improvement of the secondary metabolites.

Keywords: Phenolic compounds, Drought stress, Thymol, *Carum copticum* L., Chitosan

* e-mail: razavi.roya@pnu.ac.ir

گیاه دارویی باستانی توتون، متابولیت های ثانویه، ارزش اقتصادی

قمر پودینه[۱] و آرمان بیرقدار کشکولی[۲*]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲ - استادیار، گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

چکیده

گیاه دارویی باستانی توتون با نام علمی *Nicotiana tabacum* با نام فارسی توتون، گیاهی از خانواده Solanaceae و در دنیا بیشتر به عنوان گیاه صنعتی و در تولید دخانیات و سیگار کاربرد دارد. امروزه ترکیبات دارویی در این گیاه شناسایی شده که اهمیت این گیاه در حوزه گیاهان دارویی را پررنگ نموده است. مهمترین اندام گیاه برگها می باشد که محل تجمع ترکیب مهم و ارزشمند نیکوتین می باشد. علاوه بر ترکیبات ازت دار و آلکالوییدهای شاخصی چون نیکوتین، سایر متابولیت های ثانویه همچون آنابازین، نورنیکوتین، میوسمین، روتین، اسید کلروجنیک، اسکوپولین و اسکوپولتین، رزمارینیک اسید، سینامیک اسید، لوتئین و وانیلیک اسید، اسکلارئول و سولانول اشاره نمود. این گیاه دارویی در درمان و بهبود بیماری کرونا، آلزایمر، پارکینسون و ترکیبات زیست فعال آن دارای خاصیت آنتی میکروبی، آنتی باکتریال ، ضد قارچی، ضد اضطراب و استرس می باشد. این گیاه خاصیت حشره کشی قوی نیز دارد.

در این مقاله سعی گردیده است جنبه های متفاوت و عمدتاً غیردخانی این گیاه دارویی باستانی و پتانسیل ایجاد ارزش افزوده آن مورد ارزیابی قرار گیرد.

واژه های کلیدی: گیاه دارویی، توتون، نیکوتین، کرونا، حشره کش.

---

*ایمیل نویسنده مسئول:
a.beyraghdar@modares.ac.ir

۱. مقدمه

سابقه استفاده از گیاهان دارویی به هزاران سال پیش بر می گردد که بشر برای درمان بیماریها به اهمیت گیاهان پی برد. در ابتدا سرخپوستان آمریکایی از توتون به روش های مختلف، مانند اعمال مذهبی و دارویی استفاده می کردند. بر این باور بوده اند که توتون یک داروی شفابخش است و برای پانسمان زخم‌ها و همچنین به عنوان مسکن برای دندان درد و گوش درد ، از هیستری گرفته تا کزار ،درمان شپش سر استفاده می‌شد. آنها برای دور کردن حشرات و همچنین جهت سمی نمودن تیرها جهت شکار نیز از پودر یا عصاره این گیاه استفاده می کردند(Berlowitz,et Binorkar,et al.2012 .(al,2020.

کریستف کلمب در سال ۱۴۹۲ میلادی به دنبال اثبات کروی بودن زمین، به جزیره ای در میان آمریکای شمالی و جنوبی رسید، که امروزه به کوبا معروف است. در کوبا بومیان برگهای گیاه توتون را د اخل نی های استخوانی و یا داخل نوعی چپق به نام "تاباکو"قرار می دادند که بصورت یک لوله توخالی Y مانند بود که قسمت دو شاخه آن در بینی جای می گرفت ودود آن را استعمال می نمودند. برگ ها را به روی آتش ریخته و دود آن را داخل ریه های خود می کردند. کریستف کلمب تصور می کرد چیز جادوئی کشف کرده و هنگام مراجعت به اسپانیا مقداری از برگ ها و دانه های آن گیاه را با خود برد و بدین گونه توتون به اروپا راه یافت(Rawat,et al.2013, Charlton et al,2004). در سال ۱۵۶۰ نیکوت سفیر فرانسه در پرتغال کتابی درباره خاصیت تخریری توتون انتشار داد و کلمه نیکوتین بعداً از اسم همین دیپلمات گرفته شد.

توتون سابقه‌ای ۳۰۰ ساله در کشورمان دارد. بذر توتون سیگارت در سال ۱۲۵۱ و به توصیه "محمدخان ناصرالملک همدانی فرمانفرما" و توسط "دکتر استپان هاراطونیانس" که در گیلان به نام "حکیم فانوس" مشهور بود، به ایران وارد شده است. در روایتی ، استفاده از دخانیات را به تسلط پرتغالیها به جنوب کشور نسبت می دهند.در روایتی دیگر، ساکنان مرزی ایران در تبادلات تجاری با عثمانی ها، از دخانیات استفاده می نمودند.

ارقام پرمصرف توتون که در ایران کشت و کار می شوند عبارتند از: رقم باسما(بخاطر عطر و طعم) ، رقم بارلی (وجود قند مناسب و حجیم کننده) و رقم ویرجینیا(نیکوتین بالا). از استانهایی که بیشترین کشت و کار توتون در کشور دارند، می توان به استان های مازندران، گلستان، گیلان، کردستان، آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی اشاره نمود. (زندیه و عباسی. ۱۳۸۹، زمانی.۱۳۸۹)

ترکیبات دارویی شناسایی شده در این گیاه اهمیت آن را در حوزه گیاهان دارویی را پررنگ نموده است. امروزه توتون تنها به عنوان یک ماده دود زا مطرح نیست بلکه به عنوان گیاهی با خصوصیات ویژه در میان گیاهان، و به عنوان ماده غذایی نیز مورد استفاده قرار می گیرد . پروتئین و اسید های آمینه موجود در توتون بسیار بالاتر از سویا بوده و با پروتئین کازئین شیر برابری می کند و از توتون می توان برای تهیه پروتئین های مخصوص تولید انرژی بهره گرفت و چقدر خوب است که از توتون برای تغذیه و کالری در جهان استفاده کرد و نه برای مرگ ۱۰ میلیون سیگاری در

سال.گیاهی است که در پژوهش ها و تحقیقات بعنوان گیاه مدل و در ژنتیک و انتقال ژن بسیار کاربرد دارد. خاصیت حشره کشی توتون به اثبات رسیده و در سموم حشره کشی از ترکیبات فعال این گیاه استفاده می شود Popova,et al,2018).امیدبیگی۱۳۸۹.زمانی۱۳۸۹).

۲. متابولیت های ثانویه

به دلیل اهمیت صنعتی و اقتصادی این گیاه در دنیا، مطالعات بسیاری روی ترکیبات و درصد آنها صورت گرفته است. از جمله میتوان به درصد نیکوتین در برگهای خشک این گیاه، درصد قندها، درصد ترکیبات معدنی از جمله ازت، فسفر، پتاسیم، منیزیم و کلر اشاره نمود. متابولیت های ثانویه این گیاه،متنوع بوده و اثرات درمانی فوق العاده ای دارند. به همین دلیل مسیرهای بیوسنتزی متعددی هم مشاهده میشود.

۲-۱ترکیبات آلکالوییدی و ازت دار:

ترکیبات آلکالوئیدی و ازت دار توتون اکثرا از مسیر بیوسنتزی گلوتامات و آسپاراتات صورت می گیردکه به تولید ارنتیتین ،آرژنین و لیزین می انجامد،که نیکوتین،آنابازین و سایر ترکیبات آلکالوئیدی تولید می شود. از نگاه دارویی، ترکیب ارزشمند نیکوتین، مصارف بالایی در زمینه های صنعتی، داروسازی، آرایشی بهداشتی، حشره کش ها دارد. محل سنتز نیکوتین در توتون در ریشه آن می باشد و بیشترین مقدار آن در برگ تجمع می یابد(Oeung,et al.2017). تقریبا در همه اندامهای توتون، غیر از بذر، نیکوتین یافت می شود.(Zenkner,et al.2019. Zou,et al.2021) .

سیگار کشیدن و دود ناشی از برگ توتون یکی از عوامل خطر برای سرطان ریه می باشد، اما عصاره‌های آلی مشتق شده از ریشه*N. tabacum* دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی و ضد میکروبی هستند Al-Lahhama,et). al.2020. Patil.2015. Malik.2015) برگ های توتون پتانسیل ضد باکتریایی بالایی دارندکه از آن در درمان برفک دهان ناشی از کاندیدا آلبیکنس وگلودرد استرپتوکوکی ناشی از استرپتوکوک پیوژنز استفاده می شود Ameya ,et) al,2017. Anumudu ,et al.201910).

گیاهی است که به دلیل اینکه حاوی ترکیباتی مانند سولفات نیکوتین، خواص ضدنماتد و ضد التهابی دارد و به عنوان یک گیاه دارویی در درمان بیماری های عفونی مورد استفاده می شود. اثرات اسکولیسیدال خوبی از خود نشان داد و می توان از آن برای بهبود عمل جراحی کیست هیداتید استفاده کرد(Latifi,et al.2017) .

از گیاه توتون میتوان در استخراج متابولیت های ثانویه که در مسیر های بیوسنتزی تولید می شود، استفاده کرد. به عنوان مثال با تلقیح برگ توتون با آگروباکتریوم رایزوژنز میتوان نیکوتین و ترکیبات فنولی را با ایجاد ریشه های مویین افزایش داد. همچنین میتوان ترکیبات زیست فعال ارزشمند و متابولیت های ثانویه که در سایر گیاهان دارویی به میزان کم وجود دارند، با استفاده از القای ریشه مویین تولید نمود که ترکیب ژرانیول از آن جمله می باشد(Ritala,et al,2014).

ترکیب نیکوتین در دزهای مشخص در آدامس های نیکوتین، کرم های آرایشی و بهداشتی، اسموت های نیکوتینی و در درمان بیماریها به کار می رود. در مطالعاتی که در سال ۱۹۷۹ روی افراد سیگاری صورت گرفت، مشخص شد نیکوتین باعث افزایش دوپامین در مغز می شود. اثرات مثبت نیکوتین بر مغز در بیماری های آلزایمر و پارکینسون مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد دوپامین ماده شیمیایی خوبی در کنترل توجه و حرکت می باشد. نیکوتین ترشح دوپامین را افزایش و سبب متعادل نمودن حرکات غیر قابل کنترل در بیماران مبتلا به پارکینسون می شود. همچنین در بیماران مبتلا به آلزایمر به عنوان آنتی اکسیدان برای از بین بردن رادیکال های آزاد، به حفاظت مغز کمک می کند. در بیماران اسکیزوفرنی، نیکوتین در مسدود کردن محرک های سخت ، به حداقل رساندن صداها و افکار تاثیر بسزایی دارد (Quik,et al.2008).

۲-۲ ترکیبات ترپنوئیدی

ترپنوئیدها از نظر ساختاری متنوع ترین دسته محصولات طبیعی گیاهی با طیف وسیعی از محصولات تجاری و پزشکی هستند(Reed,et al.2018). ترکیبات ترپنوییدی از مسیر متیل اریتروز دی فسفات و موالونات تولید سسکویی ترپن های ارزشمند و مونو و دی ترپن ها می نمایند. عصاره های اتیل استات و اتانولی برگ برای بررسی تری ترپنوئیدها، استروئیدها، فلاونوئیدها، تانن ها، فنل ها و ساپونین ها مناسب می باشند.

گلیکوزیدهای قلبی در عصاره برگ (کوئینون ها) نیز مشاهده گردید. عصاره های برگی در درمان اختلالات پوستی وضدقارچ پوستی گزارش شده اند. در کاهش درد، درمان اختلالات ناشی از شپش و نیش حشرات نیز کاربرد دارند. عصاره اتانولی استخراج شده از ساقه توتون، در روند بهبود زخم های موضعی، کم کردن درصد انقباض زخم و پتانسیل بالای آنتی اکسیدانی کارآیی دارند(Sharma,et al.2021) .

در بررسی اسانس به روش تقطیر با آب، ترکیبات مونو ترپن و دی ترپن و فنیل پروپانوئیدی گزارش شد. که ترکیب لینالول و لینانول اکسید، مانول و دی ایزو بوتیل فتالات از ترکیبات شاخص بودند. ترکیب اسکلارئول در عصاره کانکریتی که با حلال n –هگزان استخراج شده بود، یافت شد که خاصیت ضد میکروبی بالایی دارد.

بیشترین مقدار نیکوتین در عصاره رزینوئیدی توسط حلال اتانول۹۵ درصد استخراج گردید(Popova,et al,2020).

اخیراً میزان بروز سرطان کبد در سراسر جهان افزایش یافته است. دیترپن‌های نوع سمبرانوئید (CBDs) از توتون، فعالیت ضد میکروبی، ضد تومور و محافظت عصبی خوبی از خود نشان می‌دهند. α-CBD جدا شده از *N. tabacum* L. می تواند به طور بالقوه به عنوان یک عامل ضد تومور طبیعی استفاده شود(Yuan,et al,2019) .عطر توتون محصول تخریب اکسیداتیو کارتنوئید و ترپنوئیدهایی همچون، لوتئین، بتاکاروتن، ویولاگزانتین و نئوگزانتین در برگ سبز می باشد. برخی ارقام توتون از جمله رقم باسما به رقم عطری معروف می باشد که به دلیل صمغ ها و روغن های اتری موجود در گیاه می باشد.(Popova,et al,2019) .

۲-۳ ترکیبات فنولی

این ترکیبات از مسیرهای بیوسنتزی شیکیمیک اسید و مالونات استات مشتق می شوند(Zenkner,et al,2019) . پلی فنول های موجود در توتون، خواص آنتی اکسیدانی بالایی از خود نشان داده اند. به عنوان مثال، از عصاره های متانولی که از ارقام مختلف توتون گرفته شد، عصاره متانولی رقم SP-28 بیشترین میزان مقدار کل محتوای فنل، مقدار کل فلاونوییدی و تانن کل، ظرفیت حذف رادیکال آزاد (DPPH) نسبتاً بالا، در بین ارقام مورد آزمایش نشان داد. همچنین مقدار ABTS در رقم SN-2بالاترین میزان و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در رقم SN-1میلی گرم بالاترین مقدار را نشان داد(Xie,et al,2021).

در بررسی دیگر ترکیبات پلی فنولی شاخص در توتون، اسید کلروجینیک، وانیلیک اسید، کوئرستین، بتولین و کارنوزیک اسید گزارش شدند. از مهمترین ترکیبات کومارینی گزارش شده میتوان به اسکوپولین و اسکوپولتین اشاره کرد(Sharma,et al.2021)

۳- ارزش اقتصادی و کاربردها

گیاه توتون به دلیل مصرف بالایی که در صنعت دخانیات و سیگار سازی دارد، در سطح وسیعی از مزارع جهان در حال کشت و کار می باشد و اقتصاد کشورهایی همچون آمریکا، چین، کوبا، هند و بسیاری از کشورهای دنیا به آن وابسته است(زندیه وعباسی.۱۳۸۹). برگهای این گیاه توسط کشاورزان در چین های مختلف برداشت و به روشهای مختلفی مورد خشک کردن و فرآوری قرار می گیرد. این روشها عبارتند از روش خشک کردن در آفتاب ، در سایه و روشهای استفاده از دستگاه و گرمخانه ها (زمانی.۱۳۸۹). در مباحث دارویی به ترکیبات زیست فعال ، مسیرهای بیوسنتزی و روش بهینه سازی این ترکیبات و استخراج مواد موثره توجه می شود. به گونه ای که برای دستیابی به اهداف دارویی، روشهای فرآوری مناسب با آن ترکیبات مورد استفاده قرار می گیرد.

از بیان موقت ژن در تولید متابولیت های ثانویه ارزشمند یا پروتئین ها و یا واکسن ها با استفاده از این گیاه می توان بهره برد. تولید متابولیت ارزشمند آرتمیزین با استفاده از مهندسی بیوتکنولوژی در سیستم های بیوسنتزی جایگزین در گیاه توتون در مقابله عفونت های ویروسی سارس و کووید به پتانسیل بالای این گیاه اشاره دارد (Reed,et al.2018, Farmanpour,et al.2022). شرکت کانادایی شرکت زیست دارویی مدیکاگو با استفاده از ذراتی شبه ویروس کرونا در توتون، واکسن کرونا تولید نمود. تولید ذرات شبه ویروس (VLPs) که شباهت زیادی به ویروس دارند و به دلیل نداشتن ماده ژنتیکی غیر عفونی هستند. این ذرات شبه ویروس کرونا به خاک اضافه و با رشد گیاه توسط برگها جذب شد و تولید پروتئین S-spike، یکی از سه پروتئین اسپایک ویروس کرونا نمود. پس از استخراج این پروتئین ها، موفق به تولید واکسن کرونا شدند(Dyer.2022).

نیکوتین و سایر مشتقات ان در ساخت حشره کش ها و کنترل آفات گیاهی کاربرد گسترده ای دارد. عصاره های غنی از نیکوتین خاصیت بالای شته و کنه کشی دارند.

گیاهی است که عناصر سنگین را به خوبی جذب میکند و در گیاه پالایی نقش مفیدی دارد. جیوه در گیاهان، بسیاری از اعمال سلولی را مختل، رشد و نمو متوقف می کند. گیاه توتون درمواجه با جیوه، با حفظ فشار اسمزی داخلی، باعث تجمع اسمولیت مانند پرولین شده و قندهای محلول را بالا می برد. باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدان های غیرآنزیمی، آنتوسیانین، فنل، فلاونول و فلاونوئید در برگها می شود (فرجادی و نورسته نیا.۱۴۰۰). مقادیر بالایی از فلز سنگین کادمیوم را در دوره کوتاهی از خاک خارج و جذب می نماید(Li,et al.2022).

آلکالوئیدها، در ضایعات تنباکو به وفور یافت می شوند.بازیابی آلکالوئیدها از ضایعات توتون برای آفت کش های بیولوژیکی می تواند استفاده از آفت کش های شیمیایی سنتی و جلوگیری از آلودگی زمین های کشاورزی را کاهش دهد(Wei,et al.2020). تولید روغن‌های زیستی غنی‌شده (bio oil) از ضایعات توتون با ترکیبات معطر می تواند ارزش افزوده بالایی ایجاد نماید. تولید حلال قوی و صنعتی مثل فورفوران و سایر ترکیبات مهمی که در صنعت مورد استفاده قرار میگیرد، میتواند گام مهمی در جهت بهره مندی از دور ریزها و ضایعات گیاه باشد. تولید پلت های سوختی و ساخت ترکیباتی که در ساخت و سازها مورد استفاده قرار میگیرند، از موارد ارزش آفرین اقتصادی این گیاه می باشند.

پیریدین موجود در گیاه، در صنایع شیمیایی به عنوان ماده اولیه حیاتی کاربری دارد. به عنوان ضد عفونی کننده در محصولات، نگهداری و حفظ دندان ها ، در صنعت داروسازی ، مخلوط ضد یخ به عنوان یک ماده طبیعی، در رنگ سازی، در تهیه سموم دفع آفات و ترکیب اولیه برخی قارچکشها استفاده می شود(Jokic,et al2019).

٤- پیشنهادات

گیاه توتون دارای ترکیات زیست فعال و متابولیتهای ثانویه ارزشمند می باشد که متاسفانه به دلیل صنعتی بودن در حوزه دخانیات به ترکیبات دارویی آن کمتر توجه شده است. امروزه دنیا شاهد اثرات مثبت محصولی می باشد که مورد نکوهش می باشد. تاثیرات آنتی اکسیدانتی، آنتی باکتریال، آنتی میکروبی، بهبود بیماری های آلزایمر، پارکینسون و اسکیزوفرنی این گیاه اثبات شده است. ترکیب مهم نیکوتین و سایر متابولیت های ثانویه آن در صنایع داروسازی، ساخت واکسن، در صنایع آرایشی و بهداشتی کاربرد دارد. استفاده از روشهای فرآوری و مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی در جهت استخراج ترکیبات ارزشمند گیاه توتون گام مهمی در صنعت داروسازی این گیاه دارویی باستانی می باشد.

منابع

امید بیگی ر،تولید و فراوری گیاهان دارویی،1392،جلد سوم، چاپ هفتم، انشارات آستان قدس رضوی

زمانی ،پ.۱۳۸۹.زراعت و عمل آوری توتون.شرکت دخانیات ایران.

زندیه، ح و عباسی، ف. ۱۳۸۹.تنباکو در ایران. فصلنامه تاریخ روابط خارجی سال یازدهم، ۴۲ ـ ۱۹۲ ـ ۱

فرجادی، م و نورسته نیا، ا. ۱۴۰۰. اثرات فلز سنگین جیوه بر برخی پاسخهای فیزیولوژیکی توتون. یافته های نوین در علوم زیستی -ج۲:۸- ۱۱۸-۱۲۹.

Al-Lahhama.S, Sbiehb.R , Jaradatb.N , Almasria.M , Mosaa.A , Hamayela.A , Hammada.F,2020, Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of four different extracts derived from the roots of Nicotianatabacum L. European Journal of Integrative Medicine, 3. 101039.

Ameya,G, Manilal.A, Merdekios.B,2017, In vitro Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of Nicotiana tabacum L. Extracted in Different Organic Solvents, The Open Microbiology Journal, 11, 352-359.

Anumudu CK, Nwachukwu MI , Obasi CC , Nwachukwu IO and Ihenetu FC,2019, Antimicrobial Activities of Extracts of Tobacco Leaf (Nicotiana tabacum) and Its Grounded Snuff (Utaba) on Candida albicans and Streptococcus pyogenes,journal of Tropical Diseases, 7:2.

Berlowitz.I Garc´ıa Torres .E , Walt . H , Wolf . U , Maake.C and Martin-Soelch.C,2020, "*Tobacco Is the Chief Medicinal Plant in My Work*": Therapeutic Uses of Tobacco in Peruvian Amazonian Medicine Exemplified by the Work of a *Maestro* Tabaquero, Front. Pharmacol. 11:594591 .

Binorkar.S.V , Jani.D.K.2012, Traditional Medicinal Usage Of Tobacco – A Review, Spatula Dd; 2(2):127-134

Charlton.A, BA PhD,2004, Medicinal uses of tobacco in history, Journal Of The Royal Society Of Medicine 97:292–296.

Degola F,, Fattorini..L , Bona.E, Sprimuto .C.T , Argese E , Berta G , Toppi ,L.S.D,2015, The symbiosis between Nicotiana tabacum and the endomycorrhizal fungus Funneliformis mosseae increases the plant glutathione level and decreases leaf cadmium and root arsenic contents, Plant Physiology and Biochemistry,92.11-18.

Dewey .R.E , Xie.J,2013, Molecular genetics of alkaloid biosynthesis in Nicotiana tabacum, Phytochemistry, 94 . 10–27.

Dyer.O,2022, Covid-19: WHO set to reject Canadian plant based vaccine because of links with tobacco industry, BMJ 2022;376:o811.

Farmanpour-Kalalagh.K , Beyraghdar Kashkooli,A, Babaei.A , Rezaei.A and. van der KrolA.R,2022, Artemisinins in Combating Different Diseases, Front. Plant Science,volume13,780257.

Kamal Kishore,2014, Monograph Of Tobacco (Nicotiana Tabacum), Indian Journal Of Drugs,2(1), 5-2.

Latifi .R , Azadmehr.A , Mosalla ,S , Saleki.K, Hajiaghaee .R,2022. Scolicidal effects of the Nicotiana tabacum L . extract at various concentrations and exposure times, Journal of Medicinal Plants, ; 2 1 (82): 111 -118.

Leffingwell.J.C,1999, Basic Chemical Constituents of Tobacco Leaf and Differences among Tobacco Types, Tobacco: Production, Chemistry and Technology, Chapter 8 Leaf Chemistry,265-284.

Li..X , Li .Y , Zhu .X , Gui.X , Ma.C , Peng.W , Li .Y, Zhang .Y , Huang .W , Hua.D , Jia e.S , Wu .M.2022, Evaluation of the cadmium phytoextraction potential of tobacco (Nicotiana tabacum) and rhizosphere micro-characteristics under different cadmium levels, Chemosphere, 286. 131714.

Malik.R, Bokhari,T.Z, Siddiqui.M.F, Younis.U, Hussain.M.I, Ahmed Khan.I,2015, Antimicrobial Activity Of Nerium Oleander L. And Nicotiana Tabacum L.: A Comparative Study, Pakistan Journal Of Botany, 47(4): 1587-1592.

Jokic.S , Gagic.T , Knez Z, Banozi.M, Skerget.M, (2019) Separation of active compounds from tobacco waste using subcritical water extraction, J. of Supercritical Fluids 153 . 104593.

Oeung.S, Nov.V, Ung.H, Roum.K, Yin.V, Keo.S, Chea.S,2017, Phytochemical analysis of different extracts of leaves of Nicotiana tabacum L. of Cambodia, Asian Journal of Pharmacognosy (2017) 1(3):18-26.

Patil.R.S,2015, Comparative Study Of Antimicrobial Compounds Extracted From Leaves Of Nicotiana Tabacum And Cigarette, World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences, Volume 4, Issue 03, 1511-1518.

Popova.V, Ivanova1.T , Stoyanova.A, Georgiev.V, Hristeva.T, Nikolova.V, Docheva.M, Nikolov.N and Damyanova.S,2018, Phytochemicals in leaves and extracts of the variety "Plovdiv 7" of Bulgarian oriental tobacco (Nicotiana tabacum L.), Trends in Phytochemical Research (TPR), 2(1) . 27-36.

Popova .V, Ivanova .T , Prokopov .T , Nikolova .M , Stoyanova. A and Zheljazkov.V.D,2019, Carotenoid-Related Volatile Compounds of Tobacco (Nicotiana tabacum L.) Essential Oils, Molecules, 24, 3446.

Popova .V , Ivanova .T , Stoyanova .A , Nikolova .V , Hristeva .T , Gochev .V , Yonchev.Y , Nikolov .N and. Zheljazkov.V.D,2020, Terpenoids in the Essential Oil and Concentrated Aromatic Products Obtained from Nicotiana glutinosa L. Leaves, Molecules, 25, 30.

Quik.M, Leary.K, and Tanner.C,2008, Nicotine and Parkinson's disease; implications for therapy, Mov Disord. . 15; 23(12): 1641–1652.

Rawat.A, Mali.R,2013, Phytochemical Properties And Pharmcological Activities Of Nicotiana Tabacum: A Review, Indian Journal Of Pharmaceutical & Biological Research (Ijpbr). Vol. 1 (1).

Reed.J , Osbourn.A,2018, Engineering terpenoid production through transient expression in Nicotiana benthamiana, Plant Cell Reports , 37:1431–1441.

Ritala,.A, Dong L, Imsengc.N, Seppänen-Laaksoa.T, Vasilev .N, Krol .S.V, Rischer H, Maaheimoa.H, Virkki .A, Brändli .J, Schillberg .S, Eibl .R, Bouwmeester .H, Oksman-Caldentey.K.M,2014, Evaluation of tobacco (Nicotiana tabacum L. cv. Petit Havana SR1) hairy roots for the production of geraniol, the first committed step in terpenoid indole alkaloid pathway,Journal of Biotechnology 176 - 20–28.

Sharma.Y , Kaur .A , Bhardwaj.R , Srivastava .N , Lal .M , Madan.S , Bala .K,2021, Preclinical assessment of stem of Nicotiana tabacum on excision wound model, Bioorganic Chemistry, 109. 104731.

Wei. M ,Yang .F , Song .X , Li .R , Pan .X , Gao Q, He .Y , Ye .M, and Hu .H,2020, Extraction of Nitrogen Compounds from Tobacco Waste via Thermal Treatment, Energies, 13, 4619.

Xie .D, Yao L, Huang.L , Wu .S , Ma. L, Li .Y and Wang .W,2021, Anxiolytic Effect of Two Tobacco Essential Oils (Nicotiana tabacum Linn.) on Mice, Molecules, 26, 4171.

Yuan.X.L, Mao.X.X, Du.Y.M, YanP.Z, Hou.X.D, Zhang.Z.F,2019, Anti-Tumor Activity of Cembranoid-Type Diterpenes Isolated from Nicotiana tabacum L, Biomolecules, , 9, 45.

Zenkner.F.F , Pinheiro.M.M. and Cagliari.A,2019, NICOTINE BIOSYNTHESIS IN NICOTIANA: A METABOLIC OVERVIEW, Tobacco Science , 56:1–9.

Zou.X, Amrit BK, Rauf,.A, Saeed.M, Al-Awthan.Y.S, Al-Duais.M.A, Bahattab.O, Hamayoon Khan.M, and. Suleria.H.A.R,2021, Screening of Polyphenols in Tobacco (Nicotiana tabacum) and Determination of Their Antioxidant Activity in Different Tobacco Varieties, ACS Omega 2021, 6, 25361−25371.

تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن بر میزان اسانس، ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی پوست پرتقال (*Citrus sinensis*)

سعیده محتشمی[1] *، زهرا لیمویی[2]، فاطمه علی‌پور[2]

[1] گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم

[2] پژوهش سرای دکتر برنا، جهرم

چکیده

انتخاب روش مناسب خشک‌کردن، تاثیر مثبتی بر حفظ کیفیت مواد موثره گیاهان دارویی داشته و به عنوان یکی از مهمترین مراحل فرآوری گیاهان دارویی محسوب می‌شود. پوست مرکبات به عنوان یکی از بخش‌های مهم و دارویی میوه (به دلیل داشتن اسانس و برخی ترکیبات فلاونوئیدی) محسوب می‌گردد که به عنوان ضایعات محسوب می‌شود و متاسفانه کمتر مورد توجه قرار می‌گیرد. در این پژوهش تاثیر روش‌های مختلف خشک‌کردن، شامل چهار روش: آفتاب، سایه (دمای محیط)، آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ماکروویو با توان ۴۰۰ وات انجام شده است. مهمترین ویژگی‌های مورد بررسی شامل درصد اسانس (حجمی-وزنی)، ترکیبات فنلی کل و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود. بیشترین میزان اسانس (۱ درصد) مربوط به نمونه خشک‌شده در آفتاب بود درحالی که کمترین میزان اسانس (۰/۵۲ درصد) در نمونه خشک‌شده توسط ماکروویو اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان ترکیبات فنلی کل (۵/۹۲ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم نمونه خشک) در نمونه خشک‌شده توسط ماکروویو و کمترین میزان (۳/۸۵ میلی‌گرم) مربوط به نمونه خشک‌شده در دمای محیط اندازه‌گیری شد. بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب مربوط به نمونه‌های خشک‌شده در آفتاب و ماکروویو بود (۷۸/۹۰ و ۷۸/۴۶ درصد) درحالی‌که کمترین میزان فعالیت آنتی-اکسیدانی (۶۶/۳۸ درصد) در نمونه خشک‌شده در سایه اندازه‌گیری شد. به طور کلی، باتوجه به نوع کاربرد و هدف (استفاده از ماده موثره خاص) می‌توان روش مناسب برای این محصول را انتخاب کرد.

واژگان کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اسانس، سایه، فرآوری، فلاونوئیدها.

* E-mail: mohtashamis@yahoo.com

۱. مقدمه

با افزایش تولید جهانی مرکبات در طی دو دهه اخیر توسط تولیدکنندگان بزرگی مانند چین، برزیل، هند، مکزیک، اسپانیا، ترکیه، مصر، نیجریه، ایتالیا، ایران، آرژانتین، پاکستان و جنوب آفریقا، ضایعات حاصل از فرآوری آن افزایش یافته است (Mamma and Christa Kopoulos, 2014). جهرم نیز یکی از شهرهای مهم تولید کننده مرکبات در ایران به حساب می‌آید که لیمو و پرتقال از محصولات مهم مرکبات در این شهر می‌باشند. عمده ضایعات حاصل از مرکبات، پوست آن‌ها می‌باشد که حجم این ضایعات بدست آمده موجب بروز مشکلاتی برای کارخانجات فرآوری مرکبات شده است. مدفون کردن پوست مرکبات برخلاف سایر زباله‌های غذایی به دلیل قابلیت تخمیرپذیری بالا، هزینه‌های بالای حمل و نقل و کمبود محل دفن موجب مشکلاتی از نظر اقتصادی و زیست محیطی می‌شود (Mamma and Christa Kopoulos, 2014). این درحالی است که پوست مرکبات حاوی ترکیبات ارزشمندی است که در صنایع غذایی، داروسازی و آرایشی-بهداشتی کاربردهای فراوانی دارند. از مهم ترین ترکیبات استخراج شده از پوست پرتقال می‌توان به اسانس‌ها، فلاونوئیدها و پکتین‌ها اشاره کرد. اسانس پوست پرتقال در صنایع آرایشی-بهداشتی در تهیه مواد آرایشی، عطرها، صابون‌ها، شوینده‌ها و در صنایع غذایی به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی بالا و همچنین طعم‌دهندگی مطلوب آن به‌کار می‌رود (Di Rauso Simeon et al., 2020). همچنین پوست پرتقال حاوی متابولیت‌های با ارزشی است که اثرات بیولوژیکی و درمانی مختلفی را ایجاد می‌کنند. خواص مختلفی از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا، ضد التهاب، ضد سرطان، ضد اضطراب، ضد چاقی، اثرات مثبت بر شکنندگی مویرگ‌ها و تجمع پلاکت‌ها برای پوست پرتقال ذکر شده است. همچنین مواد موثره موجود در پوست این میوه (فلاونوئیدهای نارنجین و هسپریدین) در پیشگیری از بیماری‌های قلبی و عروقی بسیار موثر هستند (Di Rauso Simeon et al., 2020). مواد موثره موجود در گیاهان دارویی و همچنین پوست پرتقال به طور موثری تحت تاثیر روش‌های مختلف فرآوری قرار می‌گیرند. پوست پرتقال مانند سایر گیاهان، سطح بالایی از رطوبت و میکروارگانیسم‌ها را دارا می‌باشد. بنابراین خشک‌کردن سریع، مهمترین کار در فرایند پس از برداشت، جهت اجتناب از کاهش مواد ارزشمند موجود در آن می‌باشد. خشک‌کردن، یکی از قدیمی‌ترین روش‌های نگهداری محصولات کشاورزی پس از برداشت می‌باشد. این فرایند شامل حذف رطوبت با استفاده از عمل تبخیر تا حد رسیدن به یک آستانه خاص است تا بتوان محصول را برای مدت طولانی انبار کرد و فعالیت‌های آنزیمی، میکروارگانیسم‌ها و مخمرها را در آن متوقف نمود (محتشمی و همکاران، ۱۳۹۱؛ عزیزی و همکاران، ۱۳۸۸). فرایند خشک‌کردن، کمیت و کیفیت اسانس و سایر مواد موثره موجود در گیاهان را دستخوش تغییر می‌کند و این تاثیر بر اساس دمای خشک‌کردن، طول مدت خشک‌کردن و گونه گیاهی متفاوت است (عبادی و همکاران، ۱۳۸۹). متاسفانه به دلیل ناآگاهی موسسات و اشخاص حقیقی درگیر در تولید و فرآوری گیاهان دارویی، روش صحیح خشک کردن گیاهان معمولا رعایت نمی‌شود که این امر کاهش محتوی، عملکرد و تغییر محسوس مواد موثره گیاهان دارویی و در پی آن کاهش اثرات درمانی و بیولوژیکی آن‌ها می‌شود (مختاریان و همکاران، ۱۳۹۶). در فرایند خشک‌کردن، با توجه به نوع مواد موثره موجود در گیاه دارویی (اسانس، آلکالوئید، فنل، گلیکوزید، فلاونوئید و ...) باید روش مناسبی را برای آن انتخاب نمود، زیرا حساسیت مواد موثره مختلف به دما و مدت زمان خشک‌کردن متفاوت می‌باشد (محتشمی و همکاران، ۱۳۹۱). همچنین خشک‌کردن موجب کاهش حجم محصول تولیدی می‌شود که با سهولت حمل و نقل همراه است. بنابراین بدین شکل می‌توان محصول تولیدی را به راحتی به اقصی نقاط جهان ارسال نموده (چون تمام نقاط دنیا رویشگاه همه گیاهان دارویی نیست) و در دسترس همگان قرار داد. بنابراین بکارگیری روش‌های مناسب خشک کردن، انبارداری

و بسته‌بندی در گیاهان دارویی و افزایش کیفیت آن از موثرترین گزینه‌های کاهش حجم ضایعات و بهبود کیفیت محصول نهایی است (امیدبیگی، ۱۳۸۵).

تاکنون تاثیر روش‌های مختلف خشک‌کردن بر متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی مختلف مانند بادرنجبویه (حسن زاده و همکاران، ۱۳۹۷)، بادرشبی (محتشمی و همکاران، ۱۳۹۱)، مرزه (عبادی و همکاران، ۱۳۸۹)، زعفران (آقایی و همکاران، ۱۳۹۶)، مرزنجوش (رحیمی و فرخی، ۱۳۹۸)، ترخون (رضوانی مقدم و همکاران، ۱۳۹۲)، خوشاریزه (عبدوسی و همکاران، ۱۴۰۰) و ... بررسی شده است اما تاکنون تحقیقی در رابطه با تاثیر روش‌های مختلف خشک‌کردن بر متابولیت‌های ثانویه پوست پرتقال انجام نشده است. لذا با توجه به اینکه پوست پرتقال، حاوی مواد موثره ارزشمندی است که در صنایع غذایی، آرایشی-بهداشتی و داروسازی کاربرد فراوانی دارد، این پژوهش با هدف بررسی اثر روش‌های مختلف خشک‌کردن بر مدت زمان خشک‌شدن و مواد موثره پوست پرتقال جهت تعیین بهترین روش خشک‌کردن در راستای بهره‌وری بیشتر از ضایعات محصولات باغبانی و همچنین استخراج مواد موثره با کمیت و کیفیت بالاتر از آن انجام گردید.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. منطقه مورد مطالعه

این آزمایش در آزمایشگاه گیاهان دارویی دانشگاه جهرم در سال ۱۴۰۱ اجرا شد. پرتقال‌های بکار گرفته شده در این آزمایش مربوط به درختان کشت شده در شهر جهرم بود که از مغازه خریداری شدند.

۲.۲. روش تحقیق

پس از پوست‌گیری پرتقال‌ها، ابتدا میزان رطوبت پوست اندازه‌گیری شد، به طوری‌که ۳ نمونه ۵۰ گرمی از پوست پرتقال در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در آون قرار داده شد تا کل رطوبت آن خارج شود و سپس از طریق رابطه زیر میزان رطوبت پوست محاسبه شد.

۱۰۰ × وزن اولیه / (وزن نمونه بعد از خشک شدن-وزن اولیه نمونه) =درصد رطوبت

پس از آن پوست‌ها به ۴ روش مختلف (۱- خشک‌کردن در آفتاب با میانگین دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد ۲- سایه با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد ۳- آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد ۴- ماکروویو با توان ۴۰۰ وات) تا رسیدن به حد مجاز ۱۰ درصد رطوبت، خشک شدند. در رابطه با هر روش خشک‌کردن، از سه نمونه ۱۵۰ گرمی استفاده شد. پس از خشک‌شدن پوست پرتقال‌ها به روش‌های مختلف، اندازه گیری میزان مواد موثره در آن‌ها به شرح زیر انجام گرفت.

۳.۲. میزان اسانس

اسانس‌گیری با استفاده از دستگاه کلونجر (Clevenger) به روش تقطیر با آب انجام شد. برای این کار، میزان ۵۰ گرم از نمونه‌های پوست پرتقال خشک شده توسط هر روش به صورت جداگانه وزن شد و به منظور استخراج سریع‌تر به قطعات کوچک ۱ تا ۲ سانتی‌متری خرد شدند و سپس به بالن مخصوص اسانس‌گیری انتقال یافت و میزان ۶۰۰ میلی‌لیتر آب اضافه شد. تقطیر به مدت سه ساعت بعد از جوش آمدن نمونه‌ها ادامه یافت تا عمل استخراج اسانس به صورت کامل انجام شود. در پایان میزان اسانس

جمع شده در قسمت مدرج دستگاه کلونجر اندازه‌گیری و به صورت درصد حجمی-وزنی (حجم اسانس به وزن نمونه خشک) محاسبه شد و سپس درون شیشه‌های مخصوص نگهداری اسانس، درون فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

٤.٢. عصاره‌گیری

عصاره‌گیری از نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری سایر صفات بیوشیمیایی به‌صورت زیر انجام شد. عصاره توسط حلال متانولی به نسبت ۵ به ۱ (حجمی- وزنی) با استفاده از حلال متانول ۷۰ درصد انجام شد. برای تمامی نمونه‌ها میزان ۵ گرم نمونه خشک وزن شد و به لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری انتقال یافت و سپس میزان ۲۵ میلی‌لیتر حلال به آن‌ها اضافه شد و مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با دور ۲۰۰ دور در دقیقه (rpm) نگهداری شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه داخل سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ قرار گرفت و سپس قسمت رو شناور صاف و به عنوان عصاره جهت انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰- نگهداری شد (وجدی لو و همکاران، ۲۰۰۷).

٥.٢. میزان ترکیبات فنلی کل

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی کل با استفاده از معرف فولین سیوکالتئو (Folin-Ciocalteu) اندازه‌گیری شد (وجدی لو و همکاران، ۲۰۰۷). از هر نمونه میزان ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره با ۲۰۰ میکرولیتر فولین ۵۰ درصد مخلوط شد و در ادامه ۲۰۰۰ میکرو لیتر آب مقطر به محلول اضافه شد. پس از ۳ دقیقه، ۱۰۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد به محلول اضافه شد و بعد از کمی هم‌زدن، نمونه‌ها یک ساعت در شرایط اتاق و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. سپس عدد جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر انجام شد. تبدیل داده‌های حاصل از جذب به غلظت‌های مختلف گالیک اسید با رسم منحنی استاندارد گالیک اسید انجام شد و نتایج به صورت میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک بیان شد.

٦.٢. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از آزمون DPPH (2، 2 –diphenyl picrylhydrazyl) به روش اک و همکاران (۲۰۰۹) با اندکی تغییر انجام شد. جاروب کردن رادیکال‌های آزاد به وسیله روش اسپکتروفتومتری بر پایه کاهش رادیکال‌های آزاد انجام شد. بدین منظور، میزان ۳۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های هر نمونه به ۵ میلی‌لیتر محلول DPPH با غلظت ۰/۰۰۴ درصد اضافه شد. در محلول شاهد به جای عصاره، ۳۰۰ میکرولیتر متانول اضافه شد. محلول‌ها به مدت ۱۰ ثانیه به شدت تکان داده شدند و مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و شرایط تاریکی نگهداری شدند و در نهایت اعداد جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. اعداد جذب پایین‌تر نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر می‌باشد. درصد فعالیت آنتی-اکسیدانی (AOA) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

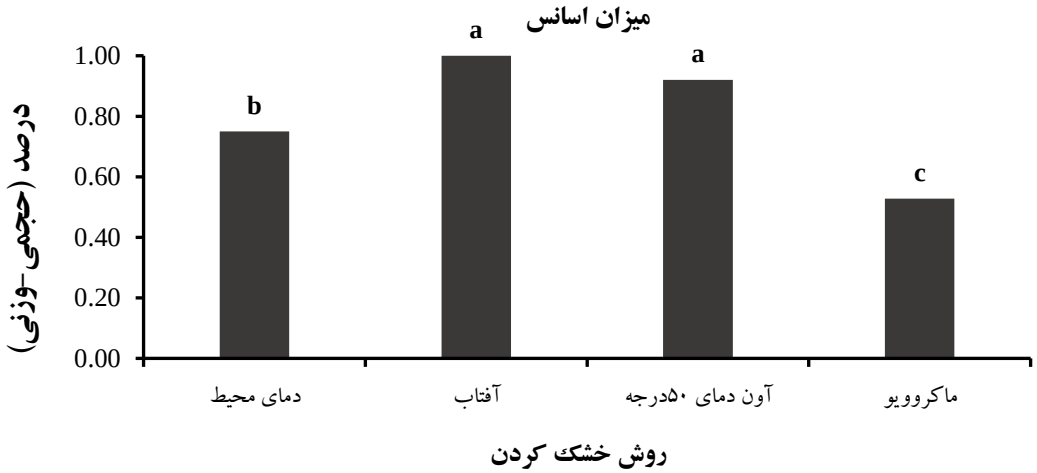
۱۰۰ ×عدد جذب شاهد/ (عدد جذب نمونه -عدد جذب شاهد) = ٪ AOA درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۳. نتایج

نتایج این تحقیق نشان‌دهنده تاثیر روش‌های مختلف خشک‌کردن بر مواد موثره پوست پرتقال بود. نتایج مربوط به فاکتورهای اندازه‌گیری شده در زیر ارائه شده است.

۱.۳. میزان اسانس

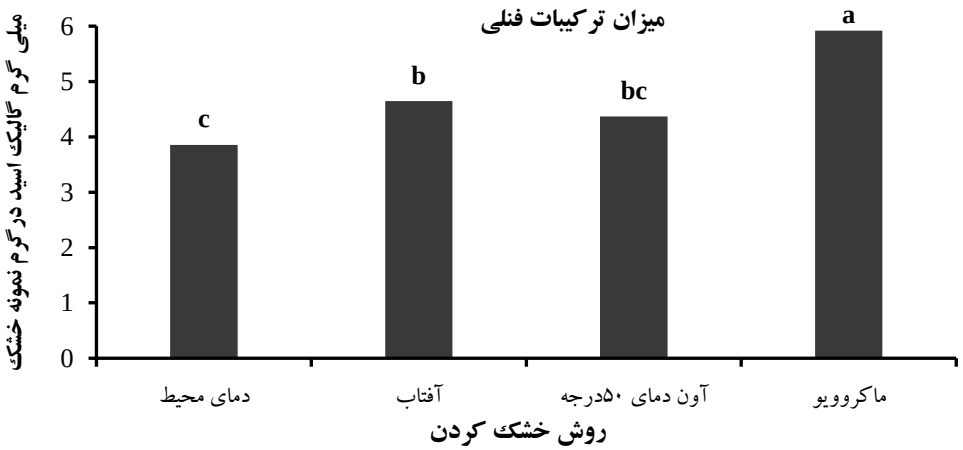
بیشترین میزان اسانس (۱ درصد) مربوط به نمونه خشک‌شده در آفتاب و بعد از آن مربوط به نمونه خشک‌شده در آون دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (۰/۹۲ درصد) بود. درحالی که کمترین میزان اسانس (۰/۵۲ درصد) مربوط به نمونه خشک‌شده توسط ماکروویو با توان ۴۰۰ وات بود و میزان اسانس مربوط به نمونه خشک‌شده در سایه در حد متوسط (۰/۷۵ درصد) بود. در واقع میزان اسانس نمونه خشک‌شده در آفتاب تقریبا ۲ برابر نمونه خشک شده به‌وسیله ماکروویو بود (شکل ۱).



شکل ۱- تغییر در میزان اسانس پوست پرتقال تحت تاثیر روش‌های مختلف خشک‌کردن

۲.۳. میزان ترکیبات فنلی کل

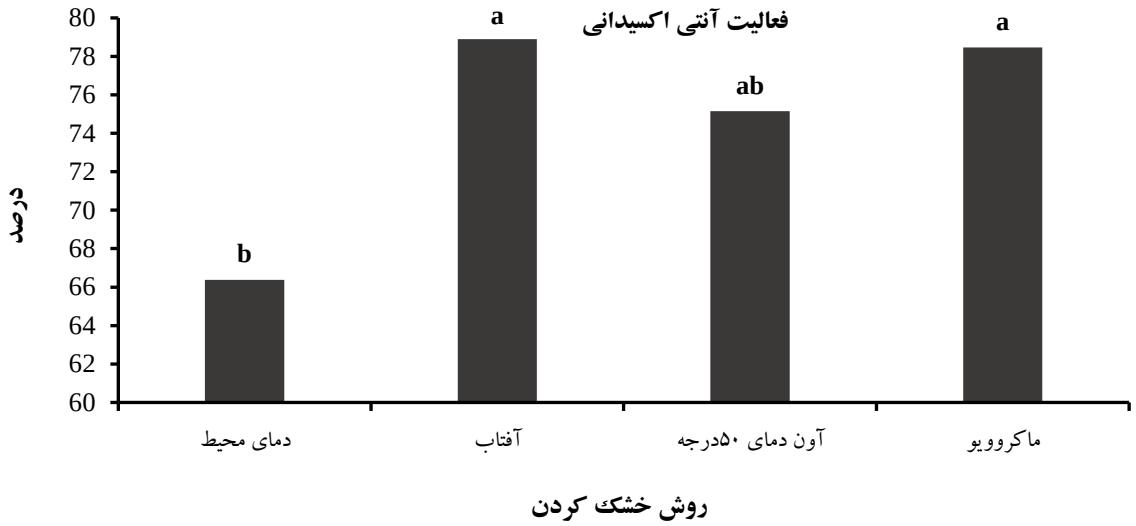
اختلاف بین بیشترین و کمترین میزان ترکیبات فنلی کل در نمونه‌های مختلف حدود ۳۵ درصد بود، به‌طوری‌که بیشترین میزان (۵/۹۲ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم نمونه خشک) در نمونه خشک شده توسط ماکروویو اندازه‌گیری شد و بین نمونه‌های خشک‌شده توسط آفتاب و آون اختلاف زیادی وجود نداشت و کمترین میزان (۳/۸۵ میلی‌گرم) مربوط به نمونه خشک‌شده در دمای محیط بود (شکل ۲).



شکل ۲- تاثیر روش‌های مختلف خشک‌کردن بر میزان ترکیبات فنلی موجود در پوست پرتقال

۳.۳. فعالیت آنتی اکسیدانی

بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب مربوط به نمونه‌های خشک‌شده در آفتاب و ماکروویو بود (۷۸/۹۰ و ۷۸/۴۶ درصد) درحالی‌که کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۶۶/۳۸ درصد) در نمونه خشک‌شده در سایه اندازه‌گیری شد (شکل ۳).



شکل ۳- تاثیر روش‌های مختلف خشک‌کردن بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست پرتقال

٤. بحث و نتیجه‌گیری

مواد موثره گیاهان دارویی به دو دسته ترکیبات فرار و غیر فرار تقسیم می‌شوند. ترکیبات فرار شامل ترکیبات معطری مانند اسانس‌ها می‌شوند و ترکیبات غیر فرار شامل ترکیباتی مانند ترکیبات فنلی کل، آلکالوئیدها، گلیکورزیدها، تانن‌ها، موسیلاژها و ... می‌باشد که ترکیبات فنلی کل نیز خودشان به دو دسته ترکیبات فنلی فلاونوئیدی و ترکیبات فنلی غیر فلاونوئیدی تقسیم می‌شوند که هر کدام از این دسته‌ها متشکل از ترکیبات مختلفی هستند (Ghani et al., 2021) و حساسیت هرکدام از این ترکیبات به دما و زمان خشک‌شدن متفاوت می‌باشد (امیدبیگی، ۱۳۸۵).

نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد، اگرچه استفاده از ماکروویو می‌تواند زمان خشک‌شدن را به‌طور قابل توجهی کاهش دهد اما اثر منفی بر میزان اسانس پوست پرتقال دارد و میزان آن را کاهش می‌دهد. این درحالی است که ماکروویو برخلاف اینکه اثر منفی بر میزان اسانس دارد، در حفظ ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست پرتقال تاثیر مثبت داشت. در واقع اسانس‌ها به دلیل سرعت تبخیر و فراریت بالا تحت تاثیر امواج و حرارت ایجاد شده در ماکروویو، به میزان قابل توجهی از دست می‌روند. اما از طرف دیگر در ماکروویو به دلیل کوتاه‌تر شدن زمان خشک‌شدن زمان کمتری برای فعل و انفعالات شیمیایی جهت تخریب و یا اکسید شدن ترکیبات غیر فرار وجود دارد و میزان بیشتری از آن‌ها در پوست پرتقال حفظ می‌شوند (عبادی و همکاران، ۱۳۸۹؛ رضوانی مقدم و همکاران، ۱۳۹۲).

اسانس‌ها ترکیباتی هستند که به دماهای بالا جهت خشک‌شدن خیلی حساس‌تر از سایر مواد موثره می‌باشند و بهترین دما برای خشک‌کردن اندام‌های گیاهی دارای اسانس، ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد است (امیدبیگی، ۱۳۸۵). به نظر می‌رسد که روش خشک‌کردن در سایه به دلیل داشتن دمای کمتر، بهتر از روش آفتاب و آون دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد باشد اما یک مسئله مهم در بحث خشک‌کردن اندام‌های گیاهان دارویی علاوه بر دما، مدت زمان خشک‌شدن می‌باشد. هرچه دمای کمتر و مدت زمان کوتاه‌تری برای خشک‌شدن گیاهان اسانس‌دار بکار برده شود، از تبخیر اسانس‌ها در حین خشک‌شدن جلوگیری می‌شود (محتشمی و همکاران، ۱۳۹۱). در روش سایه چون مدت زمان بیشتری نسبت به روش آفتاب و آون دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد طول کشیده است، فرصت بیشتری برای تبخیر و از دست رفتن اسانس‌ها در این روش وجود داشته است. یکی از دلایلی که باعث شده است در روش آفتاب میزان اسانس نسبت به سایر روش‌ها بیشتر حفظ شود، پایین بودن دمای لازم برای خشک شدن در این فصل و مدت زمان کوتاه‌تر برای خشک‌شدن نسبت به سایه بوده است. در روش آفتاب، میزان تشعشع بالا و تهویه مناسب‌تر نسبت به روش آون باعث شده است که علیرغم دمای پایین‌تر از آون، مدت زمان خشک‌شدن کوتاه شود و نتایج آن نزدیک به روش آون شود و نتایج نسبتا مطلوبی به دست آید. البته روش آفتاب برای همه گیاهان نمی‌تواند روش مناسبی باشد و در برخی گیاهان اثرات منفی بر جای گذاشته است.

دو نوع ماده موثره مهم (اسانس‌ها و فلاونوئیدها) در پوست پرتقال وجود دارد که کاربردهای آن‌ها از نظر غذایی و دارویی متفاوت می‌شود. از طرفی پاسخ این دو نوع ماده موثره نسبت به روش‌های مختلف خشک‌شدن متفاوت بوده است. لذا نتیجه‌گیری کلی باید بر اساس موارد کاربرد پوست پرتقال در صنایع مختلف باشد. مثلا اگر هدف از خشک‌کردن پوست پرتقال، استخراج و کاربرد اسانس آن باشد، خشک‌کردن در آفتاب و یا آون دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد توصیه می‌شود و انتخاب از بین این دو روش باید بر اساس میزان و حجم پوستی باشد که برای خشک‌شدن در اختیار داریم، صورت پذیرد. اگر در مقیاس و حجم کمی باشد، خشک‌کردن در آفتاب ارجحیت دارد در حالی که در مقیاس وسیع به دلیل اینکه برای روش آفتاب فضای زیادی لازم است، این روش زیاد مناسب نیست و باید از خشک‌کن‌های کابینتی که طبقه بندی شده‌اند و حداکثر استفاده از فضا می‌شود، با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد استفاده کرد. همچنین اگر هدف از خشک‌کردن پوست پرتقال استخراج و کاربرد ترکیبات فلاونوئیدی مهم موجود در آن باشد، طبیعتا براساس نتایج بدست آمده از این تحقیق، روش ماکروویو گزینه مناسبی برای آن می‌باشد. چون در این روش علاوه بر اینکه زمان خیلی کمی صرف می‌شود، ترکیبات فلاونوئیدی نیز بیشتر حفظ می‌شوند. اما اگر هدف از خشک‌کردن پوست پرتقال هم استفاده از اسانس و هم ترکیبات فلاونوئیدی باشد، روش خشک‌کردن در آفتاب را به عنوان روش بهینه می‌توان انتخاب کرد. چون علاوه بر این‌که میزان اسانس در این روش بهتر حفظ شده است، ترکیبات فلاونوئیدی و سایر ترکیبات غیرفرار نیز در این روش بعد از روش ماکروویو بهتر از سایر روش‌ها حفظ شده است. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روش آفتاب نیز نسبت به سایر روش‌ها بالاتر بوده است.

منابع

امیدبیگی، ر. ۱۳۸۵الف. تولید و فرآوری گیاهان دارویی.جلد اول. انتشارات به‌نشر. مشهد. ۴۳۸ صفحه.
آقایی، ز.، جعفری، س.م.، قربانی، م.، همتی، خ. ۱۳۹۶. تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حسی زعفران. علوم و صنایع غذایی. ۶۵(۱۴): ۱۲۹-۱۳۸.

حسن‌زاده، ک.، همتی، خ.، مهدی‌پور، م. ۱۳۹۷. تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن (طبیعی و آون) بر زمان خشک کردن و برخی متابولیت‌های ثانویه گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis*). نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی. ۲۵(۱): ۱۳۷-۱۴۳.

رحیمی، ا.، فرخی، ا. ۱۳۹۸. بررسی اثر روش‌های مختلف خشک کردن بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فیتوشیمیایی و ترکیبات موثره اسانس گیاه دارویی *Origanum vulgare* L. Subsp. Gracile. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی. ۲۷(۳): ۱۴-۲۷.

رضوانی‌مقدم، پ.، غنی، ع.، رحمتی، م.، محتشمی، س. ۱۳۹۲. اثر روش‌های مختلف خشک کردن بر زمان خشک شدن و برخی مواد موثره در دو توده ترخون (*Artemisia dracuculus* L.). فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۲۹(۲): ۴۶۰-۴۷۵.

عبادی، م.ت.، رحمتی، م.، عزیزی، م.، حسن‌زاده خیاط. ۱۳۸۹. بررسی تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن (طبیعی، آون، ماکروویو) بر زمان خشک کردن، درصد و اجزای اسانس گیاه دارویی مرزه (*Satureja hortensis*). ۲۶(۴): ۴۷۷-۴۸۹.

عبدوسی، و.، توکلی، ب.، مهرآفرین، ع.، نقدی‌بادی،ح. ۱۴۰۰. بررسی تغییرات کمی و کیفی اسانس *Echinophora plattyloba* DC. تحت تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن. نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۳۷(۱): ۱۷۸-۱۹۲.

عزیزی، م.، رحمتی، م.، عبادی، م.ت.، حسن‌زاده خیاط، م. ۱۳۸۸. بررسی تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن بر سرعت کاهش وزن، میزان اسانس و درصد کامازولن گیاه دارویی بابونه (*Matricaria recutita* L.). تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۲۵(۲): ۱۸۲-۱۹۲.

محتشمی، س.، بابالار، م.، ابراهیم زاده موسوی، س.م.، میرجلیلی، م.ح.، ادیب، ج.، ۱۳۹۱. اثر شرایط کشت و روشهای مختلف خشک کردن، بر مدت زمان خشک شدن، میزان اسانس، خصوصیات رنگ و بار میکروبی بادرشبی (*Dracocephalum moldavica*). مجله علوم باغبانی ایران. ۴۳(۲): ۲۴۳-۲۵۴.

مختاریان، م.، حامدی، ح.، جنیدی‌جعفری، ن.، آخوندزاده بستی، ا. ۱۳۹۶. بررسی روش‌های مختلف خشک کردن گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Mentha piperita*). فصلنامه گیاهان دارویی. ۱۶(۴): ۱۴۷-۱۶۱.

Di Rauso Simeone, G., Di Matteo, A., Antonietta Rao, M., Di Vaio, C. 2020. Variations of peel essential oils during fruit ripening in four lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) cultivars. Journal of Science of Food and Agriculture, 100: 193–200.

Ghani, A., Mohtashami, S., Jamalian, S. 2021. Peel essential oil content and constituent variations and antioxidant activity of grapefruit (*Citrus* × *paradisi* var. red blush) during color change stages. Journal of Food Measurement and Characterization. 15(6): 4917-4928.

Mamma, D., Christakopoulos, P., 2014. Biotechnological potential of citrus peels. In: Microbes in Process. Nova Science Publishers, Inc., pp. 59–91.

Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M. R., Conforti, F., Statti, G., De Cindio, B., Houghton, P. J., Menichini, F. 2009. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. Food Chemistry, 114(2), 553-560.

Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S., Altundag, S. 2009. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. Food Chemistry 112: 874-879.

Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L. and Bogdanov, S. 2004. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. Phytochemical Analysis 15: 235-240.

Wojdylo, A., Oszmianski, J. and Czemerys, R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compound in 32 selected herbs. Food Chemistry, 1005: 940-949.

Investigating the influence of different drying methods on essential oil, phenolic contents and antioxidant activity of orange peel (*Citrus sinensis*)

Saeideh Mohtashami[1*], Zahra Limouei[2], Fatemeh Alipour[3]

[1] Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran
[2] Research Center of Dr. Borna, Jahrom, Iran

Abstract

Choosing the suitable drying method has a positive effect on maintaining the quality of the active substances of medicinal plants and is considered as one of the most important steps in the processing of medicinal plants. Citrus peel is considered as one of the important and medicinal parts of the fruit (because of its essential oil and some flavonoid compounds), which is considered as waste and unfortunately, it receives less attention. In this research, the effect of different drying methods, including four methods: sun, shade (ambient temperature), oven with a temperature of 50˚C and microwave with a power of 400 W has been done. The most important characteristics under investigation included essential oil percentage (V/W), total phenolic compounds and antioxidant activity percentage. The highest essential oil content (1%) was related to the sun-dried sample, while the lowest essential oil content (0.52%) was measured in the microwave-dried sample. The highest total phenolic compounds content (5.92 mg gallic acid/dry sample) was measured in the sample dried by microwave and the lowest content (3.85 mg) was measured in the sample dried at ambient temperature. The highest amount of antioxidant activity was related to the samples dried in the sun and microwave respectively (78.90% and 78.46%), while the lowest amount of antioxidant activity (66.38%) was in the dried sample. In general, according to the type of application and purpose (use of a specific active substance), the appropriate method can be chosen for this product.

Keywords: Antioxidant, essential oil, processing, shade, flavonoids.

[1]- mohtashamis@yahoo.com

مبانی تعیین ارزش آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی

نادر چاپارزاده*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

چکیده

تنش اکسیداتیو یک حالت پاتولوژیک است که در آن گونه‌های فعال اکسیژن، نیتروژن یا گوگرد بیش از ظرفیت مصرف یا بیش از ظرفیت سمزدایی در سلول‌ها تولید می‌شوند. مولکول‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها نقش مهمی در مقابله با این شرایط را دارند. اندازه گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی یا تعیین سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت‌ها، مایعات زیستی و مواد غذایی و دارویی در تشخیص و درمان شرایط و بیماری‌های مرتبط با تنش اکسیداتیو دارای ارزش فراوانی در علم بیوشیمی (بویژه بیوشیمی گیاهی) است. در جوامع امروزی یکی از مبناهای مقایسه‌ای بسیار مهم بین مواد غذایی توجه به محتوای آنتی‌اکسیدانی آنهاست. روش‌های مختلف ارزیابی توان آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف طبیعی و حتی مصنوعی وجود دارد. بر اساس نوع واکنش درگیر، این سنجش‌ها را می‌توان به سه دسته واکنش های انتقال اتم هیدروژن، انتقال تک الکترون و یا فعالیتهایی جاروبی هدفدار تقسیم نمود. از نظر روش دستگاهی اندازه‌گیری این سنجش‌ها به سه گروه اصلی اسپکتروفتومتری، کروماتوگرافی و الکتروشیمی تقسیم می‌شوند. به دلیل آسانی، سرعت عمل، هزینه کم و تکرارپذیری خوب روش اسپکتروفتومتری کاربرد زیادی داشته و در بیشتر مقالات از آن استفاده می‌شود. این مقاله سعی دارد مبانی شیمیایی چند روش اسپکتروفتومتری را بررسی نماید و نویسنده معتقد است درک اصول شیمیایی حاکم بر روش‌ها کمک شایانی به محققین در تخمین و تحلیل درست داده‌ها را خواهد داشت.

واژگان کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اسپکتروفتومتری، اکسیدان، روش

* e-mail: nchapar@azaruniv.ac.ir

۱. مقدمه

نشانگرهای زیستی تنش اکسیداتیو را می توان به دو دسته تقسیم نمود. دسته اول شامل مولکول‌هایی می‌شود که در اثر برهمکنش با گونه‌های فعال اکسیژن، نیتروژن یا گوگرد در ریز محیط مربوطه دچار تغییرات شیمیایی می‌گردند (Galano, 2015). از مثال-های واضح این دسته می‌توان به تغییرات در لیپیدها، DNA، پروتئین‌ها و کربوهیدارت‌ها اشاره کرد. دسته دوم شامل مولکول‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول‌هاست که در پاسخ به افزایش تنش ردوکس تغییر پیدا می‌کنند (Ho et al, 2013). شواهد علمی فعلی حاکی از ارزش فراوان تغذیه ای و دارویی فرآورده‌های طبیعی برای سلامتی انسان است. بخش اعظم فرآورده‌های طبیعی را تولیدات گیاهی تشکیل می‌دهند. تولیدات گیاهی پس از استخراج به مصارف گوناگون به عنوان افزودنی های طبیعی در صنایع غذایی، صنایع آرایشی و بهداشتی، نساجی، عطرسازی و داروسازی می‌رسند. ارزش و کاربرد عصاره های طبیعی به طور کلی به عملکرد ترکیبات فعال آنها بستگی دارد. در واقع، عصاره‌های طبیعی بیش از یک یا دو عملکرد دارند. امروزه، کاربردهای زیادی برای عصاره های طبیعی وجود دارد مانند عملکرد آنها به عوامل رنگ کننده، مواد مغذی، مواد نگهدارنده، طعم دهنده ها، عطرها، داروها، مکمل های ویتامینی و روغن های خوراکی از جمله آنهاست. علاوه بر عملکردهای تکنولوژیکی، ترکیبات شیمیایی گیاهی دارای عملکردهای زیستی دیگر مانند ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که امروزه نقش این ویژگی در کاهش خطر ابتلا به بیماری های قلبی و عروقی، سرطان، دیابت غیره مشخص شده است. ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاهی در اندام‌های مختلف مانند برگ‌ها، ساقه‌ها، ریشه‌ها، میوه‌ها، دانه‌ها و حتی پوست ساقه و ریشه بسته به نوع گیاه تولید و انباشته می‌شوند (Al-Jaber et al, 2011). سالانه هزاران مقاله در ارتباط با موضوع آنتی اکسیدان‌ها منتشر می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی مانند ترکیبات فنلی، کاروتنوییدها، ترپنوییدها و انواع ویتامین‌ها را شامل می‌شوند. به دلیل ترکیب پیچیده مواد گیاهی، جداسازی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و مطالعه آن به صورت جداگانه پرهزینه و تقریبا ناکارآمد است. همچنین ترکیبات آنتی‌اکسیدان مختلف ممکن است اثر هم‌افزایی هم داشته باشند و نوع حلال استخراج بر توان آنتی اکسیدانی عصاره‌های گیاهی تاثیر می‌گذارد (Boeing et al, 2014). بنابراین، امکان انجام و اندازه‌گیری سریع و کم‌هزینه توان آنتی‌اکسیدانی مواد غذایی یا عصاره‌های دارویی یک مطلوب برای محققین بوده ولی هنوز چنین روش استاندارد معرفی نشده است. تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل یک نمونه به روش‌هی شیمیایی در شرایط آزمایشگاهی از جمله روش‌های مورد توافق است که باید با شرایط خاص صورت پذیرد.

۱.۱. فعالیت جاروب رادیکال توسط آنتی اکسیداها

در هردو مکانیسم (واکنش‌های انتقال اتم هیدروژن و انتقال تک الکترون)، انرژی تجزیه پیوند و پتانسیل یونیزاسیون دو عامل تعیین کننده اصلی مکانیسم و کارایی آنتی‌اکسیدان‌ها هستند. هر چقدر انرژی تجزیه پیوند کمتر باشد انتقال اتم هیدروژن نیز سهل خواهد بود. روش های مبتنی بر انتقال اتم هیدروژن توانایی یک آنتی‌اکسیدان برای از جاروب رادیکال های آزاد را از طریق دادن هیدروژن برای تشکیل ترکیبات پایدار اندازه می‌گیرند. این روش‌ها ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را با شکستن زنجیره رادیکال انجام می‌دهند. در مقابل، روش‌های مبتنی بر انتقال تک الکترون توانایی یک آنتی‌اکسیدان را با انتقال الکترون جهت

احیای ترکیبات (فلزات، رادیکال‌های آزاد و کربونیل‌ها) اندازه گیری می کنند (Apak et al, 2016). در مکانیسم انتقال اتم هیدروژن مولکول آنتی‌اکسیدان هیدروژن خود را به در اختیار رادیکال جهت پایداری آن قرار داده و خود به یک رادیکال بی‌ضرر تبدیل می‌شود. در مکانیسم انتقال تک الکترون مولکول آنتی‌اکسیدان با دادن یک الکترون به رادیکال آزاد آن را به یک شکل آنیونی پایدار تبدیل می کند. کلاتاسیون عناصر واسطه توسط مولکول آنتی اکسیدان نیز مکانیسم دیگری است که مانع انجام واکنش‌های تولید رادیکال آزاد توسط عناصر واسطه مانند آهن، مس و منگنز می‌شود.

۲.۱. تعریف اکسیدان، آنتی‌اکسیدان و پیش‌اکسیدان

از نظر تعریف علم شیمی، اکسیداسیون (Oxidation) به عنوان از دست دادن الکترون‌ها یا اتم‌های هیدروژن ویا گرفتن اتم‌های اکسیژن تعریف می‌شود. در مقابل، احیا یا کاهش (Reduction) به گرفتن الکترون یا اتم هیدروژن ویا از دست دادن اتم‌های اکسیژن گفته می‌شود. با این تعریف، **اکسیدان** (Oxidant) یا عامل اکسیدکننده (Oxidizing Agent) ماده‌ای است که ماده دیگری را اکسید می کند. در یک واکنش شیمیایی احیا/اکسید یا ردوکس (Reduction-Oxidation or ReDox) یک الکترون، از یک عامل احیایی یا احیا کننده به عامل اکسیدان یا اکسیدکننده انتقال می‌یابد. بنابراین طی یک واکنش شیمیایی احیا/اکسید (ردوکس) عامل اکسیدان با گرفتن الکترون(ها) احیا شده و باعث اکسیداسیون می‌شود. طی واکنش درجه اکسیداسیون عامل اکسیدان کاهش ولی درجه اکسیداسیون عامل احیایی افزایش می‌یابد. در واکنش‌های شیمیایی درون سلول‌ها (با ترکیبات آلی) شرایط پیچیده‌تر می‌باشد و تشخیص واکنش‌های اکسیداسیون دشوار است زیرا هیچکدام از محصولات و یا واکنش دهنده‌ها ممکن است دارای بار نباشند. شاید بهترین مثال برای این مورد متابولیسم اتانول می‌باشد. زیرا اتانول با آنزیم های مربوطه ابتدا به استالدهید و سپس توسط آنزیم های دیگر به اسید استیک و در نهایت به دی اکسید کربن و آب تبدیل می‌شوند. دراینجا تعداد اتمهای هیدروژن در اتانول ۶ عدد ولی در استالدهید ۴ عدد می‌باشد. یعنی ۲ اتم هیدروژن طی اکسیداسیون اتانول به استالدهید از دست می‌رود. استالدهید دارای یک اتم اکسیژن ولی اسید استیک دارای ۲ اتم اکسیژن هستند و این نشان میدهد که با افزایش تعداد اکسیژن در اسید استیک اکسیداسیون اتفاق افتاده است. مهمترین ماده اکسیدان در سیستم‌های زیستی خود اکسیژن می‌باشد. **آنتی‌اکسیدان‌ها** (Antioxidants) مواد طبیعی یا مصنوعی هستند که عمل شیمیایی مخالف اکسیدان‌ها را انجام می‌دهند. در سیستم‌های زیستی آنتی‌اکسیدان‌ها برای جلوگیری یا به تاخیر انداختن آسیب اکسیداتیو ناشی از اکسیدان‌های فیزیولوژیک عمل می‌نمایند. بدین ترتیب، اصطلاحات اکسیدان و آنتی‌اکسیدان در متون علمی معانی مکمل هم پیدا کرده‌اند. نقش خنثی سازی گونه‌های فعال اکسیژن، نیتروژن یا گوگرد ویا رادیکال‌های آزاد دارای الکترون ناجفت، وظیفه اصلی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است. برای مثال، اسیدهای کربوکسیلیک همچون اسید سیتریک در مرکبات به فراوانی یافت می شود و در صنعت اغلب برای دادن طعم ترش به مواد غذایی، نگهدارنده و همچنین آنتی‌اکسیدان به غذاها اضافه می شود. آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی شامل ۴ دسته اصلی ویتامین‌ها، کاروتنوییدها، پلی‌فنول‌ها و مواد معدنی هستند (Arias et al, 2022) که از بین تمام متابولیت‌های ثانویه گیاهی، ترکیبات فنلی ارزش آنتی‌اکسیدانی بالایی در شرایط درون سلولی و یا برون سلولی نشان داده‌اند. ترکیبات فنلی محلول در آب هستند که در آنها یک یا چند گروه هیدروکسیل به یک یا چند حلقه متصل بوده و لذا ترکیبات قطبی هستند.

پیش‌اکسیدان‌ها (Prooxidant) بر خلاف اکسیدان‌ها نمی‌توانند واکنش اکسیداسیون انجام بدهند تا به شکل احیا در بیایند. پیش‌اکسیدان‌ها می‌توانند شروع، تسهیل یا تسریع آسیب اکسیداتیو به انواع مختلف اهداف بیولوژیکی مانند DNA (شکستگی‌های یک یا دو رشته)، لیپیدها (تغییرات ساختاری در ترکیب اسیدهای چرب و پراکسیداسیون لیپیدی) و پروتئین ها (کربونیلاسیون پروتئین‌ها و اکسیداسیون برخی از اسید آمینه‌های خاص) را باعث شوند. به عنوان مثال، یون های فلزات واسطه مانند آهن و منگنز در حالت های اکسیداسیون پایین به خودی خود اکسیدان نیستند، اما ممکن است با القای واکنش فنتون و واکنش هابر-ویس به تولید پراکسید هیدروژن یا گونه‌های فعال اکسیژن، نیتروژن یا گوگرد با نقش پیش‌اکسیدانی را موجب آسیب به مولکول‌های زیستی سلولی بشوند. این ترکیبات در سیستم‌های زیستی دارای منشای درونی (مانند برخی ترکیبات حاصل از متابولسیم سلولی) یا بیرونی (مانند داروها و سموم) هستند.

۳.۱. روش‌های اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی کل

روش‌های مختلف برای اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌های غذایی، گیاهی، دارویی و غیره توسعه یافته‌اند. روش‌های تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارای شرایط خاص می‌باشد (Munteanu and Apetrei, 2021). مهمترین روش‌های مختلف برای اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی عبارتند از:

سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی هم‌ارز ترولوکس (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity or TEAC)، سنجش توان احیای فریک (Ferric Reducing Ability of Plasma Power or FRAP)،

سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)،

سنجش ظرفیت جذب رادیکال اکسیژن (Oxygen Radical Absorbance Capacity or ORAC)،

سنجش پارامتر آنتی‌اکسیدانی به دام اندازی رادیکال (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter or TRAP)،

سنجش توان احیای یون مس (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity or CUPRAC)

و سنجش ((ABTS or 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)

روش‌های ORAC، TRAP و TEAC از جمله مکانیسم‌های انتقال اتم هیدروژن و FRAP و CUPRAC از جمله مکانیسم‌های انتقال تک الکترون محسوب می‌شوند ولی روش‌های DPPH و ABTS شامل هردو مکانیسم انتقال اتم هیدروژن و انتقال الکترون می‌گردند.

۲. بحث

TEAC: اساس این روش بر پاکسازی رادیکال $ABTS^{+}$ (2,2′-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) توسط یک آنتی‌اکسیدان در مقایسه با ترولوکس می‌باشد (Rubio et al, 2016). احیا ABTS با تغییر رنگ در طول موج ۷۵۰ یا ۴۰۵ نانومتر سنجیده می‌شود. فعالیت آنتی‌اکسیدان نمونه‌ها با ترولوکس (آنالوگ محلول در آب ویتامین E) مقایسه می‌شود.

FRAP: اساس اندازه‌گیری در این واکنش احیای ۳ ظرفیتی به آهن ۲ ظرفیتی است. در این آزمایش در محیط اسیدی مخلوط آهن ۳ ظرفیتی و 2,4,6-tripyridyl-s-triazine or TPTZ تحت تاثیر ترکیبات آنتی‌اکسیدان به یک کمپلکس بنفش- آبی تبدیل می‌شود که در طول موج ۵۹۳ نانومتر سنجیده می‌شود.

DPPH: رایج‌ترین روش ارزیابی توان آنتی‌اکسیدانی نمونه‌هاست. در این روش رادیکال DPPH or 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl در اتانول حل شده و تحت تاثیر آنتی‌اکسیدان احیا می شود. با احیای رادیکال DPPH رنگ ارغوانی آن به زرد کمرنگ تغییر می‌نماید که این تغییر رنگ در طول موج ۵۱۵ نانومتر سنجیده می‌شود (Lu et al, 2010).

ORAC: در این روش نمونه‌ها، شاهدها و استاندارد ترولوکس (با چندین غلظت برای ترسیم نمودار استاندارد) با فیکواریترین یا فلوئورسئین در دمای ثابت قبل افزودن (AAPH) 2,2′-azo-bis-(2- methylpropionamidine dihydrochloride مخلوط و انکوبه می‌شوند. با افزودن AAPH واکنش شروع و با گذشت زمان با مصرف ماده فلوئورسانس از شدت آن کاسته می‌شود. در این مورد طول موج تحریکی۴۸۵ نانومتر و طول موج نشر ۵۲۰ نانومتر است. وقتی نمونه دارای خواص آنتی‌اکسیدانی باشد از کاهش شدت فلوئورسانس ممانعت بعمل می‌آید. در این روش از ترولوکس به عنوان استاندارد استفاده و مقادیر معمولاً به عنوان هم‌ارز ترولوکس بیان می‌شود (Huang et al, 2005).

CUPRAC: یکی از روش های مکانیسم انتقال الکترون برای اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی است. روش مبتنی بر استفاده از عامل اکسیدان رنگدانه‌ای (کروموژنیک) مانند مانند یکی از مشتقات فنانترولین دارای مس دو ظرفیتی است. با احیای مس دو ظرفیتی به مس یک ظرفیتی تغییر رنگ اتفاق می‌افتد. میزان تغییر رنگ با غلظت آنتی اکسیدان همبستگی دارد. در طول موج ۴۵۰ نانومتر تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدان ترکیبات محلول در آب و محلول در چربی با این روش مقدور است (Huang et al, 2005).

۳. نتیجه‌گیری و جمع بندی

در این مقاله ما روش‌های معمول اسکتروفتومتری اندازه‌گیری توان آنتی اکسیدانی نمونه های گیاهی را مورد بررسی قرار دادیم. نتایج حاصل از روش‌های مختلف یکسان نیست و هر روشی دارای مزایا و معایب ویژه خود است. این روش‌ها از نظر مکانیسم آنتی اکسیدانی، نوع سوبسترا، آغازگران اکسیداسیونی و سهولت عمل متفاوت هستند. برای ارزیابی معتبر توان آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها انتخاب مناسب روش یا ترکیبی از روش‌ها ضروری است. یکی از معایب مهم این روش‌ها این است که آنها آزمایشگاهی هستند و توان ارزیابی *در زیوه* را ندارند. دیگر اینکه تکیه صرف به یکی از این روش‌ها شاید غیر علمی و غیرقابل اعتماد بوده باشد.

تشکر و قدردانی

نویسنده از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و قطب آنتی اکسیدان‌های گیاهی دانشگاه اصفهان کمال تشکر را دارد.

منابع

Al-Jaber, N.A., Awaad, A.S., Moses, J.E., 2011. Review on some antioxidant plants growing in arab world. Journal of Saudi Chemical Society. 15(4): 293-307.

Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E., 2016. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 64(5): 997-1027.

Arias, A., Feijoo, G., Moreira, M.T., 2022. Exploring the potential of antioxidants from fruits and vegetables and strategies for their recovery. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 77: 102974.

Boeing, J.S., Barizão, É.O., e Silva, B.C. et al. 2014. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. Chemistry Central Journal. 8 (48): 1-9.

Galano, A., 2015. Free radicals induced oxidative stress at a molecular level: the current status, challenges and perspectives of computational chemistry based protocols. Journal of the Mexican Chemical Society. 59(4): 231-262.

Ho, E., Karimi-Galougahi, K., Liu, C.C., Bhindi, R., Figtree, G.A., 2013. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. Redox Biology. 1(1): 483-91.

Huang, D., Boxin, O.U., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(6): 1841–1856.

Lu, J.M., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C., 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 14(4): 840-60.

Munteanu I.G., Apetrei, C., 2021. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A Review. International Journal of Molecular Sciences. 22(7): 3380.

Rubio, C.P., Hernández-Ruiz, J., Martinez-Subiela, S., et al. 2016. Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. BMC Veterinary Research 12(166): 1-7.

Principles of determining the antioxidant value of medicinal plants

[*]Nader Chaparzadeh

Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

Abstract

Oxidative stress is a pathological state in which active species of oxygen, nitrogen or sulfur are produced in cells more than the consumption capacity or more than the detoxification capacity. The molecules of the antioxidant system of cells play an important role in dealing with these conditions. Measuring the antioxidant activity or determining the level of antioxidant capacity of tissues, biological fluids, foods and pharmaceuticals in the diagnosis and treatment of conditions and diseases related to oxidative stress has great value in biochemistry (especially plant biochemistry). In today's societies, one of the most important comparison bases between foods is to pay attention to their antioxidant content. There are different methods of evaluating the antioxidant capacity of different natural and even synthetic compounds. Based on the type of reaction involved, these measurements can be divided into three categories: hydrogen atom transfer, single electron transfer, or targeted scavenging activities. In terms of the measuring device, these tests are divided into three main groups: spectrophotometry, chromatography and electrochemistry. The benefits of employing spectrophotometric assays are numerous and include their ease of use, speed of operation, low cost and good reproducibility. Therefore, it is used in most articles. This article tries to explain the chemical principles of several spectrophotometric methods and the author believes that understanding the chemical principles governing the methods will be of great help to researchers in estimating and analyzing data correctly.

Keywords: Antioxidant, Method, Oxidant, Spectrophotometry

[*] e-mail: nchapar@azaruniv.ac.ir

متاآنالیز، روشی ارزشمند در تحلیل داده‌های بیوشیمیایی و بالینی حاصل از تحقیقات گیاهان دارویی

امیرعباس مینایی فر[1]*، معصومه حسن بارانی[2]، مهدی باغیانی[3]

[1] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
[2] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، موسسه آموزشی عالی غیر انتفاعی آل طه
[3] دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده

متاآنالیز عبارت است از ترکیب داده‌های جمع‌آوری‌شده و مرور نتایج آن‌ها با بهره‌گیری از روش‌های آماری و جمع‌بندی مطالب به صورت منسجم و درنهایت اعلام این نتایج نهایی به‌صورت مدون و با استناد با آزمون و خطاهای رخ‌داده در تمامی نتایج قبلی به نحوی که قابل اعتماد و مورد تائید باشد. درحال حاضر مطالعات فراتحلیلی در کشور ایران بیشتر متمرکز بر داده‌های علوم انسانی مانند روانشناسی، جامعه‌شناسی و علوم تربیتی است و کمتر مورد استفاده علوم زیستی قرار گرفته است از این‌رو در این مقاله به معرفی توانمندی یکی از نرم افزار تخصصی متاآنالیز (CMA2) برای فراتحلیل داده‌های انباشته حاصل از مطالعات متعدد بالینی و بیوشیمیایی روی ترکیبات گیاهان دارویی پرداخته می‌شود.

واژگان کلیدی: متاآنالیز، CMA2، گیاهان دارویی

* e-mail: aaminaeifar@pnu.ac.ir

۱. مقدمه

متاآنالیز عبارت است از ترکیب داده‌های جمع‌آوری‌شده و مرور نتایج آن‌ها با بهره‌گیری از روش‌های آماری و جمع‌بندی مطالب به صورت منسجم و درنهایت اعلام این نتایج نهایی به‌صورت مدون و با استناد با آزمون و خطاهای رخ‌داده در تمامی نتایج قبلی به‌نحوی‌که قابل اعتماد و مورد تائید باشد. درواقع متاآنالیز برای بررسی اطلاعات در مقیاس‌های بزرگ است (Linde and Coulter, 2015). در متاآنالیز اطلاعات متعدد و نتایج به دست آمده آن‌ها از چندین آزمایش، مورد بررسی و بازبینی قرار می‌گیرد. در این صورت داده‌ها باهم ترکیب می‌شوند تا یک نتیجه کلی به دست آید. محققان قبلاً تصور می‌کردند که بامطالعه یک اثر می‌توان در خصوص واقعی بودن آن تصمیم‌گیری کرد. اما در آزمایش‌ها و مطالعات خود همواره عقیده شخصی را نیز اعمال می‌کردند. به همین دلیل نتایج به‌دست‌آمده معتبر نبوده و دیگر مهم نبود که مطالعه چقدر مفید و کارآمد بوده است (Shi et al., 2013). اکنون محققان تمامی آزمایش‌های صوت گرفته بر روی یک نمونه را نیز دوباره باهم بررسی و اطلاعات آن‌ها را باهم مقایسه می‌کنند. تمام نتایج غیر همسان و فاکتورهای موردنیاز در آزمایش‌ها را کنار هم قرار می‌دهند و یک نتیجه کلی و واقعی از این آزمایش‌ها به دست می‌آید. در این صورت اطلاعات جامع‌تری از آزمایش‌ها به دست می‌آید. نتایج به‌دست‌آمده در متا آنالیز به‌صورت یک تخمین معمولی مانند یک تحقیق انفرادی نیست، چراکه در آن از تمام آزمایش‌های استفاده‌شده است (Stang et al., 2017). تحقیقات و بررسی‌های انجام‌شده توسط متا آنالیز دارای وزن و اهمیت بیشتری می‌باشند، چراکه شامل تمامی تحقیقات و آزمایش‌های قبلی هستند در متاآنالیز موضوعات درجه اهمیت بالاتری دارند. خطاهای استاندارد نیز در متا آنالیز موردبررسی قرارمی گیرند. منظور از خطای استاندارد ایرادی است که در طول بررسی و تحقیق ممکن است به‌صورت مداوم و پشت سر هم تکرار شوند. درنتیجه آزمایش‌های مورد اعتماد تر خواهد بود. با توجه به این موارد دیگر بخش‌های تحقیق‌ها و بررسی‌ها با وزن یکسان موردبررسی قرار می‌گیرند (Jackson et al., 2017). درحال حاضر مطالعات فراتحلیلی در کشور ایران بیشتر متمرکز بر داده‌های علوم انسانی مانند روانشناسی، جامعه‌شناسی و علوم تربیتی است و کمتر مورد استفاده علوم زیستی و گیاهان دارویی قرار گرفته است از این‌رو در این مقاله به معرفی توانمندی یکی از نرم افزار تخصصی متاآنالیز (CMA2) برای فراتحلیل داده‌های انباشته حاصل از مطالعات متعدد بالینی و بیوشیمیایی روی ترکیبات گیاهان دارویی پرداخته می‌شود.

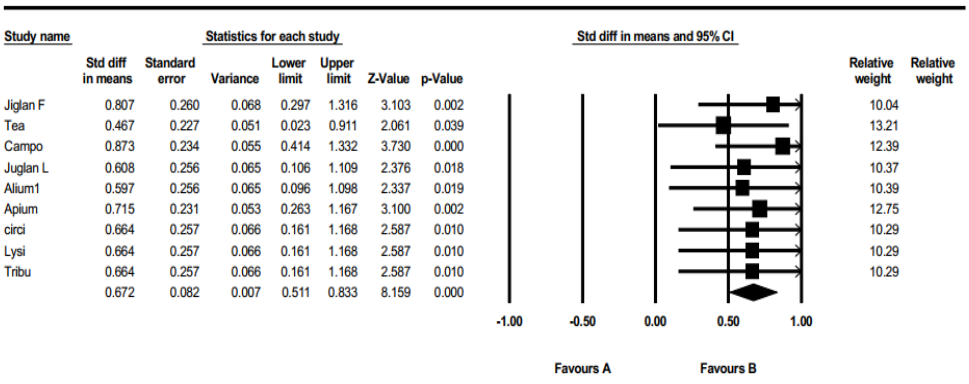
۲. مواد و روش

این مطالعه به‌صورت کتابخانه‌ای و اینترنتی در خصوص فرایند متاآنالیز انجام گرفته است، جستجو در سایت های مختلف داخلی نظیرMagiran و SID نشان داد که تاکنون هیچ مقاله و تحقیقی در زمینه تحلیل ترکیبات دارویی یا اثرات درمانی با استفاده از این روش آماری در ایران صورت نگرفته است و بیشتر در رشته‌هایی نظیر علوم اجتماعی، علوم تربیتی و روانشناسی این روش آماری مورد استفاده قرار گرفته است. بنابراین، هدف از این تحقیق معرفی روش آماری فراتحلیل (متاآنالیز) برای مرور تحقیقات مختلف با زمینه گیاهان دارویی می‌باشد، همچنین با بررسی نرم افزارهایمورد استفاده در این روش، در بین نرم‌افزارهای STATA، REWMAN و CMA2 به‌صورت موردی و با جنبه کاربردی به تحلیل نرم افزار CMA2 پرداخته می‌شود.

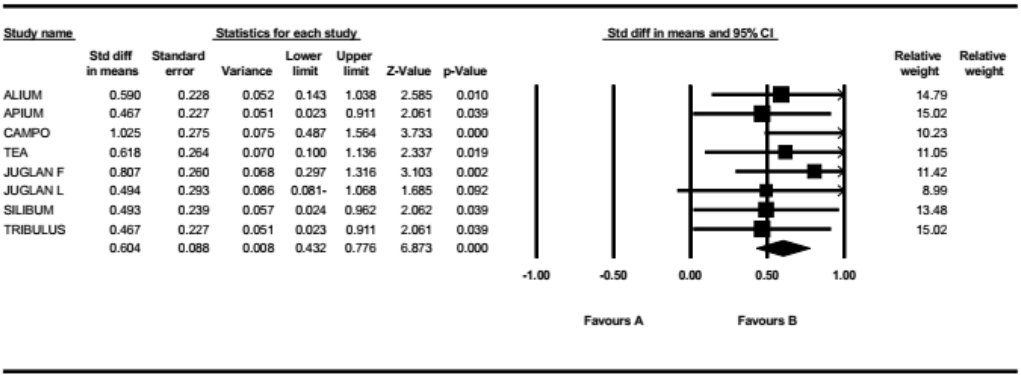
۳. نتایج

از امتیازات فراتحلیل در مقایسه با روش مرور نظام‌مند و مرور روایتی می‌توان به موارد زیر اشاره نمود (Izanlo and Habibi, 2011): ۱-روش فراتحلیل عینی‌تر از روش‌های مرور سنتی است و احتمال درگیر شدن پژوهشگر با پیش‌داوری‌های ذهنی در آن کمتر است. ۲- فراتحلیل خصوصیات مطالعات را با اصطلاحات کمی توصیف می‌کند، در فراتحلیل میانگین‌ها انحراف استانداردها و نتایج آزمون‌های آماری مشاهده و خلاصه می‌شوند و نه داده‌های خام هر آزمایش۳-پیشینه موضوع پژوهشی به شکل نظام‌مندی خلاصه بندی می‌شود. ۴- فراتحلیل، به ارتباط ویژگی‌های یک مطالعه با مطالعه دیگر به واسطه روش‌های آماری تأکید می‌کند. چون هدف فراتحلیلگر، تنها خلاصه نمودن مجموعه کاملی از متن تحقیق نیست، بلکه محقق سعی بر شناخت عوامل دخیل در اندازه اثر دارد. ۵- روش فراتحلیل به دلیل دقت و ظرافت آن و استفاده از روش‌های آماری نیرومند به ارتباطات خاص بین متغیرها دست پیدا می‌نماید و به آزمون فرضیاتی می‌پردازد که در مطالعات دیگر نمی‌توان آن‌ها را بررسی نمود.

هرچند در بررسی مقالات نتیجه‌ای در خصوص استفاده از متاآنالیز برای تحلیل داده‌های آماری حاصل از اثرات درمانی گیاهان دارویی یافت نشد اما دو پایان‌نامه در این خصوص یافت شد که به بررسی گیاهان دارویی مؤثر بر کاهش کلسترول و قند خون پرداخته‌اند (دهواری و همکاران، ۱۴۰۱؛ ملازهی و همکاران، ۱۴۰۱) در این دو پژوهش بر اساس مقالات داخلی که به بررسی اثر گیاهان دارویی مانند چای سبز، پوست میوه گردو، برگ گردو، خارخسک، موسیر و ... پرداخته شده (تصویر شماره ۱ و ۲)، پژوهشگران با استفاده از روش فراتحلیل و بر اساس داده‌های آماری مستخرج از مقالات داخلی مؤثرترین و کم اثرترین گیاه دارویی روی کاهش کلسترول و قند خون را که در مطالعات پراکنده مجزا تا سال ۱۴۰۰ بررسی و مشخص نموده‌اند.



شکل ۱. نمونه‌ای از نمودار جنگلی مربوط به متاآنالیز داده‌های گیاهان دارویی مؤثر بر قند خون در CMA2



شکل ۲. نمونه‌ای از نمودار جنگلی مربوط به متاآنالیز داده‌های گیاهان دارویی مؤثر بر کلسترول خون در CMA2

۴. بحث و نتیجه‌گیری

مانند هر روش علمی دیگر فراتحلیل نیز از یک سری نقاط قوت و نقاط ضعف برخوردار است. به عنوان نقاط قوت؛ ترکیب مطالعات مختلف، قوت یافته‌های تحقیق را افزایش می‌دهد. روشی عینی، معتبر، قابل تکرار و سنجش پذیر برای تلخیص نتایج تحقیقات است. فراتحلیل می‌تواند شکاف در ادبیات تحقیق را برجسته سازد و مبنایی را برای نسل بعدی تحقیقات در زمینه موضوع مورد مطالعه ایجاد کند. اگر در جایی یافته‌های متناقض وجود داشته باشد، فراتحلیل می‌تواند با تلخیص نتایج تحقیقات روندهای آن را آشکار سازد. توان بررسی اثرات مختلف آزمایش را دارد (Lorenc et al., 2016). در کنار نقاط قوت فراتحلیل که به تعدادی از آن‌ها در بالا اشاره شد، از موارد زیر می‌توان به عنوان نقاط ضعف متا آنالیز یاد کرد انجام فراتحلیل تلاش زیادی را می‌طلبد و تحلیل‌های ریاضی آن مستلزم کوشش فراوان محقق است. نتایج ماهیتاً نشان‌دهنده رابطه است نه علیت. کیفیت نتایج بستگی به کیفیت تحقیقات انتخابی دارد. محقق فراتحلیل در انتخاب تحقیقات به طور بالقوه با مسائل زیر سر و کار دارد: سوگیری انتخاب، مقایسه تحقیقات، تحقیقات منفی یا خنثی، وارد کردن تحقیقات با حداقل مسائل وکمی بودن تحلیل‌ها زمینه تشخیص‌های کیفی را از بین می‌برد (Denford et al., 2014). متا آنالیزها در علوم زیستی عمدتاً باید بر اهمیت بیولوژیک مطالعه تمرکز داشته باشند، نه بر روی مقادیر p و معنی‌داری آماری، زیرا تفسیر نتایج فقط از لحاظ معنی‌داری آماری می‌تواند گمراه‌کننده باشد. اصطلاح تفکر مؤثر برای اشاره به فلسفه تأکید بر تفسیر اثر کل از لحاظ اهمیت بیولوژیکی و نه اهمیت آماری آن است (Borenstein,2019). اما در نهایت به نظر می‌رسد با توجه به توانمندی این نوع تحلیل آماری جای استفاده از آن در تحقیقات گیاهان دارویی به شدت خالی است.

منابع

دهواری، م. مینایی فر، ا.، رضایی، س. و فرقانی، ا. ۱۴۰۱. فراتحلیل تأثیر برخی از گیاهان داروئی مؤثر درکاهش کلسترول. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه پیام نور رشته بیوشیمی.

ملازهی، ا.، مینایی فر، ا. رضایی، س. و ابرقویی، ح. ۱۴۰۱. فراتحلیل تأثیر برخی از گیاهان داروئی مؤثر درکاهش قند. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه پیام نور رشته بیوشیمی.

Borenstein, M. 2019. Common Mistakes in Meta-Analsysis and How to Avoid Them. New Jersey: Biostat, Inc. 391.

Denford, S., Taylor, R.S., Campbell, J.L., Greaves, C.J. 2014. Effective behavior change techniques in asthma self-care interventions: systematic review and meta-regression. Health Psychol. 33(7): 577-587.

Izanlo, B., Habibi, M. 2011. Application of meta-analysis in social and behavioral science: a review of advantages, disadvantages, and methodological issues. Journal of research in behavioural sciences. 9: 70-82.

Jackson, D., Law, M., Rücker, G., Schwarzer, G. 2017. The Hartung Knapp modification for random-effects meta-analysis: A useful refinement but are there any residual concerns? Statistics in Medicine. 36(25): 3923-3934.

Linde, K., Coulter, D. 2015. Systematic reviews and meta-analyses in CAM. Complementary Medicine. USA.

Lorenc, T., Felix, L., Petticrew, M., Melendez-Torres, G.J., Thomas, J., Thomas, S., Richardson, M. 2016. Meta-analysis, complexity, and heterogeneity: a qualitative interview study of researchers'methodological values and practices. Systematic Reviews. 5(1): 192.

Shi, Q., Warren, L., Gustavo Saposnik, MacDermid, C. 2013. Confusion assessment method: a systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy. Neuropsychiatr Dis Treat. 9: 1359–1370.

Stang, A., Deckert, M., Poole, C., Rothman, K.J. 2017. Statistical inference in abstracts of major medical and epidemiology journals 1975–2014: a systematic review. European Journal of Epidemiology. 32(1): 21-29.

Meta-analysis, a valuable method in the analysis of biochemical and clinical data from medicinal plant research

, Masoume Hassan Barani[2], Mahdi Baghiani[3]*Amir Abbas Minaeifar[1,2]

[1] Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
[2] Department of Biology, Ale-Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran
[3] Payame Noor University, Tehran, Iran

Abstract

Meta-analysis consists of combining the collected data and reviewing their results using statistical methods and summarizing the contents in a coherent manner and finally announcing these final results in a written form and citing the tests and errors that occurred in all the previous results in a way that is reliable and approved. be At present, meta-analytical studies in Iran are more focused on the data of human sciences such as psychology, sociology and educational sciences and are less used in biological sciences, therefore, in this article, we introduce the capabilities of one of the specialized meta-analysis software (CMA2) for The meta-analysis of accumulated data obtained from numerous clinical and biochemical studies on the compounds of medicinal plants is discussed.

Keywords: Meta-analysis, CMA2, Medicinal Plants

*e-mail: aaminaeifar@pnu.ac.ir

متابولیت‌های ثانویه، خواص دارویی و استفاده سنتی از گونه‌های مختلف سرده *Epilobium* L. از خانواده گل‌مغربی

فائزه شعبانی و رضا شیخ اکبری مهر*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران

چکیده

سرده *Epilobium* L. (بیدعلفی) متعلق به خانواده گیاهی گل‌مغربی می‌باشد. گونه‌های *Epilobium* سرشار از مواد شیمیایی فعال گیاهی مختلف هستند و در طب سنتی برای درمان چندین بیماری استفاده گسترده‌ای داشته‌اند و به‌عنوان یک گونه خوراکی و تزئینی نیز استفاده می‌شده است. هدف از این بررسی، تجزیه و تحلیل خواص دارویی *Epilobium* spp. است، با در نظر گرفتن اینکه آیا اثرات آن‌ها (به‌عنوان مثال، ضدالتهاب، آنتی‌اکسیدان، ضدتومور، ضدمیکروبی، ضددرد و ضدآندروژن) می‌تواند به‌طور منطقی استفاده از *Epilobium* را به‌عنوان درمان بسیاری از بیماری ها توجیه کند. مطالعات فیتوشیمیایی روی *Epilobium* منجر به شناسایی ترکیباتی مانند پلی‌فنول ها، لیگنان‌ها، استروئیدها، تری‌ترپنوئیدها، اسیدهای‌چرب و اسانس‌ها شده است. پلی‌فنول‌ها فراوان ترین ترکیبات ثانویه در این گیاهان بوده و به‌شکل فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و تانن های قابل هیدرولیز (الاژیتانین) وجود دارند.گونه های *Epilobium* پتانسیل درمانی بالایی را نشان دادند و ترکیبات بیوشیمیایی زیست‌فعال آن‌ها دارای خواص دارویی می‌باشند.

واژگان کلیدی: اتنوبوتانی، متابولیت ثانویه، اپی‌لوبیوم ، ضد التهاب، ضدتکثیر

* ایمیل نویسنده مسئول:
r.sheikhakbari@qom.ac.ir

۱.مقدمه

۱.۱. مشخصات گیاه شناسی و تاکسونومی

خانواده گل‌مغربی در دنیا شامل ۲۲ جنس و حدود ۶۶۰ گونه، متعلق به راسته Myrtales می‌باشد (Simpson, 2019). این خانواده در ایران با ۴ جنس و ۲۱ گونه معرفی شده است. جنس اپی‌لوبیوم در دنیا دارای بیش از ۲۰۰ گونه (Battinelli et al., 2001) و در ایران شامل ۱۸ گونه می‌باشد (Sheikh Akbari & Azizian, 2006). اپی‌لوبیوم گیاهانی علفی، چندساله با گل‌های منظم تا کمی نامنظم، کوچک یا در اندازه متوسط، منفرد و محوری و یا به صورت گل‌آذین خوشه‌ای می‌باشند. کاسبرگ‌ها ۴عدد. گلبرگ‌ها ۴عدد، به رنگ ارغوانی، صورتی و به‌ندرت سفید. پرچم‌ها ۸ عدد. مادگی قائم و میوه کپسول می‌باشد (Azizian, 2005).

۲.۱. استفاده سنتی (اتنوبوتانی)

گیاه علف آتش (*Epilobium angustifolium* L.) در چین برای درمان آسیب های تروماتیک، کاهش التهاب و اختلالات قاعدگی استفاده می‌شود. در اروپا، فرآورده‌ها یا عصاره‌های حاوی *E. angustifolium* برای درمان بیماری‌های پروستات محبوب هستند. تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که *E. angustifolium* اثرات درمانی در مراحل اولیه هایپرپلازی خوش‌خیم پروستات (BPH)، التهاب مجرای ادرار و پروستات و همچنین مشکلات دفع ادرار نشان می‌دهد (Deng et al., 2019). گیاه‌شناس اتریشی ماریا تربن استفاده از دمنوش اپی‌لوبیوم به‌ویژه *Epilobium parviflorum* Schreb. را در درمان هیپرپلازی خوش‌خیم پروستات، پروستاتیت، و همچنین بیماری‌های مثانه و کلیه توصیه می کند (Granica et al., 2014). استفاده از *Epilobium angustifolium* و *Epilobium montanum* Schreb. و *Epilobium parviflorum* در طب عامیانه اتریش در درمان بیماری‌های پروستات، کلیه و مجاری ادراری نیزگزارش شده است (Vogl et al., 2013). نه تنها در اروپا، بلکه در آمریکای شمالی نیز استفاده سنتی از گونه‌های *Epilobium* در درمان بیماری‌های مرتبط با دستگاه ادراری به خوبی مستند شده‌است. مردم بومی و سرخپوستان آمریکای شمالی از گیاه *Epilobium canum* (Green) P.H.Raven به شکل جوشانده برای درمان کلیه، مثانه و سایر مشکلات مرتبط با دستگاه ادراری استفاده می کنند (Barrett and Gifford, 1933). دم‌کرده گیاه *Epilobium* به‌ویژه *Epilobium angustifolium* به دلیل خاصیت قابض توسط گیاهپزشکان آمریکایی در قرن نوزدهم و اوایل قرن بیستم به‌عنوان یک عامل بسیار موثر برای درمان بیماری های گوارشی مانند اسهال خونی و اسهال با علل مختلف و همچنین سایر اختلالات روده مرتبط با عفونت، تحریک و التهاب روده توصیه می‌شده است (King, 1856). به‌طور موضعی گونه‌های *Epilobium* در طب سنتی، برای درمان بیماری‌های پوستی و مخاطی و همچنین برای آسیب‌های بدن استفاده می‌شود. برای سرخپوستان آمریکای شمالی این گیاه، دارویی برای زخم‌های عفونی، خونریزی‌های پس از زایمان و به‌عنوان شستشوی تورم‌ها بوده است (Bocek, 1984). در نپال، خمیر تهیه‌شده از *Epilobium brevifolium* D.Don دارویی سنتی برای درمان دردهای عضلانی می‌باشد (Gewali, 2008). برای خونریزی مقعدی، مردم چین چای را از برگ‌ها یا ریشه‌های پودر شده *Epilobium angustifolium* تهیه می کردند (Granica et al., 2014). پراکنش بالا و گلدهی انبوه در گونه *E. angustifolium* موجب شده تا این گونه از گیاهان مهم در تولید عسل در کانادا و روسیه (به‌ویژه سیبری) به حساب آید.

۲. مواد و روش‌ها

مقالات و متون علمی مربوط به استفاده‌های سنتی، ترکیبات شیمیایی و خواص دارویی گونه‌های مختلف *Epilobium* از منابع گوناگون و پایگاه‌های داده‌ای همچون Scopus، Google Scholar، SID، Elsevier و دیگر پایگاه‌های معتبر علمی، گردآوری و مطالعه شده و به صورت منسجم ارائه گردید.

۳.نتایج

۱.۳. ترکیبات شیمیایی

E. angustifolium منبع غنی از ترکیبات فنلی، به‌ویژه تانن‌های قابل هیدرولیز (الاژیتانین‌ها)، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک است. ترکیبات دیگری مانند لیگنان‌ها، استروئیدها، تری‌ترپنوئیدها، اسیدهای چرب و اسانس‌ها نیز در این گونه شناسایی‌شده‌اند (Adamczak et al., 2019). معمولاً، ترکیبات اصلی شامل فلاونوئیدها و گلیکوزیدهای آن‌ها، الاژیتانین‌ها، اسیدهای فنولیک، مشتقات بتا سیتوسترول، تری‌ترپن‌ها، ویتامین‌ها و اسیدهای چرب می‌باشد (Vitalone and Allkanjari, 2018). در ۱۰ سال گذشته تقریباً ۲۵۰ متابولیت مختلف و ۱۷۰ ماده در *E. angustifolium* شناسایی شده است (Yüksel et al., 2021). اگرچه بیشترین تمرکز تحقیقات علمی روی گونه علف آتش (*E. angustifolium*) بوده است، اما دیگر گونه‌های این جنس نیز مورد کاوش پژوهشگران قرار گرفته‌اند. مهمترین ترکیبات بیوشیمیایی زیست‌فعال موجود در اپی‌لوبیوم به شرح زیر می‌باشد:

۱.۱.۳. فلاونوئیدها

حدود ۵۰ فلاونوئید مختلف و مشتقات آن‌ها در عصاره‌های اپی‌لوبیوم شناسایی شده است. این ترکیبات شامل فلاونول آگلیکون‌ها از قبیل: کامفرول، کوئرستین و میریستین که حاوی یک بخش قندی گلوکورونیک‌اسید، رامنوز، گلوکز، آرابینوز یا گالاکتوز می‌باشند. Quercetin-3-O-glucuronide برخلاف myricetin-3-O-rhamnoside (myricitrin) که فلاونوئید اصلی سایر گونه های *Epilobium* است، غالب‌ترین و مشخص‌ترین فلاونوئید *E. angustifolium* است (Hevesi Tóth et al., 2009). اخیراً گلیکوکونژوگیت‌های فلاونول اسیله شده با اسیدهای هیدروکسی سینامیک نیز شناسایی‌شده‌اند (Adamczak et al., 2019).

۲.۱.۳. اسیدهای فنولیک

تنوع زیادی از این ترکیبات، از جمله ۳۹ ماده (به‌عنوان مثال: اسیدهای کافئیک، الاژیک، فرولیک، گالیک، پروتوکاتچوئیک اسیدها و ایزومرهای اسیدکافئوئیلکینیک) در *E. angustifolium* یافت‌شده‌است (Kaškonienė et al., 2015).

۳.۱.۳. تانن‌های قابل هیدرولیز

E. angustifolium حاوی سطح بالایی از الاژیتانن است که حدود ۱۵٪ از توده خشک گیاه را تشکیل می‌دهد. Oenothein B ترکیب زیست‌فعال اصلی و فراوان‌ترین الاژیتانن است که محتوای آن تا ۵۰ درصد از کل جرم الاژیتانین‌های الیگومری موجود در عصاره را تشکیل می‌دهد (Baert, 2015). فراهمی زیستی الاژیتانین‌ها به دلیل اندازه مولکولی بزرگ و

قطبیت نسبتاً بالای آن‌ها، بسیار ضعیف است. الاژیتانن‌ها تحت هیدرولیز نسبی به اسیدالاژیک در دستگاه گوارش تبدیل شده و سپس اسیدالاژیک آزاد و الاژیتانن باقی‌مانده توسط میکروبیوتای روده بزرگ به مشتقات دی بنزوپیران-۶ و اوروليتين‌ها متابولیزه می‌شوند. حضور urolithins و مشتقات مزدوج آن‌ها در غلظت‌های نسبتاً بالا در پلاسما، ادرار و مدفوع شناسایی شده‌است (Dreger et al., 2020). در نظر گرفته‌شده است که تنوع بین فردی، ناشی از تفاوت‌ها و ترکیب میکروبیوتای روده است. اخیراً، افزایش سن به‌عنوان عامل اصلی تعیین کننده متابولیت‌های urolithin با پیامدهای بالقوه برای سلامت انسان گزارش شده است (Cortés-Martín et al., 2018). اوروليتين‌هایی که خواص ضدتکثیری، ضدالتهابی و ضدسرطانی از خود نشان داده‌اند بسته به ساختارشان، فعالیت‌هایشان متفاوت است (Piwowarski et al., 2014).

٤.١.٣. استروئیدها، ترپنوئیدها و اسیدهای چرب

علاوه بر پلی‌فنول‌ها، اندام‌های هوایی اغلب گونه‌های اپی‌لوبیوم حاوی یک طیف چربی دوست غنی از استروئیدها، ترپنوئیدها و اسیدهای چرب است. وجود کامپسترول، کلسترول، استیگماسترول و همچنین β-سیتوسترول و مشتقات آن گزارش شده است (Adamczak et al., 2019). اسیدهای چرب (۴۱ ترکیب شناسایی شده) و همچنین تری‌ترپن‌ها (به عنوان مثال اسیدهای اولئانولیک، پومولیک و اورسولیک) اجزای اصلی بخش چربی دوست عصاره *E. angustifolium* هستند (Frolova et al., 2014).

٥.١.٣. روغن‌های ضروری (Essential oils)

نزدیک به ۵۰ ترکیب مختلف را در اسانس‌های *E. angustifolium* شناسایی کردند (Kaškonienė et al., 2015). آنتول و کاریوفیلن رایج‌ترین ترکیبات اسانس به دست‌آمده از گونه‌های اپی‌لوبیوم در حال رشد در لیتوانی بودند (Kaškonienė et al., 2016).

۲.۳ خواص دارویی

Epilobium یکی از گیاهان دارویی مهم است که به ویژه در درمان اختلالات دستگاه ادراری تناسلی، از جمله هیپرپلازی خوش‌خیم پروستات و پروستاتیت. اثرات درمانی عصاره این گیاه شامل فعالیت‌های ضدتکثیری، ضدالتهابی، تعدیل کننده ایمنی، آنتی‌اکسیدانی و همچنین ضدمیکروبی است (Adamczak et al., 2019). مهم‌ترین خواص دارویی موجود در اپی‌لوبیوم به شرح زیر می‌باشد:

۱.۲.۳. فعالیت ضدمیکروبی

E. montanum فعالیت ضدمیکروبی تقریبا یکسانی در برابر باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی دارد. این نتیجه نشان می‌دهد که *E. montanum* می‌تواند برای طیف وسیعی از درمان عفونت میکروبی استفاده شود (Canli et al., 2017).

در مطالعه‌ای بر روی ۹ گونه از سرده اپی‌لوبیوم در ایران از نظر فعالیت ضدباکتریایی، مشخص شد که بجز یک گونه، عصاره بخش‌های هوایی گونه‌های مذکور دارای فعالیت ضدمیکروبی قابل مقایسه با آنتی بیوتیک‌های رایج بر روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی می‌باشند (Sheikhakbari-Mehr and Malekzadeh, 2015).

در مطالعه‌ای، فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های اتانولی *Epilobium angustifolium* و *Epilobium hirsutum* L. و *Epilobium palustre* L. و *Epilobium tetragonum* L. و *Epilobium rosmarinifolium* در شرایط آزمایشگاهی بر روی باکتری‌های گرم‌مثبت

گرم‌منفی، مخمرها و قارچ‌ها مورد بررسی قرار گرفت. تمامی عصاره‌ها در محدوده غلظتی بین ۱۰ تا ۶۵۰ گرم در میلی‌لیتر عصاره خشک، فعالیت ضدمیکروبی قابل قبول نشان دادند. *E. angustifolium* و *E. rosmarinifolium* وسیع‌ترین طیف اثر مهارکننده باکتری‌ها، مخمرها

و قارچ‌ها را داشتند. عصاره‌ها فاقد سمیت بر روی آرتمیا سالینا در محدوده غلظت‌های ضدمیکروبی بودند، که نشان می‌دهد این عمل روی میکروارگانیسم‌ها انتخابی است (Battinelli et al., 2001).

۲.۲.۳. فعالیت ضدآندروژنیک

آنتی‌آندروژن‌ها، که با عنوان آنتاگونیست آندروژن یا مسدودکننده‌های تستوسترون نیز شناخته می‌شوند، دسته ای از داروها هستند که از اثرات زیستی آندروژن‌ها مانند تستوسترون و دی‌هیدروتستوسترون جلوگیری می‌کنند.

فعالیت مهاری انوتئین A و B در برابر ۵-آلفا ردوکتاز و آروماتاز در برخی مطالعات گزارش شده است (Lesuisse et al., 1996, Ducrey et al., 1997). در تحقیقات جدیدتر، فعالیت‌های ضدتکثیر و ضدآندروژن عصاره آبی *E. angustifolium* و انوتئین B در مدل‌های درشیشه (in vitro) و درزنده (in vivo) گزارش شده است (Piwowarski et al., 2017). پژوهش اخیر بر روی گونه‌های اپی‌لوبیوم نشان داد که عصاره‌های اتیل استاتی (EAE) و n-بوتانولی (BUE) از *E. angustifolium* اثر ضد هایپرپلازی خوش‌خیم پروستات (BPH) قوی در شرایط آزمایشگاهی توسط رده‌های سلولی BPH-1 و LNCap از خود نشان می‌هد (Deng et al., 2019).

۳.۲.۳. فعالیت ضدتکثیر و سیتوتوکسیک

نتایج فعالیت‌های پژوهشی جدید، تایید کرد که عصاره آبی و اتانولی *E. parviflorum* می‌تواند تکثیر سلول‌های سرطان کولورکتال انسانی را در شرایط آزمایشگاهی از بین ببرد. بنابراین *E. parviflorum* ممکن است پتانسیل تبدیل شدن به یک عامل درمانی در برابر سرطان روده بزرگ را داشته باشد (Akbudak et al., 2020). اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوز عصاره اتانولی *E. angustifolium* با سنجش MTT و Comet مورد بررسی و تایید قرار گرفت (Ostrovska et al., 2017). مهار رشد و تکثیر برخی از رده های سلولی سرطان پستان در معرض عصاره *E. angustifolium* نیز گزارش شده است (Maruška et al., 2017).

۴.۲.۳. فعالیت آنتی‌اکسیدانی

استرس اکسیداتیو نقش مهمی در بسیاری از آسیب‌شناسی‌ها مانند پیری زودرس، بیماری آلزایمر (AD)، تصلب شرایین، بیماری پارکینسون، دیابت، به‌ویژه با ایجاد اکسیداسیون لیپید، آسیب DNA و اصلاح پروتئین ایفا می‌کند. نتایج تحقیقات اخیر در این زمینه، نشان می‌دهد که عصاره *E. angustifolium* دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی (کاهش فلز، مهار رادیکال‌های آزاد و ضدپراکسیداسیون لیپیدی)، آنتی‌کولینرژیک و ضدباکتری است (Yüksel et al., 2021). بیشترین فعالیت تعیین شده توسط

سنجش DPPH و FRAP برای برگ‌ها مشاهده شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قوی گونه *Epilobium* spp. به محتوای بالای الاژیتانن (Hevesi Tóth et al., 2009) و به‌ویژه به Oenothein B نسبت داده‌شد (Kiss et al., 2011, Kaškonienė et al., 2016). مهار پراکسیداسیون لیپیدی و فعالیت های ضدرادیکال (DPPH، ABTS) عصاره‌های اتانولی اخیراً تأیید شده است. در این بررسی‌ها، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک اجزای اصلی فراکسیون فعال عصاره *E. angustifolium* بودند (Dreger et al., 2020).

۵.۲.۳. فعالیت‌های ضدالتهابی و تعدیل‌کننده ایمنی

عصاره *E. angustifolium* فعالیت ضدالتهابی قوی نسبت به ادِم ناشی از کاراژینان در موش‌ها نشان داد (Juan et al., 1988). علاوه بر این، myricetin-3-O-glucuronide جدا شده از برگ‌های این گیاه، بیش از ده برابر موثرتر از داروی ضدالتهابی غیراستروئیدی ایندومتاسین بود (Kiss et al., 2011). فعال شدن سلول‌های فاگوسیتی و تعدیل عملکرد ایمنی توسط عصاره *E. angustifolium* و انوتئین B جدا شده نیز گزارش شده است (Ramstead et al., 2015).

٦.۲.۳. سایر خواص

فعالیت ضددردی تنتور *E. angustifolium* توسط تست صفحه داغ و انقباض در موش تعیین شد (Tita et al., 2001). علاوه بر این، خواص محافظت از نور و ضدپیری عصاره *E. angustifolium* در فیبروبلاست‌های ناشی از استرس انسانی در مدل‌های in vitro و in vivo آشکار شده است (Ruszová et al., 2013).

گیاه *Epilobium hirsutum* L. سمی است و سبب تشنج صرعی می‌شود. شیره گیاه برای درمان زگیل‌ها بکار می‌رود. برگ‌های آن فعالیت خوبی علیه استافیلوک زرد دارد. گیاه مانند طلسم بر علیه روح وروان و حیوانات سمی بکار می‌رود (Kotb, 1985)

٤. بحث و نتیجه‌گیری

علاوه بر جنس اپی‌لوبیوم در خانواده گل‌مغربی، جنس های دیگر این خانواده نیز دارای خواص درمانی بسیاری می‌باشند. بعنوان مثال جنس *Oenothera* از خانواده گل‌مغربی، دارای اثرات درمانی معادل جنس اپی‌لوبیوم است. از جمله مهمترین اثرات درمانی مشابه مربوط به گیاه *Oenothera biennis* L. است که می‌توان به ضدالتهاب، ضدسرطان و آرام‌بخش بودن اشاره کرد (صالحی سورمقی، ۱۳۸۷-۱۳۸۹). البته خواص دارویی جنس *Oenothera* بسیار متنوع می‌باشد: ریشه‌ها یا اندام‌های هوایی گیاه *Oenothera biennis* را با عسل جوشانیده و از آن شربت مسکن سرفه تهیه می‌کنند. روغن دانه آن حاوی اسیدهای چربی است که برای سلامت پوست مفید است و گامالینولنیک‌اسید (gammalinolenic acid) موجود در آن سبب کاهش علائم دردناک قبل از قاعدگی و اگزمای ناشی از آلرژی می‌شود و فشار خون را کاهش می‌دهد (Bremness, 1994).

از جنس *Ludwigia* متعلق به خانواده گل‌مغربی، گونه *Ludwigia perennis* L. است که همانند جنس اپی‌لوبیوم دارای پتانسیل ضدمیکروبی است (Gobalakrishnan et al., 2020). همچنین گونه *Ludwigia abyssinica* A.Rich منبع بالقوه‌ای از عوامل ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی طبیعی است و می‌تواند برای درمان عفونت‌های میکروبی و پیشگیری از بیماری‌های مختلف

مرتبط با استرس اکسیداتیو، مانند سرطان و سایر بیماری‌های دژنراتیو انسانی موثر باشد (Oyedeji et al., 2014). از دیگر خواص درمانی جنس *Ludwigia* به این موارد می‌توان اشاره نمود: گونه *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) P.H. Raven به‌طور سنتی برای درمان ادم، نفریت، اسهال خونی، اسهال، بیماری‌های عصبی، سردرد، فشارخون بالا و غدد متورم استفاده می‌شود (Yakob et al., 2012).

از جنس *Lopezia* از خانواده گل‌مغربی، گونه *Lopezia racemosa* Cav. مشابه جنس اپی‌لوبیوم، فعالیت‌های ضدالتهابی و سیتوتوکسیک نشان داده است (Moreno-Anzúrez et al., 2017).

خواص دارویی عصاره‌های اپی‌لوبیوم، به اثر سینرژیک پلی‌فنول‌ها و وجود فراوان‌ترین ترکیب موجود در آن‌ها (Oenothein B) نسبت داده شده است. این ماده فعالیت‌های دارویی مختلفی دارد از جمله: ضدآندروژنی، ضدتکثیر، ضدسرطانی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و خواص تعدیل‌کننده سیستم ایمنی. علاوه بر این، اپی‌لوبیوم فعالیت‌های ضدمیکروبی ، ضددرد و همچنین محافظت از نور و ضدپیری را نشان می‌دهد (Adamczak et al., 2019). اسیدهای فنولیک و مشتقات آن‌ها یکی از گروه‌های غالب فنولیک موجود در *E. angustifolium* هستند و عوامل مهمی در آنتی‌اکسیدان و پتانسیل درمانی علیه هایپرپلازی خوش‌خیم پروستات (BPH) این گونه می‌باشند (Deng et al., 2019) *Epilobium angustifolium* با فعالیت بالای اتصال به DNA و ترکیب شیمیایی غنی می‌تواند یک پیش‌داروی ضدسرطان، ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی بالقوه عالی باشد (Sayik et al., 2017). این گیاه حاوی گلوکز، گالاکتوز، مانوز، زایلوز، گلوکورونیک اسید به صورت کربوهیدرات به شکل گلیکوزید است. بیشتر آن‌ها ممکن است به فلاونوئیدها مرتبط باشند. نمونه‌های هیدرولیز هم کربوهیدرات‌های آزاد و هم باقی مانده‌های گلیکوزید فلاونوئید را نشان دادند. این شرایط گیاه را حلقوی‌تر می‌کند و شکل حلقوی‌تر گیاه را از نظر ضدسرطان و سایر فعالیت‌های زیستی مانند خواص اتصال به DNA، ضدمیکروبی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی غنی می‌کند (Martins et al., 2015). ترکیبات بیوشیمیایی زیست‌فعال با آنتی‌اکسیدان بالا می‌توانند به‌عنوان نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی و آرایشی استفاده شوند تا از تخریب ناشی از اشعه ماوراءبنفش، فساد میکروبی و زوال درطول نگهداری جلوگیری کنند (Sayik et al., 2017). ترکیبات فنلی در میان مواد موجود در محتوای گیاه نقش مهمی در افزایش ماندگاری مواد غذایی دارند زیرا پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش می‌دهند (Yüksel et al., 2021). بنابراین مواد فعال موجود در گیاهان می توانند نقش مهمی در بازسازی اپیدرم و لایه‌های زیرین داشته باشند. اجزای مهمتری که چنین فعالیتی را نشان می‌دهند شامل اسیدهای فنولیک می باشد. نتایج به‌دست‌آمده می‌تواند نشان‌دهنده امکان استفاده از *E. angustifolium* به‌عنوان یک ماده، در لوازم آرایشی و دارویی اعمال شده روی پوست، به دلیل فعالیت ضدپیری و ضدالتهابی آن باشد (Nowak et al., 2021).

منابع

صالحی سورمقی، م. ح. ۱۳۸۷-۱۳۸۹. گیاهان دارویی و گیاه درمانی .انتشارات دنیای تغذیه (دوره سه جلدی)، تهران.

Adamczak, A., Dreger, M., Seidler-Łożykowska, K., Wielgus, K. 2019. Fireweed (L.): botany, phytochemistry and traditional uses. A review. Herba Polonica. 65(3): 51-63.

Akbudak, M.A., Sut, T., Eruygur, N., Akinci, E. 2020. Antiproliferative Effect of *Epilobium parviflorum* Extracts on Colorectal Cancer Cell Line HT-29. Rom Biotechnol Lett. 26(6): 3120-3128.

Azizian, D. 2005. Flora of Iran, Family Onagraceae. Institute of forest and rangeland research Publications. 56 pp.

Baert, N., Karonen, M., Salminen, J.P. 2015. Isolation, characterisation and quantification of the main oligomeric macrocyclic ellagitannins in *Epilobium angustifolium* by ultra-high-performance chromatography with diode array detection and electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1419 (2015): 26-36.

Barrett, S.A., Gifford, E.W., 1933. Indian life of the yosemite region: Miwok material culture. Bulletin of Milwaukee Public Museum 2(4): 1- 377.

Battinelli, L., Tita, B., Evandri, M.G., Mazzanti, G. 2001. Antimicrobial activity of *Epilobium* spp. extracts. Il Farmaco. 56(5-7): 345-348.

Bocek, B. R. 1984. Ethnobotany of costanoan Indians, California, based on collections by John P. Harrington. Economic Botany. 38(2): 240-255.

Bremness, L. 1994. Herbs. Dorling Kindersley Ltd.

Canli, K., Yetgin, A., Akata, I., Altuner, E.M. 2017. Antimicrobial activity and chemical composition screening of *Epilobium montanum* root. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 51(3): 239-243.

Cortés-Martín, A., García-Villalba, R., González-Sarrías, A., Romo-Vaquero, M., Loria-Kohen, V., Ramírez-de-Molina, A., Tomás-Barberán, F.A., Selma, M.V., Espín, J.C. 2018. The gut microbiota urolithin metabotypes revisited: the human metabolism of ellagic acid is mainly determined by aging. Food & Function. 9(8): 4100-4106.

Deng, L., Zong, W., Tao, X., Liu, S., Feng, Z., Lin, Y., Liao, Z., Chen, M. 2019. Evaluation of the therapeutic effect against benign prostatic hyperplasia and the active constituents from *Epilobium angustifolium L.* Journal of ethnopharmacology. 232: 1–10.

Dreger, M., Adamczak, A., Seidler-Lozykowska, K., Wielgus, K. 2020. Pharmacological properties of fireweed (*Epilobium angustifolium L.*) and bioavailability of ellagitannins. A review. Herba Polonica. 66(1): 52-64.

Ducrey, B., Marston, A., Göhring, S., Hartmann, R.W., Hostettmann, K. 1997. Inhibition of 5α-reductase and aromatase by the ellagitannins oenothein A and oenothein B from *Epilobium* species. Planta medica. 63(02): 111-114.

Frolova, T.S., Sal'nikova, O.I., Dudareva, T.A., Kukina, T.P., Sinitsyna, O.I. 2014. Isolation of pomolic acid from *Chamaenerion angustifolium* and the evaluation of its potential genotoxicity in bacterial test systems. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 40(1): 82-88.

Gewali, M.B., 2008. Aspects of Traditional Medicine in Nepal. University of Toyama Publications, Toyama, Japan. 175 pp.

Gobalakrishnan, R., Bhuvaneswari, R., Rajkumar, M. 2020. Natural antimicrobial and bioactive compounds from *Ludwigia parviflora Roxb.* Journal of Analytical & Pharmaceutical Research. 9(1): 37-42.

Granica, S., Piwowarski, J.P., Czerwińska, M.E., Kiss, A.K. 2014. Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (Onagraceae): A review. Journal of ethnopharmacology. 156 (2014): 316-346.

Hevesi Tóth, B., Blazics, B., and Kéry, Á. 2009. Polyphenol composition and antioxidant capacity of *Epilobium* species. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 49(1): 26-31.

Juan, H., Sametz, W., Hiermann, A. 1988. Anti-inflammatory effects of a substance extracted from *Epilobium angustifolium*. Agents and Actions. 23(1): 106-107.

Kaškonienė, V., Maruška, A., Akuņeca, I., Stankevičius, M., Ragažinskienė, O., Bartkuvienė, V., Kornyšova, O., Briedis, V., Ugenskienė, R. 2016. Screening of antioxidant activity and volatile compounds composition of *Chamerion angustifolium (L.)* Holub ecotypes grown in Lithuania. Natural Product Research. 30(12): 1373-1381.

Kaškonienė, V., Stankevičius, M., Drevinskas, T., Akuneca, I., Kaškonas, P., Bimbiraitė-Survilienė, K., Maruška, A., Ragažinskienė, O., Kornyšova, O., Briedis, V., Ugenskienė, R. 2015. Evaluation of phytochemical composition of fresh and dried raw material of introduced *Chamerion angustifolium L*. using chromatographic, spectrophotometric and chemometric techniques. Phytochemistry. 115 (2015): 184-193.

King, J., 1856. American Eclectic Dispensatory. Moore, Wilstach, & Keys Publications: Cincinnati, US. 1391 pp.

Kiss, A.K., Bazylko, A., Filipek, A., Granica, S., Jaszewska, E., Kiarszys, U., kosmider, A., Piwowarski, J. 2011. Oenothein B's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant activity of *Epilobium* sp. Phytomedicine.;18(7): 557-560.

Kotb, F.T. 1985. Medicinal plants in Libya. Arab Encyclopedia House.

Lesuisse, D., Berjonneau, J., Ciot, C., Devaux, P., Doucet, B., Gourvest, J.F., Khemis, B., Lang, C., Legrand, R., Lowinski, M., Maquin, P. 1996. Determination of oenothein B as the active 5-α-reductase-inhibiting principle of the folk medicine *Epilobium parviflorum*. Journal of Natural Products. 59(5): 490-492.

Martins, P., Jesus, J., Santos, S., Raposo, L.R., Roma-Rodrigues, C., Baptista, P.V., Fernandes, A.R. 2015. Heterocyclic anticancer compounds: recent advances and the paradigm shift towards the use of nanomedicine's tool box. Molecules. 20(9): 16852-16891.

Maruška, A., Ugenskienė, R., Raulinaitytė, D., Juozaitytė, E., Kaškonienė, V., Drevinskas, T., Stelmakienė, A., Akuneca, I., Makaravičius, T., Tiso, N., Bartkuvienė, V. 2017. Analysis of antiproliferative effect *of Chamerion angustifolium* water extract and its fractions on several breast cancer cell lines. Advances in Medical Sciences. 62(1): 158-164.

Moreno-Anzúrez, N.E., Marquina, S., Alvarez, L., Zamilpa, A., Castillo-España, P., Perea-Arango, I., Torres, P.N., Herrera-Ruiz, M., Díaz García, E.R., García, J.T., Arellano-García, J. 2017. A cytotoxic and anti-inflammatory campesterol derivative from genetically transformed hairy roots of *Lopezia racemosa Cav.* (Onagraceae). Molecules. 22(1): 1-12.

Nowak, A., Zagórska-Dziok, M., Ossowicz-Rupniewska, P., Makuch, E., Duchnik, W., Kucharski, Ł., Adamiak-Giera, U., Prowans, P., Czapla, N., Bargiel, P., Petriczko, J. 2021. *Epilobium angustifolium L*. Extracts as valuable ingredients in cosmetic and dermatological products. Molecules. 26(11): 3456.

Ostrovska, H., Oleshchuk, O., Vannini, S., Cataldi, S., Albi, E., Codini, M., Moulas, A., Marchyshyn, S., Beccari, T., Ceccarini, M.R. 2017. *Epilobium angustifolium L.*: A medicinal plant with therapeutic properties. The EuroBiotech Journal. 1(2): 126-130.

Oyedeji, O., Taiwo, F.O., Ayinde, F.O., Ajayi, O.S., Oziegbe, M., Kelani, M.T., Adewole, A.H. 2014. In vitro antimicrobial and antioxidant analysis of gallic acid from the leaves of *Ludwigia abyssinica* A. Rich. European Journal of Medicinal Plants. 4(9): 1098-1112.

Piwowarski, J.P., Bobrowska-Korczak, B., Stanisławska, I., Bielecki, W., Wrzesien, R., Granica, S., Krupa, K., Kiss, A.K. 2017. Evaluation of the effect of *Epilobium angustifolium* aqueous extract on LNCaP cell proliferation in in vitro and in vivo models. Planta Medica. 83(14/15): 1159-1168.

Piwowarski, J.P., Granica, S., Zwierzyńska, M., Stefańska, J., Schopohl, P., Melzig, M.F., Kiss, A.K. 2014. Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials. Journal of ethnopharmacology. 155(1): 801-809.

Ramstead, A.G., Schepetkin, I.A., Todd, K., Loeffelholz, J., Berardinelli, J.G., Quinn, M.T., Jutila, M.A. 2015. Aging influences the response of T cells to stimulation by the ellagitannin, oenothein B. International immunopharmacology. 26(2): 367-377.

Ruszová, E., Cheel, J., Pávek, S., Moravcová, M., Hermannová, M., Matějková, I., Spilková, J., Velebný, V., Kubala, L. 2013. *Epilobium angustifolium* extract demonstrates multiple effects on dermal fibroblasts in vitro and skin photo-protection in vivo. Gen. Physiol. Biophys. 32(3): 347-359.

Sayik, A.Sayik, A., Yusufoglu, A.S., Leyla, A., Türker, G., Aydin, B., Arslan, L. 2017. DNA-binding, biological activities and chemical composition of wild growing *Epilobium angustifolium L*. Extracts from Canakkale, Turkey. Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry. 4(3): 811-840.

Sheikh Akbari, R., and Azizian, D. 2006. Seed Morphology and Seed Coat Sculpturing of *Epilobium* L. Species (Onagraceae Juss.) from Iran. Turkish Journal of Botany. 30: 435-440.

Sheikhakbari-Mehr, R. and Malekzadeh, P. 2015. Antibacterial activity of some *Epilobium* L. species aerial parts extract. Journal of Aquatic Ecology, 5(1): 62-68.

Simpson, M.G. 2019. Plant Systematics. 3d edition. Elsevier Inc., Academic Press Publications. USA: Burlington.

Tita, B., Abdel-Haq, H., Vitalone, A., Mazzanti, G., Saso, L. 2001. Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. Il Farmaco. 56(5-7): 341-343.

Vitalone, A., Allkanjari, O. 2018. *Epilobium* spp: pharmacology and phytochemistry. Phytotherapy Research. 32(7): 1229-1240.

Vogl, S., Picker, P., Mihaly-Bison, J., Fakhrudin, N., Atanasov, A.G., Heiss, E.H., Wawrosch, C., Reznicek, G., Dirsch,V.M., Saukel,J., Kopp,B. 2013. Ethnophar- macological invitrostudiesonAustria's folkmedicine-anunexploredlore in vitroanti-inflammatory activitiesof71Austriantraditionalherbaldrugs. Journal of Ethnopharmacology. 149(3): 750-771.

Yakob, H.K., Uyub, A.M., Sulaiman, S.F. 2012. Toxicological evaluation of 80% methanol extract of *Ludwigia octovalvis (Jacq.) PH Raven* leaves (Onagraceae) in BALB/c mice. Journal of Ethnopharmacology. 142(3): 663-668.

Yüksel, A.K., Dikici, E., Yüksel, M., Işık, M., Tozoğlu, F., Köksal, E. 2021. Phytochemical, phenolic profile, antioxidant, anticholinergic and antibacterial properties of *Epilobium angustifolium* (Onagraceae). Journal of Food Measurement and Characterization. 15(6): 4858-4867.

Secondary metabolites, medicinal and traditional use of the genus *Epilobium* (Onagraceae)

Faezeh Shabani and Reza Sheikhakbari-Mehr*

Department of Biology, Faculty of Science, University of Qom, Qom, Iran

Abstract

Epilobium L. belongs to the family Onagraceae, includes species rich in various active phytochemicals which have been widely used in traditional medicine for the treatment of several diseases and have also been used as an edible and ornamental species. This study is aimed to survey the medicinal properties of *Epilobium* spp., considering whether their effects (e.g., anti-inflammatory, antioxidant, antitumor, antimicrobial, analgesic, and antiandrogen) can rationally justify the use of *Epilobium* as a treatment for various disorders. Phytochemical studies on *Epilobium* have led to the identification of diverse compounds such as polyphenols, lignans, steroids, triterpenoids, fatty acids and essential oils. Polyphenols are the most abundant secondary metabolites in these plants and exist in the form of flavonoids, phenolic acids and hydrolyzable tannins (ellagitannins). *Epilobium* species revealed high therapeutic potential and their bioactive biochemical compounds have potential for medicinal uses.

:Keywords Anti-inflammatory, Anti-proliferative, *Epilobium*, Ethnobotany, Secondary metabolite

* Corresponding author email:
r.sheikhakbari@qom.ac.ir

مروری بر برخی از عوامل موثر بر تغییرات کمی و کیفی و اثرات درمانی اسانس مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.)

محمد اسماعیل پور[۱] *، عبدالکریم زارعی[۲]، عسکر غنی[۳]

[۱] گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم
[۳] گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم

چکیده

اصلی‌ترین اجزای اسانس مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.)، آلفا/بتا-توجون، ۸،۱-سینئول، کامفور، آلفا/بتا پینن، کامفن و غیره هستند. تغییر در اجزای تشکیل دهنده اسانس می‌تواند بر خواص دارویی و درمانی اسانس مریم‌گلی تأثیرگذار باشد. لذا بررسی عواملی که بر کمیت و همچنین کیفیت اسانس این گیاه اثر می‌گذارند برای بهره برداران از این گیاه حائز اهمیت است. بطور کلی تنش خشکی سبب افزایش مقدار اسانس در برگ‌های مریم‌گلی می‌شود که هم‌زمان می‌تواند به علت کاهش تولید بیوماس یا افزایش بیان ژن آنزیم‌های دخیل در مسیر سنتز اجزای اسانس یا هر دو باشد. هم‌چنین اجزای اسانس مریم‌گلی قویاً تحت تأثیر غلظت و نوع نمک ایجاد کننده تنش شوری قرار می‌گیرند بطوری‌که تیمارهای مختلف شوری و در غلظت‌های مختلف ممکن است اثرات افزایشی یا کاهشی بر درصد تشکیل دهنده هر یک از اجزای اسانس داشته باشند و یا بی تأثیر باشند. بطورکلی با روند رشد گیاه اجزای اسانس نیز دچار تغییر می شوند بطوری که از مرحله رویشی تا گلدهی کامل، درصد مونوترپن‌های اکسیژن‌دار و درصد سزکوئی‌ترپن‌های اکسیژن دار در اسانس کاهش یافته و درصد سزکوئی ترپن‌ها افزایش می‌یابد و درصد مونوترپن‌ها نیز تغییر قابل توجهی نمی کند. همچنین ویژگی‌های کمی و کیفی اسانس مریم‌گلی در ساعات شبانه روز نیز تغییر می کند بطوری‌که برای حصول به بیشترین عملکرد اسانس، بهترین زمان برداشت بین ساعت ۴ تا ۶ عصر بوده و ساعت ۴ تا ۶ صبح کمترین میزان اسانس در گیاه وجود دارد.

واژگان کلیدی: اجزای اسانس، بیوماس، تنش خشکی، تنش شوری، مونوترپن.

* ایمیل نویسنده مسئول
E-mail: esmailpour@jahromu.ac.ir; msp1362@yahoo.com.

۱. مقدمه

تغییر در اجزای تشکیل دهنده اسانس می‌تواند بر خواص دارویی و درمانی اسانس مریم‌گلی تأثیرگذار باشد. بعنوان مثال آنالیز شیمیایی اسانس مورد استفاده در رایحه درمانی بسیار مهم است چراکه بسته به اینکه کدام ترکیب، جزء اصلی اسانس را تشکیل بدهد، می‌تواند اثرات متفاوتی بر بیماران بستری شده در بیمارستان داشته باشد (Mot et al., 2022). همچنین با توجه به اینکه اسانس مریم‌گلی خاصیت آنتی‌باکتریال قوی دارد، هرکدام از اجزای اسانس ممکن است مکانیزم عمل متفاوتی در ممانعت از تکثیر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی داشته باشند. همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسانس مریم‌گلی تحت تأثیر اجزای اسانس این گیاه قرار می گیرد (Assaggaf et al., 2022). لذا بررسی عواملی که بر کمیت و کیفیت اسانس این گیاه اثر می‌گذارند برای بهره برداران دارویی حائز اهمیت است و می‌تواند بر میزان سودآوری پرورش دهندگان این گیاه نیز اثر گذار باشد. لذا هدف از پژوهش حاضر مروری ساختاری و مختصر بر برخی از پژوهش‌های انجام شده در این خصوص می باشد.

۲. مواد و روش‌ها

برای دسترسی به مقالات در زمینه عوامل موثر بر کمیت و کیفیت مریم‌گلی، در پایگاه های اطلاعاتی مختلف نظیر Elsevier، Springer، Wiley و PubMed و با کلمات کلیدی متنوع به جستجو و بررسی و تحلیل مقالات منتشرشده در بازه زمانی ۲۰۰۹ تا ۲۰۲۳ پرداخته شد که در ادامه و با توجه به محدودیت صفحه، به تعدادی از پژوهش‌ها اشاره می شود.

۳. نتایج

۱.۳. اثر تنش خشکی بر کمیت و کیفیت اسانس و بیان ژن مونوترپن سینتازها

بطور کلی تنش خشکی سبب افزایش مقدار اسانس در برگ‌های مریم‌گلی می شود. در این زمینه، Bettaieb et al. (2009) گزارش دادند در مقایسه با تیمار شاهد (آبیاری کامل)، میزان کلی اسانس در تنش ملایم ۴۵۰ و در تنش شدید ۲۵۰ درصد افزایش یافت. در پژوهش مذکور، ارتفاع، وزن خشک و وزن تر گیاهان تنش دیده بطور معنی داری کمتر از گیاهان شاهد بود. لذا افزایش اسانس می‌تواند به علت کاهش یافتن بیوماس گیاه بوده باشد و نه به علت افزایش واقعی در میزان و سرعت سنتز اسانس. با این حال، ممکن است تنش خشکی بر سرعت بیوسنتز اسانس نیز اثر بگذارد. برای بررسی بیشتر، در تحقیق دیگری که توسط Radwan et al. (2017) انجام شد، تنش ملایم خشکی بر مریم‌گلی بطور تدریجی و به گونه‌ای اعمال شد که بیوماس گیاهان تنش دیده در مقایسه با گیاه شاهد کاهش نیافتند. در این تحقیق میزان منوترپن کل از دو روز بعد از اعمال تنش به تدریج افزایش یافت و ۱۴ روز بعد از اعمال تنش حدود ۲۵۰ درصد نسبت به شاهد افزایش یافته بود. این افزایش اسانس را می توان به افزایش واقعی در مقدار و سرعت سنتز منوترپن‌ها نسبت داد. مقدار هر سه منوترپن مورد مطالعه یعنی سینئول، آلفا/بتا توجون و کامفور در گیاهان تنش دیده نسبت به شاهد افزایش یافته بودند. این محققان در ادامه، میزان بیان ژن سه آنزیم یعنی سینئول سینتاز، سابینن سینتاز و بورنیل دی فسفات سینتاز که آنزیم‌های کلیدی در بیوسنتز منوترپن‌های اصلی و غالب در اسانس یعنی به ترتیب ۸،۱-سینئول، آلفا/بتا توجون و کامفور بودند را در گیاهان تنش دیده و شاهد بررسی کردند. در گیاهان تنش دیده نسبت

به گیاهان شاهد، میزان بیان ژن بورنیل دی فسفات سینتاز و همچنین سابینن سینتاز افزایش و میزان بیان ژن سینئول سینتاز کاهش یافت. این پژوهش نشان داد که حداقل بخشی از افزایش مقدار منوترپن‌ها در پاسخ به تنش خشکی، به علت افزایش فعالانه‌ی بیان ژن های دخیل در سنتز منوترپن‌ها است. یکی از دلایل افزایش تولید منوترپن‌ها این است که در شرایط تنش خشکی که روزنه ها بسته شده و احیا کننده ای نظیر NADPH در چرخه کالوین مصرف نمی شود، گیاه برای ممانعت از انحراف الکترون ها در زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی و ممانعت از تولید رادیکال های آزاد اکسیژن که به شدت مخرب هستند، تولید ترکیبات حلقوی آروماتیک به شدت احیا شده نظیر واحدهای ایزوپرن که نهایتاً برخی از اجزای اسانس را می سازند را افزایش می‌دهند. با توجه به اینکه این ترکیبات فرار هستند، با متصاعد شدن این ترکیبات از گیاه، بخشی از انرژی مازاد فتوسنتزی نیز از این رهگذر پراکنده و دفع می‌شود (Radwan et al., 2017).

۲.۳. اثر تنش شوری بر کمیت و کیفیت اسانس مریم‌گلی

اثر تنش شوری ناشی از ترکیبات مختلف شامل NaCl، KCl، $MgSO_4$، $MgCl_2$، Na_2SO_4 و $CaCl_2$ در سطوح مختلف صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار بر اجزای اسانس مریم‌گلی توسط Kaluk et al. (2020) در شرایط گلخانه ای مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که در تمام تیمارها، تنش ملایم شوری یعنی ۱۰۰ میلی‌مولار، وزن تر و وزن خشک برگ را در مقایسه با تیمار شاهد (آب مقطر) افزایش داد اما غلظت های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار اثر منفی بر این صفات داشتند. با آنالیز اسانس توسط کروماتوگرافی گازی، ۲۲ ترکیب مختلف شناسایی شد که اصلی‌ترین ترکیبات، آلفا-پینن، کامفن، ۸،۱-سینئول، آلفا-توجون، بتا-توجون و کامفور بودند. درصد آلفا-پینن و کامفور در پاسخ به تمام ترکیبات شوری افزایش یافتند. درصد کامفن در تمام ترکیبات به جز $CaCl_2$ و درصد بتا-توجون تحت تمام تنش های شوری به جز تیمار $MgCl_2$ افزایش یافتند. تیمارهای NaCl و KCl درصد آلفا-توجون را کاهش دادند اما سایر تیمارها مقدار این ترکیب را افزایش دادند. در حالی‌که درصد ۸،۱-سینئول تحت تأثیر NaCl قرار نگرفت، تیمارهای $CaCl_2$ و $MgCl_2$ درصد این ترکیب را کاهش و سایر تنش های شوری درصد آن را افزایش دادند. با توجه به این نتایج می توان استنباط کرد که اجزای اسانس مریم‌گلی قویاً تحت تأثیر تیمارهای تنش شوری و غلظت هر کدام از نمک ها قرار می‌گیرند بطوری که تیمارهای مختلف شوری و در غلظت های مختلف ممکن است اثر افزایشی یا کاهشی بر درصد تشکیل دهنده یکی از اجزای اسانس داشته باشند و یا بی تأثیر باشند. این احتمال وجود دارد که گیاه در پاسخ به هر نوع تنش شوری، متابولیزم خود را به گونه‌ای تغییر می‌دهد که بتواند با آن شرایط سازگار و یا متحمل شود و در این رهگذر مسیرهای تولید اجزای مختلف اسانس بطور متفاوتی تحت تأثیر قرار می‌گیرند (Kaluk et al., 2020). لذا احتمال دارد با تغییر نوع تنش شوری و در غلظتی معین بتوان جزء خاصی را در اسانس مریم‌گلی با توجه به هدف مدنظر از مصرف اسانس، افزایش یا کاهش داد.

۳.۳. تغییرات کمی و کیفی اسانس مریم‌گلی و اثرات درمانی آن در مراحل مختلف رشد

بخش هوایی مریم‌گلی در سه مرحله‌ی رشد رویشی، شروع گلدهی و گلدهی کامل در منطقه ای واقع در شمال غربی مراکش جمع آوری شد (Assaggaf et al., 2022). بطورکلی در هر سه مرحله‌ی رشدی، مونوترپن‌های اکسیژن دار ترکیب

غالب در اسانس بودند و اصلی‌ترین اجزای اسانس نیز به ترتیب نفتالنون، کامفور، ۸،۱- سینئول، آلفا-توجون و آلفا-پینن بودند. با این حال تنوع بسیار مشهودی در اجزای اسانس در مراحل مختلف رشدی مشاهده شد بطوری که ۴۷ ترکیب فقط در مراحلی خاص از رشد گیاه شناسایی شدند در حالی که در مراحل دیگر وجود نداشتند. با روند رشد گیاه، درصد برخی از اجزای اسانس افزایش و برخی کاهش یافت. بعنوان مثال، میزان آلفا-توجون در مرحله رویشی ۴/۴ درصد بود و در مرحله شروع گلدهی به ۳/۳ و در گلدهی کامل به ۲/۹ درصد کاهش یافت. اما درصد ترانس کاریوفیلن که در مرحله رشد رویشی ۳/۶ درصد بود، در مرحله شروع گلدهی به ۸/۹ و در گلدهی کامل به ۹/۶ درصد افزایش یافت. بطور کلی از مرحله رویشی تا گلدهی کامل، مقدار مونوترپن‌های اکسیژن دار از ۶۱ به ۵۱ درصد کاهش یافتند اما درصد سزکوئی ترپن ها از ۱۶ به ۲۸ درصد افزایش یافتند و درصد مونوترپن ها نیز تغییر قابل توجهی نکردند (۱۲ و ۱۱ درصد) (Assaggaf et al., 2022).

اسانس مریم‌گلی مخصوصاً در مرحله‌ی گلدهی کامل اثرات آنتی‌باکتریال قوی بر شش گونه باکتری گرم مثبت و منفی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک شیمیایی (کلورامفنیکول) بعنوان شاهد داشت. با این حال میزان تکثیر هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه بطور متفاوتی تحت تأثیر هرکدام از اجزای اسانس قرار گرفتند که نشان می‌دهد هرکدام از اجزای اسانس ممکن است مکانیزم عمل متفاوتی در بازداری تکثیر باکتری‌ها داشته باشند یا مسیرهای بیوشیمیایی خاص در برخی باکتری‌ها تحت تأثیر برخی از اجزای اسانس قرار نمی گیرند. بر اساس آزمون DPPH اسانس مریم‌گلی در هر سه مرحله فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی داشتند و بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (IC_{50}=113.5 µg/mL) در مرحله گلدهی کامل مشاهده شد. تفاوت مشاهده شده در پتانسیل آنتی‌اکسیدانی اسانس ها در مراحل مختلف رشد احتمالاً ناشی از تغییرات در میزان تک تک اجزای اسانس در مراحل مختلف رشد است. برای ارزیابی فعالیت ضد دیابتی اسانس، میزان بازدارندگی فعالیت آنزیم‌های گوارشی آلفاآمیلاز، آلفاگلیکوزیداز و لیپاز مورد بررسی قرار گرفت. بطورکلی، اسانس استخراج شده از هر سه مرحله مخصوصاً در مرحله‌ی گلدهی کامل اثرات بازدارندگی بسیار زیاد و معنی داری بر فعالیت آنزیم‌های مذکور داشتند. همچنین اسانس در مرحله‌ی گلدهی کامل بیشترین اثر ضد التهابی (بازدارندگی فعالیت لیپوکسیژناز) داشت (Assaggaf et al., 2022).

٤.٣. تغییرات کمیت و کیفیت اسانس مریم‌گلی در طول شبانه روز

در مرحله گلدهی کامل، هر از دو ساعت و به مدت یک شبانه روز از بخش هوایی مریم‌گلی نمونه گیری شد (Hazrati et al., 2022). بطور کلی ۳۲ ترکیب در اسانس شناسایی شد و اصلی‌ترین ترکیب اسانس، سیس-توجون (۳۴ تا ۴۶ درصد)، ۸،۱-سینئول (۸ تا ۱۱ درصد)، کامفور (۹ تا ۱۴درصد) و ترانس توجون (۹ تا ۱۴ درصد) بودند. بیشترین مقدار اسانس (۱/۱۴ درصد) در ساعت ۴ تا ۶ عصر و کمترین مقدار (۰/۶ درصد) در ساعت ۴ تا ۶ صبح در گیاه وجود داشت. این نتایج نشان می‌دهد که میزان سنتز اسانس در طول روز نسبت به شب به دلیل شدت نور بالا و افزایش فعالیت های فتوسنتزی افزایش می‌یابد. بطور مثلاً میزان مانول به میزان ۸۰ درصد در طول یک شبانه روز دچار تغییر شد. زمانی که دما کاهش پیدا می کند یعنی در اواخر عصر، بیشترین میزان تجمع اسانس وجود داشت و لذا بهترین زمان برای برداشت است. احتمالاً در دمای خنک میزان تبخیر اجزای اسانس کاهش می‌یابد. همبستگی مثبت و معنی داری بین برخی از اجزای اسانس مثلاً بین ۸،۱- سینئول و کامفور (R= 0.52) و

بین کامفور و کامفن (R= 0.84) وجود داشت. همبستگی های مثبت نشان دهنده این است که احتمالاً این ترکیبات می توانند مسیرهای سنتز یکسانی داشته باشند یا تغییرات محیط بیرون اثر یکسانی بر مسیر بیوشیمیایی سنتز آنها دارد. در عین حال بین برخی از اجزای اسانس نیز همبستگی منفی و معنی داری مشاهده شد. این موضوع ممکن است نشان دهنده تبدیل شدن برخی از اجزای اسانس به یکدیگر در طول شبانه روز باشد (مثلاً تبدیل آلفا-پینن به بتا-پینن) و یا ممکن است تغییر در یک عامل محیطی در طول شبانه روز سبب تخریب یک جزء از اسانس و در عین حال تشدید سنتز یک جزء دیگر شده باشد (Hazrati et al., 2022).

۵.۳. تأثیر کیفیت (طول موج) نور بر اجزای اسانس مریم‌گلی

با تابش همزمان نور قرمز و آبی، میزان توجون در مریم‌گلی به مقدار قابل توجهی افزایش یافت و مقدار آن بیشتر از کامفور بود. در حالی‌که در شرایط تابش نور قرمز به تنهایی، میزان کامفور افزایش یافته و به بیش از سه برابر توجون رسید (Ivanitskikh and Tarakanov, 2014). با توجه به اینکه طول موج‌های مختلف نور خورشید از طلوع تا غروب خورشید تغییر می‌کنند (مثلاً اوایل بامداد میزان نور آبی بیشتر از نور قرمز است)، ممکن است یکی از دلایل تغییرات در اجزای اسانس در طول دوره روشنایی روز، تغییر در کیفیت نور نیز باشد. لذا احتمالاً با کشیدن تورهای سایه بان با رنگ متناسب بر روی مزرعه مریم‌گلی، می توان شدت و کیفیت نور دریافتی توسط گیاه مریم‌گلی و در نتیجه اجزای اسانس آن را در طول روز تغییر داد.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

شدت، مدت و نوع تنش محیطی و مراحل نموی اثرات متفاوتی بر اجزای اسانس و درصد هریک از آنها در مریم‌گلی دارند، لذا احتمالاً می توان با اعمال مدیریت شده‌ی تنش‌ها، پروفایل اجزای اسانس را با توجه به اینکه افزایش یا کاهش کدام جزء اسانس مدنظر بهره بردار است و با توجه به اهدافی که دنبال می شود تغییر داد یا از این طریق، اثرات درمانی اسانس را افزایش و عوارض آن را کاهش داد. بایستی توجه داشت علاوه بر عوامل اشاره شده، فصل و مکان برداشت، نوع رقم، تنش های زنده، دما، هورمون‌ها، عناصر معدنی، نانوذرات، سن برگ و غیره نیز بر کمیت و کیفیت اسانس مریم‌گلی تأثیرگذارند. لذا ممکن است اثر متقابل این عوامل، اثرات هم افزایی در افزایش یا کاهش هریک از اجزای اسانس داشته باشند که باتوجه به پیچیدگی‌های این موضوع، نیاز به تحقیقات بیشتری وجود دارد.

منابع

Assaggaf, H.M., Naceiri Mrabti, H., Rajab, B.S., Attar, A.A., Alyamani, R.A., Hamed, M., El Omari, N., El Menyiy, N., Hazzoumi, Z., Benali, T. and Al-Mijalli, S.H. 2022. Chemical analysis and investigation of biological effects of *Salvia officinalis* essential oils at three phenological stages. Molecules. 27(16): 1-16.

Bettaieb, I., Zakhama, N., Wannes, W.A., Kchouk, M.E. and Marzouk, B. 2009. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. Scientia horticulturae. 120(2): 271-275.

Hazrati, S., Beidaghi, P., Beyraghdar Kashkooli, A., Hosseini, S.J. and Nicola, S. 2022. Effect of harvesting time variations on essential oil yield and composition of Sage (*Salvia officinalis*). Horticulturae. 8(2): 1-16.

Ivanitskikh, A.S. and Tarakanov, I.G. 2014. Effect of light spectral quality on essential oil components in *Ocimum basilicum* and *Salvia officinalis* plants. 2nd International Symposium on Secondary Metabolites Chemistry, Biology and Biotechnology, Moscow, Russia.

Kulak, M., Gul, F. and Sekeroglu, N. 2020. Changes in growth parameter and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in response to various salt stresses. Industrial Crops and products. 145: 1-15.

Mot, M.D., Gavrilaş, S., Lupitu, A.I., Moisa, C., Chambre, D., Tit, D.M., Bogdan, M.A., Bodescu, A.M., Copolovici, L., Copolovici, D.M. and Bungau, S.G. 2022. *Salvia officinalis* L. Essential Oil: Characterization, Antioxidant Properties, and the Effects of Aromatherapy in Adult Patients. Antioxidants. 11(5): 1-15.

Radwan, A., Kleinwächter, M. and Selmar, D. 2017. Impact of drought stress on specialised metabolism: biosynthesis and the expression of monoterpene synthases in sage (*Salvia officinalis*). Phytochemistry. 141: 20-26.

A Summary on Factors Affecting Changes in Quantity and Quality and Pharmaceutical Effects of Sage (*Salvia officinalis* L.) Essential Oils

Mohammad Esmailpour [1*], Abdolkarim Zarei [2], Askar Ghani [3]

[1] Department of Plant Production and Genetic, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran
[2] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran

Abstract

Main constituents of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oils (EOs) are α/β-thujone, 1,8-cineole, camphor, α/β-pinene, camphene, etc. Changes in EOs constituents of sage may affect its pharmaceutical properties. Therefore, investigating on the factors affecting quantity and quality of sage EOs is important for the beneficiaries. Generally, drought stress increases sage EOs content. This may be due to reduction in biomass production and/or increase in gene expression of the enzymes involved in EOs constituent's synthesis. Besides, EOs constituents of sage strongly are affected by both of type and concentration of the salt so that different salt type and concentration may increase or decrease percentage of individual constituents or may have no effects on the others. Generally, EOs constituents vary with proceeding of plant growth stages in such a way that oxygenated monoterpenes and oxygenated sesquiterpenes were decreased and sesquiterpenes were increased in EOs while monoterpenes percentage did not change by progressing of plant growth from vegetative to full flowering stages. Quantity and quality of sage EOs are also changed through subsequent hours of a day and night. The best time for harvesting sage leaves is 4-6 pm due to accumulation of the highest amount of EOs and EOs is at its lowest amount at 4-6 am.

Keywords: Essential Oils Constituents, Biomass, Drought Stress, Salt Stress, Monoterpenes.

[*] e-mail for the corresponding author: esmailpour@jahromu.ac.ir ; msp1362@yahoo.com

مروری بر تاثیر ترکیبات بیوشیمیایی یونجه زرد (*Melilotus officinalis*) بر درمان برخی از بیماری‌ها

مدینه مردانی نیا[1] *، سارا مقصودیان نژاد[2]

[1] دانش آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری دانشگاه شهرکرد، دبیر علوم تجربی

[2] دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و مهندسی باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، دبیر علوم تجربی

چکیده

از گذشته تاکنون گیاهان بومی، به دلیل امکان تولید متابولیتهای ثانویه (ترپنوییدها، فنل‌ها و فلاونوییدها) از اصلی ترین منابع غذایی و دارویی برای زندگی انسان ها بوده و هستند. پلی فنول های گیاهی و فلاونوییدها به عنوان آنتی اکسیدان های قوی و طبیعی از مهمترین عوامل ایجاد محدودیت آسیب های اکسیداتیوی در بدن به حساب می آیندکه بوسیله غیرفعال کردن رادیکال های آزاد وقتی به لیپیدها و غذاهای حاوی لیپید اضافه می شوند ، می توانند عمر مفید آن ها را با تاخیر انداختن فرآیند پراکسیداسیون لیپید افزایش دهند و با جلوگیری از تخریب مواد غذایی ، نقش مهمی را در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری های شایع امروزی داشته باشند.گیاه یونجه زرد (*Melilotus officinalis*) حاوی فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی مختلفی است. با توجه به اینکه گیاه یونجه زرد در بیشتر نقاط ایران پراکنش دارد و دارای خواص دارویی بسیار زیادی است اما بسیار کم به آن پرداخته شده است. در این مقاله با مطالعه و مرور مقالات مختلف به بررسی تاثیر ترکیبات بیوشیمیایی یونجه زرد بر درمان برخی از بیماری‌ها پرداخته شده است.

واژگان کلیدی: آنتی اکسیدان، متابولیت ثانویه، یونجه زرد

E-mail: amardaniniya@gmail.com.

۱. مقدمه

در سالهای اخیر همزمان با رشد و توسعه روش های درمانی مکمل و جایگزین ،استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری، توجه مردم و جامعه پزشکی را به خود جلب کرده است. امروزه گیاهان دارویی به عنوان ذخایر و گنجینه های ژنتیکی می توانند یکی از بزرگترین منابع ثروت ملی برای هر کشوری باشند. گیاهان دارویی مختلفی وجود دارند که با آزمایشهای بالینی به اثربخشی آنها بر درمان بیماریهای مختلف پرداخته شده است. از جمله گیاهان بسیار مفید و کمتر شناخته شده، گیاه یونجه زرد با نام علمی(*Melilotus officinalis*)، از تیره نخود (Leguminosae) است. ماده اصلی تشکیل دهنده یونجه زرد در ماده خشک شامل مشتقات اسید سینامیک/کومارین است .مقدار کومارین در این ماده گیاهی بین (۰/۳ تا ۰/۹ درصد) است. دیگر مشتقات سینامیک اسید، دی هیدروکومارین (melilotin)، اسکوپولتین، امبلیفرون و اسیدهای: دی هیدرو کوماریک اسید (melilotic acid ۰/۱۷درصد)، کافئیک اسید(۰/۰۸۵ درصد)، فرولیک اسید(۰/۴۴ درصد)، -oکوماریک اسید(۰/۰۳ درصد)،-pکوماریک اسید(۰/۰۴ درصد) و مقادیر کمی ازاسیدسالیسیلیک است (دایموسکی،۲۰۱۷). استفاده از گیاه یونجه زرد در کشورهای مختلف سابقه ای طولانی دارد این گیاه مصرف های مختلف داروئی از گذشته داشته و هنوز هم شهرت درمانی خود را از دست نداده است.ازسرشاخه گلدار آن به عنوان آرام کننده ، ادرار آور و رفع ناراحتی های عادی سینه استفاده می شود. مصرف دم کرده آن به منظور رفع تحریکات عصبی بیخوابی کودکان و میگرن، بین مردم رواج دارد. در طب سنتی اکثرکشورهای باستان مثل مصر از دمنوش آن عنوان ضدالتهاب یا ضد انگل یا به صورت ضماد در دمان مفاصل ملتهب و التیام زخم استفاده می شد (برهانی و همکاران،۱۳۹۶). براساس مطالعات انجام شده بقراط از این گیاه برای درمان زخم های عفونی استفاده می کرد (دایموسکی ۲۰۱۴). علاوه براین مصارف دارویی در اروپا گیاه خشک شده را لابه لای لباسهای کتان و پارچه قرار می دادند تا از بیدزدگی پارچه جلوگیری کند (کروپسیما و همکاران،۲۰۱۳).

با شناسایی ترکیبات بیوشیمیایی و پی بردن به خواص این گیاه استفاده از آن به اشکال گوناگون دارویی شامل دمنوش، کرم ، قرص و... در کشورهای مختلف رواج پیدا کرده است. در این مقاله به بررسی اثر ترکیبات بیوشیمیایی گیاه یونجه زرد بر درمان برخی از بیماریها می پردازیم.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. اثرات M. officinalis بر پروفایل خونی موش های صحرایی دچار زیادی آهن(iron overload)

بیماری زیادی آهن (هموکروماتوزیس) بیماری که ممکن است جنبه ارثی داشته باشد و یا بر اثر شرایط اکتسابی به وجود آید. آهن اضافی ممکن است رادیکال های آزاد ایجاد کند که باعث آسیب سلول ها و مرگ آن ها شود. همچنین آهن اضافی ممکن است در اندام های حیاتی انباشته شده و به مرور باعث آسیب آن ها شود. بیمار مبتلا به تالاسمی بتا با شدت‌های متفاوتی از آنمی مواجه می شود. این کم خونی به دلیل همولیز مزمن و اریتروپوئیزیس بیهوده (ineffective erythropoiesis) است. طبق گزارش ارائه شده، درمان زیادی آهن با کمک یک عامل کلات کننده آهن نه تنها در شرایطی که بیمار دچار زیادی آهن است موثر می باشد بلکه این درمان در مورد اریتروپوئیزیس نیز مفید واقع شده است. گزارش شده است که فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی می توانند یون های فلزی را کلاته کرده و کمپلکس‌هایی تشکیل دهند.گیاه M. officinalis حاوی فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی مختلفی است و خاصیت آنتی اکسیدانی و کلاته کردن آهن دارد. به منظور تاثیر گیاه M. officinalis بر فاکتورهای خونی

موش هایی که دچار زیادی آهن بودند، پژوهشی توسط N.A. Sheikh و همکارانش در یکی از دانشکده های داروسازی هند صورت گرفت. بدین صورت که تعدادی موش صحرایی نر از نژاد اسپراگ داولی با تزریق آهن دکستران (۱۲/۵ میلی گرم/۱۰۰ گرم) به طور یکنواخت در یک دوره ۳۰ روزه را دارای القای اضافه بار آهن کردند. داده‌های به دست آمده پیشنهاد می‌کنند که گیاه M. officinalis ، سیستم هموپویتیک را که به دلیل زیادی آهن تغییر رفتار داده بود، بهبود می دهند. بیماران مبتلا به هموکروماتوز (hemochromatosis) یا بیماران دچار فرم های دیگری از شرایط ازدیاد آهن، مستعد ابتلا به عفونت به دلیل ناهنجاری ایمنی بودنداز قبل گزارش شده بود که عوامل کلاته کننده آهن مانند DFO منجر به ترمیم سیستم ایمنی در موش های صحرایی دچار زیادی آهن می شود. داده‌ها نشان می‌دهند که موش‌های صحرایی نسبت به موش‌های صحرایی NC، کاهش معنی داری در شمارش افتراقی میزان گلبول‌های سفید (WBC) و میزان کلی آن داشته اند. در موش های

تحت درمان با MFME و MFAE به دست آمده از گیاه M. officinalis در مقایسه با موش های DC ، در روزهای ۱۵ و ۳۰ درمان افزایش معنی داری در میزان کلی و همچنین افتراقی تعداد گلبول های سفید مشاهده شد. داده‌ها نشان می‌دهند که این بخش‌های گیاه M. officinalis سیستم ایمنی را که به دلیل زیادی آهن دچار تغییر شده بود را بهبود می‌بخشد. همچنین در موش های تحت درمان با MFME و MFAE به دست آمده از گیاه M. officinalis در مقایسه با موش های DC ، در روز پانزدهم و سی ام درمان، افزایش قابل توجهی در تعداد پلاکت وجود داشت. این نتایج نشان می‌دهند که این بخش‌های گیاه M. officinalis، باعث بهبود اختلال عملکرد پلاکتی در موش‌های دچارزیادی آهن می‌شود.

نتایج به دست آمده این پژوهش از MFME گیاه M. officinalis مشابه نتایج DFO بود که نشان می‌دهد MFME به دست آمده از M. officinalis در مقایسه با MFAE به دست آمده از M. officinalis تأثیر مفیدتری بر پروفایل خونی موش‌های دچار زیادی آهن دارد. این نتایج نشان می‌دهند که دوز بالاتر M. officinalis (300mg/kg) در مقایسه با دوز پایین‌تر ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، پتانسیل کلاته کردن آهن قابل‌توجهی دارد. داده های این تحقیق نشان می دهند که گیاه M. officinalis پتانسیل کلاته کردن آهن بهتری را در روز سی ام درمان نسبت به روز پانزدهم درمان ارایه می دهد.

۲.۲. اثر محافظت کبدی *Melilotus Officinalis* در برابر آسیب کبدی ناشی از پاراستامول و تتراکلرید کربن در موش های صحرایی

بروز بیماری های کبدی مشکلی جهانی است. برخی اوقات داروهای مرسوم مورد استفاده در درمان بیماری های کبدی ناکافی بوده و عوارض جانبی جدی به همراه دارند. سلول های کبدی عملکردهای متابولیکی را انجام می دهند و کبد دارای آنزیم های نشانگر زیادی است. در بدن، میزان غلظت بالاتری از آنزیم های ALT و AST در سیتوپلاسم یافت می شود در حالی که AST در میتوکندری یافت می شود. در صورت بروز آسیب کبدی، انتقالات سلولی در سلول های کبدی مختل می شود و به دلیل خروج غشای پلاسمایی، غلظت آنزیم ها در سرم زیاد می شود که این امر منجر به پخش آنزیم ها به داخل خون می شود. افزایش سطح آنزیم های نشانگر در خون حاکی از نشت سلولی به دلیل از دست دادن یکپارچگی عملکردی غشای سلولی در کبد است. استرس اکسیداتیو یکی از علل مهم آسیب های کبدی است که ناشی از عوامل هپاتوتوکسیک و رادیکال‌های آزاد به‌ویژه گونه‌های فعال اکسیژن می باشد که در آسیب بافت کبدی مشارکت دارند. در مطالعات مختلف، فعالیت آنتی اکسیدانی به عنوان مکانیزمی برای حفاظت کبدی گیاهان مورد تاکید قرار گرفته است. این عصاره های گیاهی ممکن است با خنثی کردن تاثیر رادیکال های آزاد، اثر حفاظت کبدی ایجاد کنند Mgeer و همکارانش در دانشکده داروسازی ساراگودا پاکستان به منظور بررسی اثر حفاظت کبدی عصاره متانولی گیاه *Melilotus officinalis* بابت سمیت ناشی از پاراستامول و CCl4 در موش‌های

صحرایی پژوهشی انجام دادند یک مدل شناخته شده جهانی برای ارزیابی عملکرد حفاظت کبدی عصاره های گیاهی، مسمومیت با پاراستامول (PCM) است. دوزهای هپاتوتوکسیک PCM باعث کاهش سطح طبیعی گلوتاتیون کبدی (hepatic glutathione) می شود. .

نتایج تحقیق حاضر به وضوح نشان داد که در هر دو مدل مسمومیت کبدی ناشی از پاراستامول و تتراکلرید کربن، باعث افزایش معنی‌داری در سطوح آنزیم‌های نشانگر کبدی در گروه کنترل منفی می شود. با این حال، عصاره متانولی MO mg/kg, 50 100 mg/kg به طور قابل توجهی سطوح این آنزیم ها را کاهش داد، سطح بیلی روبین تام ، SGOT,ALP,SGPT و آلبوین بسیار کاهش یافت و تقریباً مانند درمان با سیلیمارین (silymarin) باعث بهبودی کبد و نرمال سازی آن شد که این امر نشان دهنده اثر آنتی هپاتوتوکسیک گیاه *Melilotus officinalis* است.

همچنین عملکرد حفاظت کبدی عصاره متانولی آبی گیاه *Melilotus officinalis* را می توان با اثر حفاظت کبدی کپسول فیتنول (یک فرآورده پزشکی جدید حاوی عصاره هایی از گیاهان دارویی مختلف از جمله گیاه *Melilotus officinalis* مرتبط دانست که قبلاً به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی بابت وجود فلاونوئیدها و تانن ها گزارش شده بود.

۳.۲. اثر محافظتی (MO) *Melilotus officinalis* بر قلب و ریه در برابر داروی سیس پلاتین

سیس پلاتین (Cis) یک داروی شیمی درمانی است که برای درمان انواع مختلف سرطان استفاده می شود، که با عوارض زیادی از جمله مسمومیت های قلبی و ریوی همراه است.از آنجایی که عصاره (Mo) *Melilotus officinalis* حاوی آنتی اکسیدان است و قابلیت های ضد التهابی دارد. Safaa M. Faid در دانشگاه عین الشمس قاهره را بر آن داشت تا مطالعه ای به منظور اثر محافظتی Mo را بر آسیب قلب و ریه ناشی از تجویز سیس پلاتین انجام دهد. نتایج همانطور که در جدول هایی در زیر آورده شده نشان داد که سیس پلاتین تجویز شده به موش های گروه (B CKکراتین کیناز) ، (LDHلاکتات دهیدروژناز) ، (MDA مالون آلدئید) و (TNF-αفاکتور نکروز تومور آلفا) را افزایش داد. و باعث کاهش سطح SOD سوپراکسید دیسموتاز کاهش فعالیت (GSHگلوتاتیون) در بافت های قلب و ریه و همچنین افزایش فعالیت کاسپاز ۳ در مقایسه با گروه کنترل A شد. در گروه های C و D که قبل از تزریق سیس پلاتین Mo دریافت کرده بودند، مقدار MDA، TNF-α، CK، LDH و کاسپاز۳ کاهش پیدا کرد، اما مقدار GSH و SOD در مقایسه با گروه B افزایش پیدا کرد. با توجه به نتایجی که از اندازه گیری ترکیبات بیوشیمیایی از گروه E و F که بعد از تزریق سیس پلاتین Mo دریافت کردند. تغییرات ترکیبات بیوشیمیایی نسبت به گروه C و D کم تر بود.که این مطلب را اثبات می کند که اگر قبل از درمان با سیس پلاتین از عصاره (Mo) *Melilotus officinalis* استفاده شود، سیستم ایمنی را افزایش می دهد و اثر محافظتی بر قلب و ریه بیش تر می شود.

Table 2: Effect of cisplatin and different treatments of MO on antioxidant, oxidative markers, and cardiac enzymes.

parameters \ groups	-Ve Control A	+Ve Control B	MO(LD)+CIS C	MO(HD)+ CIS D	CIS+MO (LD) E	CIS+MO (HD) F
MDA (nmol/mg protein)	2.45± 0.02	8.24± 0.002*	4.15± 0.001*	3.71± 0.06*	7.64± 0.001*#	6.45± 0.01*#$
GSH(nmol/mg protein)	0.45± 0.01	0.18± 0.001*	0.40± 0.06*	0.39 0±.02*	.31± 0.01*#0	0.24± 0.001*#$
SOD (nmol/mg protein)	55.15± 0.05	12.1± 0.07*	45.25± 0.05*	47.15± 0.05*	31.14± 0.05*#	27.68± 0.005*#$
CK-MB(U/L)	151.41± 0.02	354.54± 0.06*	201.25± 0.001*	193.21± 0.02*	250.14± 0.001*#	283.01± 0.001*#$
LDH (U/L)	101.5±.01	199.51±.02*	120.40±.05*	115.61±.02*	175.65±.01*#	150.65±.005*#$

Table 3: Effect of cisplatin and different treatments of MO on inflammatory cytokines.

parameters \ groups	-Ve Control A	+Ve Control B	MO(LD) +CIS C	MO(HD)+ CIS D	CIS+MO (LD) E	CIS+MO (HD) F
TNF- alpha (pg/mg)	131.52± 0.01	306.25± 0.002*	150.14± 0.002*	141.54± 0.04*	241.25± 0.004*#	214.06± 0.02*#$

Table 4: Effect of cisplatin and different treatments of MO extract on antioxidant, oxidative markers, and apoptic marker.

parameters \ groups	-Ve Control A	+Ve Control B	MO(LD)+CIS C	MO(HD)+CIS D	CIS+MO (LD) E	CIS+MO (HD) F
MDA (nmol/mg protein)	4.25±.02	9.41±.002*	6.25±.002*	6.01±.05*	8.65±.005*#	7.15±.02*#$
GSH(nmol/mg protein)	0.68±.02	0.26±..005*	0.52±.06*	0.58±.01*	0.36±.01#	0.41±.005*#
Caspase 3 (pg/mg)	3.41±.05	22.54±.07*	10.24±.03*	9.54±.01*	19.36±.01*#	15.01±.02*#$

۴.۲. اثر محافظتی *Melilotus officinalis* (Mo) بر اعصاب

اثر محافظتی عصاره *Melilotus officinalis* به مدت سه روز (mg/kg) ۵۰۰،۲۵۰،۱۰۰ بر روی بافت‌های مغز در ایسکمی حاد مغزی ناشی از انسداد شریان کاروتید در موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. با اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی پلاسما مانند keto-PGF1α –6، TXB2، غلظت سیتوکین، استرس اکسیداتیو، نسبت آپوپتوزو بیان پروتئین Bcl2 وBax در بافت مغزتایید شد. عصاره به طور معنی داری استرس اکسیداتیو و سیتوکین را در بافت‌های مغز کاهش داد و غلظت پلاسمایی keto-PGF1α –6 را افزایش داد. غلظت پلاسمایی TXB2به طور قابل توجهی توسط عصاره افزایش یافت. عصاره همچنین آپوپتوز ناشی از ایسکمی مغزی را بهبود بخشید.

۵.۲. تاثیر *Melilotus officinalis* (Mo) بر فشار خون

گسترش روز افزون فشار خون و عوارض جانبی داروهای کاهش دهنده فشار خون گروه تحقیق Mohammad sohail anwer و همکارانش را در دانشکده داروسازی کراچی را تشویق کرد که اثر *Melilotus Oficinalis* بر کاهش فشار خون را در موش های با فشار خون طبیعی بیهوش مورد بررسی قرار دهند. باتوجه به اینکه گلیکوزیدهای کومارین و فلاونوئیدها دارای اثر ضد فشار خون هستند تحقیق بدین منظور انجام شد. عصاره بوتانولیک *Melilotus Officinalis* را در دوزهای متفاوت به صورت داخل وریدی به موش هایی که گروه بندی شده بودند ترزیق شد. باتوجه به نتایج به دست آمده همه دوزهای مصرفی عصاره باعث کاهش فشار خون شدند. mg/Kg ۸۰ داخل وریدی بیش ترین کاهش (حدود ۶۰ درصد) را نشان می دهد. در حالی که mg/Kg ۴۰ کم ترین درصد کاهش اثر کاهش فشار خون *Melilotus Officinalis* به دلیل وجود گلیکوزیدهای کومارین و یا فلاونوئیدها باشد.

همچنین در تحقیقات دیگری تاثیر مثبت عصاره گیاه یونجه زرد بر درمان زخم پای بیماران دیابتی، درمان استئوآرتریت، تاثیر بردرمان التهاب روده، تاثیر بر درمان آندومتریوز و بسیاری از بیماری‌های دیگر به اثبات رسیده است.

نتیجه گیری:

از گذشته تاکنون گیاهان بومی، به دلیل امکان تولید متابولیتهای ثانویه (ترپنوییدها، فنلها و فلاونوییدها) از اصلی ترین منابع غذایی و دارویی برای زندگی انسان ها بوده و هستند .پلی فنول های گیاهی و فلاونوییدها به عنوان آنتی اکسیدان های قوی

و طبیعی از مهمترین عوامل ایجاد محدودیت آسیب های اکسیداتیوی در بدن به حساب می آیندکه بوسیله غیرفعال کردن رادیکال های آزاد وقتی به لیپیدها و غذاهای حاوی لیپید اضافه می شوند ، می توانند عمر مفید آن ها را با تاخیر انداختن فرآیند پراکسیداسیون لیپید افزایش دهند (خاکی و همکاران). از جایی که سرنخ های کلیدی برای انجام مطالعات فیتوشیمیایی ، آنتی اکسیدانی و بررسی خواص درمانی گیاهان دارویی بومی مبتنی بر نحوه استفاده سنتی از آن گیاهان است، ازهمین رو شناسایی ،استخراج و تولید داروهای طبیعی و موثر ، از عوامل مهمی هستند که طی چند سال اخیر، بسیار مورد توجه سازمان جهانی بهداشت (WHO) قرار گرفته است .البته باید این نکته را در نظر داشت که کومارین های موجود در یونجه زرد در طی فرآیند فساد، به دیکومارول سمی، یک آنتاگونیست قوی ویتامین K تبدیل می شود که خاصیت ضد انعقادی دارد.روش نادرست نگهداری یونجه زرد احتمال تشکیل دیکومارول در یونجه را افزایش می دهد.هنگامی که یونجه سمی به مدت چند هفته مصرف شوددیکومارول ،پروآنزیم های مورد نیاز برای سنتز پروترومبین را تغییر می دهد ودر نتیجه هیپوپروترومبینی (با جلوگیری از تشکیل آنزیم فعال) ایجاد می شود. به احتمال زیاد با سنتز فاکتور VII و سایر فاکتورهای انعقادی وابسته به ویتامین K نیز تداخل دارد. بنابراین در مصرف این گیاه باید احتیاط لازم صورت گیرد.

منابع

برهانی، گ، مازندرانی، م و عباسپور، ح، ۱۳۹۶، بررسی انتوفارماکولوژیکی، فیتوشیمیایی، آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف اندام های گیاه دارویی گیاه یونجه زرد ، *Melilotus officinalis* L. در رویشگاه چهار باغ، نخستین کنفرانس ملی فیتوشیمی گیاهان دارویی، ارتقاء سلامت و تجارت، دانشگاه آزاد گرگان، زمستان

خاکی، آ.۱۳۹۴، بررسی فیتوشیمیایی،آنتی اکسیدانی و انتوفارماکولوژی گیاه دارویی *Melilotus officinalis* به عنوان ضدالتهاب و التیام دهنده زخم دیابتی، فصلنامه اکوفیتوشیمیگیاهان دارویی، شماره پیاپی ۹، سال سوم ، شماره ۱ ،بهار ۱۳۹۴

Anwar,M.S.Mohatasheem,M.,azhar,L.,Ahmed, S.W.,Bano,H.2008.Chemical constituents from Melilotus officinalis.J.Basic ApplSci,4(2):89-94

Chorepsima, S., Tentolouris, k,. Dimitroulis, D., Tentolouris,N.,2013.Melilotus: Contribution to wound helling in the diabetic foot.J.Herb.Med, 3:81-86

Dymowski, W., Assessment report on Melilotus officinalis (L.) Lam., herba, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), EMA/HMPC/44165/2016.

Gui-cun Zhao,Effect of Melilotus officinalis extract on the apoptosis of brain tissues by altering cerebral thrombosis and inflammatory mediators in acute cerebral ischemia. Biomedicine & Pharmacotherapy 89 (2017) 1346–1352

Mgeer, A., Nasir, Z.,Muhammad., Qaisar, N., Uttra,a, M., Ahsan, H ., Ullah khan, K ., Ullahkhan, I., Saleem, M., Khadija., Asif, H., Sharif, A.,Younis,W and Huma na,Z, Evaluation of hepatorrotective activity of melilotus officinals l. against paracetamol and carbon tetrachloride induced hepatic injury in mice, Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research, Vol. 74 No. 3 pp. 903-909, 2017.

Safaa M. Faid, Potential protective role of Melilotus officinalis extract against Cisplatin –induced cardiac and pulmonary toxicities in rats, African J. Biol. Sci., 16 (1): 233-244 (2020).

Sheikh,N.A., Kosalge S.B., Desai, T.R., Dewani, A.P, Mohale,D.S and Tripathi ,A.S, Evaluation of Beneficial Effects of Melilotus officinalis on Blood Profiles in iron Overloaded Sprague Dawley Rats, Journal of Hematology Research, 2020, 7, 23-30 .

A review on the effect of biochemical compounds of yellow alfalfa (Melilotus officinalis) on the treatment of some diseases

[*]Madine Mardani Nia *, Sara Maghsodian Nejad[2]

Address1: Master's degree in Animal Physiology, Shahrekord University, Department of Experimental Sciences

Address 2: [2] Master's degree in Horticultural Sciences and Engineering, Khuzestan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Secretary of Experimental Sciences

Abstract

Since the past, indigenous plants have been and are the main sources of food and medicine for human life due to the possibility of producing secondary metabolites (terpenoids, phenols and flavonoids). The yellow alfalfa plant (Melilotus officinalis) contains various flavonoids and phenolic compounds. Plant polyphenols and flavonoids, as strong and natural antioxidants, are considered to be the most important factors in limiting oxidative damage in the body, and by deactivating free radicals, when added to lipids and foods containing lipids, they can prolong its useful life. by delaying the process of lipid peroxidation and by preventing the degradation of food, play an important role in the prevention and treatment of many common diseases today. Due to the fact that the yellow alfalfa plant is distributed in most parts of Iran and has many medicinal properties, but it has been very little studied. In this article, by studying and reviewing various articles, the effect of biochemical compounds of yellow alfalfa on the treatment of some diseases

Keywords : Antioxidant, secondary metabolite, Melilotus officinalis

[*] amardaniniya@gmail.com

مروری بر ترکیبات فنولی گیاهی و اثرات محافظتی آن‌ها در برابر بیماری‌ها

محبوبه زارع[1]

دانشکده گیاهان دارویی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، مازندران، ایران.

چکیده

ترکیبات فنلی یکی از رایج ترین گروه های متابولیت های گیاهی هستند. ترکیبات فنلی گیاهی می توانند به عنوان آنتی اکسیدان، پلیمرهای ساختاری، جذب کننده، صفحه نمایش UV و مواد شیمیایی واکنش دفاعی عمل کنند. همچنین این فیتوکمیکال ها مزایای زیادی برای سلامت انسان دارند. از نقطه نظر فیزیولوژیکی، ترکیبات فنولی دارای فعالیت های آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد پیری و ضد سرطانی هستند. این تحقیق طبقه بندی شیمیایی و منبع ترکیبات فنولی گیاهی را مورد بررسی قرار نمیدهد و همچنین به بطور مختصربه شرح اثرات محافظتی آنها در برابر بیماری ها مختلف می پردازد.

واژگان کلیدی: ترکیبات فنولی، آنتی اکسیدانی، اثرات محافظتی.

Email: [1] M.zare@ausmt.ac.ir

۱. مقدمه

ترکیبات فنولی متابولیت‌های ثانویه هستند که عموماً برای دفاع در برابر اشعه ماوراء بنفش یا تهاجم عوامل بیماری‌زا توسط گیاه تولید می‌شوند. اثرات بیولوژیکی این ترکیبات عمدتاً به توانایی مهار گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن، انتقال الکترون‌ها به رادیکال‌های آزاد و فعال کردن آنزیم-های آنتی اکسیدانی مربوط می‌شود که منجر به بهبود استرس اکسیداتیو و التهاب می‌گردد که نشان دهنده‌ی اثرات امیدوار کننده در پیشگیری از بیماری‌های مختلف نظیر دیابت، سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی، پوکی استخوان، بیماری‌های عصبی و غیره است (Charlton et al., 2002). ترکیبات فنولی علاوه بر خواص بیولوژیکی، پتانسیل زیادی برای استفاده در صنایع رنگ ، بسته بندی مواد، آرایشی و بهداشتی، کودها، لاستیک و غیره دارند (Iglesias-Carres et al., 2019). این ترکیبات دارای طیف وسیعی از ساختارهای پیچیده هستند. پایه اساسی آنها، حلقه فنولی است و به طور کلی این ترکیبات به عنوان اسیدهای فنولی و الکل‌های فنولی دسته بندی می‌شوند. بسته به قدرت حلقه فنولی، این ترکیبات را می‌توان در کلاس‌های اسیدهای فنولی و پلی فنول‌ها طبقه بندی کرد (Charlton et al., 2002). در مطالعه پیش رو، شیمی، منابع گیاهی واثرات درمانی ترکیبات فنولی گیاهی را مورد بررسی قرار می دهیم.

۲. شیمی و منابع گیاهی ترکیبات فنولی

ترکیب فنولی متنوع در گیاهان شناسایی شده‌است. ترکیبات فنولی بسته به تعداد حلقه‌های آروماتیک و استخلاف‌هایی که به این حلقه ها متصلند به گروه‌های مختلفی طبقه بندی می‌شوند. ترکیبات فنولی مشتق از گیاه می‌توانند به فرم گلیکوزید نیز باشند، در این حالت یک کربن حلقه آروماتیک از طریق پیوند کوالانسی به قند متصل می‌شود (Belščak-Cvitanović et al., 2018). ترکیبات فنولی بر اساس ساختار شیمیایی‌شان به اسیدهای فنولی و پلی‌فنول‌ها تقسیم بندی می‌شوند. پلی‌فنول‌ها به فلاونوئیدها، استیلبن‌ها، لیگنان‌ها و تانن‌ها طبقه بندی می‌شوند (Zhang et al., 2021).

اسیدهای فنولی: اسیدهای فنولی، عمدتاً مشتقات اسید بنزوئیک و سینامیک اسید هستند. اسیدهای فنولی در گیاهان دارویی و گیاهان خوراکی وجود دارند. منابع غذایی اصلی اسیدهای هیدروکسی سینامیک میوه هایی مانند سیب، گیلاس، هلو و مرکبات هستند (**Huang** et al., 2009).

پلی‌فنول‌ها: از نظر شیمیایی، پلی فنول‌ها گروهی از ترکیبات طبیعی با ساختار فنولی هستند. فلاونوئیدها، استیلبن‌ها، لیگنان-ها و تانن‌ها زیر مجموعه پلی فنولها می باشند (Quideau et al., 2011).

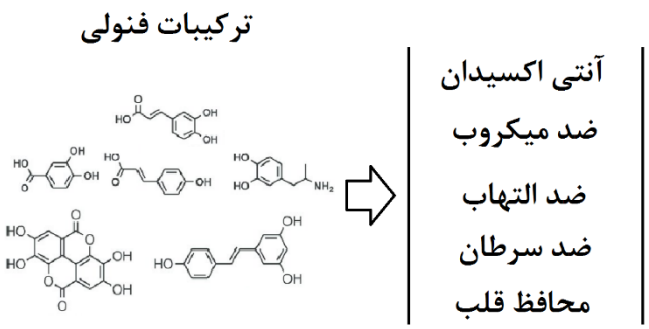
فلاونوئیدها به دلیل خصوصیات ساختاری‌شان رنگ‌های متفاوتی دارند. به عنوان مثال، آنتوسیانین ها اغلب آبی، قرمز یا بنفش هستند. مهمترین فلاونوئیدها، آگلیکون‌های کوئرستین، کامفرول، میریستین و گلیکوزیدهای آن‌ها هستند. این ترکیبات به طور گسترده در بلوبری، سیب، گوجه فرنگی و چای وجود دارند (Zhang et al., 2021).

استیلبن ها به صورت مونومر، الیگومرها و پلیمری وجود در گیاهان وجود دارند. ترکیب معروف ترانس رسوراترول، عضوی از این خانواده شیمیایی است که در رژیم غذایی انسان به وفور یافت می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که استیلبن‌ها به‌عنوان فیتواستروژن برای محافظت در برابر تومورهای وابسته به هورمون می‌توانند عمل کنند (**Huang** et al., 2009).

لیگنان‌ها یک دسته غیر فلاونوئیدی از پلی‌فنول‌ها هستند که دارای دو واحدهای پروپیل بنزن هستند. این ترکیبات را می توان در حبوبات، دانه‌ها و روغن‌های گیاهی یافت (Park et al., 2014). ترکیبات فنولی در بسیاری از گیاهان به مولکولهای بزرگتری مانند تانن‌ها پلیمریزه می‌شوند. تانن‌ها، به دو گروه: تانن‌های قابل هیدرولیز یا تانن‌های پیروگالول و تانن‌های متراکم یا پروآنتوسیانیدین ها طبقه‌بندی می‌شوند (Barbehenn et al., 2011).

۳. اثرات محافظتی ترکیبات فنولی در برابر بیماری

ترکیبات فنولی تاثیر زیادی بر سلامتی و پیشگیری از بیماریها دارند. این قابل درک است که این فنول¬های گیاهی به عنوان آنتی اکسیدان ممکن است از ترکیبات سلولی در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت کنند و خطر ابتلا به بیماری های دژنراتیو (بیماری های فرسایشی تخریبی) مختلف مرتبط با استرس اکسیداتیو را محدود کنند. مطالعات تجربی، نقش ترکیبات فنولی را در پیشگیری از بیماریهای قلبی عروقی، سرطان، پوکی استخوان، دیابت و بیماری دژنراتیو عصبی بیان می کند. تعداد مطالعات انسانی که اثرات محافظتی فنول‌های گیاهی را بررسی می کنند، طی دهه گذشته به سرعت افزایش یافته و آگاهی علمی در حال افزایش است. عمدتاً اثرات محافظتی پلی فنول ها به دلیل خواص آنتی اکسیدانی آن‌ها است (**Sharma** et al., 2014). از سوی دیگر، ترکیبات فنلی همچنین دارای اثرات بیولوژیکی دیگری مرتبط با ظرفیت آنتی اکسیدانی شان مانند فعالیت های ضد میکروبی، ضد التهابی، ضد سرطانی و محافظت از قلب هستند (شکل ۱) (**Cosme** et al., 2020). این ترکیبات فیتوشیمیایی به عنوان عوامل درمانی بالقوه در برابر چندین بیماری دژنراتیو مزمن توجه بیشتری را به خود جلب می کنند. با این حال، یافته تجربی متعدد دیگری، مکانیسم‌های بالقوه مختلفی را برای عمل پلی‌فنول‌ها در پیشگیری از بیماری در حیوانات آزمایشی، مستقل از فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی‌شان، نشان می‌دهند. علاوه بر این، اثرات پرواکسیدانی پلی فنول ها نیز شرح داده شده است. اثر پرواکسیدانی ترکیبات فنولی اثرات متضادی بر فرآیندهای فیزیولوژیکی سلولی دارد: ترکیبات فنولی به عنوان آنتی اکسیدان بقای سلول را بهبود می بخشند. ترکیبات فنولی به عنوان پرو اکسیدان ممکن است آپوپتوز را القا کنند و تکثیر سلولی را مسدود کنند (**Sharma** et al., 2014).



شکل ۱: مروری بر اثرات بیولوژیکی ترکیبات فنولی گیاهی

پلی فنول های گیاهی می توانند سیستم آنتی اکسیدانی درون زا را بهبود بخشند، به طور موثر از آسیب اکسیداتیو جلوگیری کنند و تعادل اکسیدان-آنتی اکسیدان را بهبود بخشند. تحقیقات روی چای سبز نشان می دهد که این چای حاوی شش کتچین اولیه به عنوان ترکیبات پلی فنلی است. این اجزای فعال زیستی باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پلاسما شدند. مسیرهای سیگنال دهی حساس به استرس، آنزیم های پیش اکسیدان و القای آنزیم های آنتی اکسیدانی، از جمله سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز کاهش دادند (Respy et al., 2004).

۱.۳. درمان سرطان

سرطان به عنوان یک تکثیر سلولی نابجا توصیف می‌شود که می‌تواند منجر به بدخیمی‌هایی شود که تهدیدکننده زندگی هستند و بار مالی قابل‌توجهی را هم بر بیماران و هم بر سیستم مراقبت‌های بهداشتی تحمیل می‌کنند. پلی فنول های طبیعی برای مدت طولانی برای پیشگیری و درمان انواع بیماری ها مورد استفاده قرار گرفته اند. در نتیجه، این فیتوکمیکال ها ممکن است به دلیل خواص ضد سرطانی خود، توانایی عمل به عنوان عوامل شیمی درمانی را در سرطان های مختلف دارا باشند (Davatgaran et al., 2017).

۲.۳. اثرات محافظت کننده عصبی

استرس اکسیداتیو شرایطی است که در آن سیستم آنتی اکسیدانی توسط سطوح بالای اکسیژن و رادیکال های آزاد مشتق شده از اکسیژن غلبه می¬شود. مغز ۲۰ درصد از کل اکسیژن پایه را مصرف می کند و یکی از بیشترین میزان استرس اکسیداتیو را در بین هر اندامی در بدن تجربه می کند. سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون/گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و آنتی اکسیدان های تک مولکولی مانند ویتامین E و C تنها تعدادی از فرآیندهای درون زا هستند که آسیب اکسیداتیو را سم زدایی می کنند. با این حال، در بسیاری از شرایط بیماری، تولید رادیکال‌های آزاد از مکانیسم‌های دفاعی طبیعی پیشی می‌گیرد و منجر به سطوح بیشتری از استرس اکسیداتیو می‌شود. مقدار قابل توجهی از استرس اکسیداتیو در مغز با اکثر بیماری های نورودژنراتیو از جمله پارکینسون، آلزایمر، هانتینگتون، مولتیپل اسکلروزیس، آسیب مغزی تروماتیک، ایسکمی و خود پیری مرتبط است. شواهد رو به رشدی اثرات محافظت کننده عصبی پلی فنول ها را در کاهش استرس اکسیداتیو در مغز نشان داده است (Dundaiah et al., 2019).

۳.۳. محافظت از قلب

فرض بر این است که استرس اکسیداتیو نقش حیاتی در اتیولوژی بیماری قلبی دارد. کاهش ذخیره آنتی اکسیدانی و افزایش استرس اکسیداتیو با نارسایی حاد و مزمن قلبی مرتبط است. پلی فنول ها توانایی محافظت در برابر بیماری های مرتبط با استرس اکسیداتیو از جمله بیماری های قلبی عروقی را دارند: به ویژه بیماری ایسکمیک قلبی و سکته مغزی ناشی از تصلب شرایین. چندین مطالعه اثرات محافظتی قلبی پلی فنول ها را در برابر بیماری های مرتبط با استرس اکسیداتیو گزارش کرده اند (Anupama et al., 2021 and Oudot et al., 2019).

٤. بحث و نتیجه‌گیری

پلی‌فنول‌ها از جمله قوی‌ترین ترکیبات فعال هستند که توسط گیاهان و موجودات دریایی سنتز می‌شوند و دارای فعالیت های بیولوژیکی و ارزش‌های دارویی مختلف هستند. تحقیقات پیش بالینی و بالینی نشان می دهد که افزایش مصرف رژیم های غذایی غنی از پلی فنل از اختلالات عصبی، بیماری های قلبی عروقی، سرطان، دیابت، اختلالات التهابی و بیماری های عفونی محافظت می کند. پیشنهاد شده است که فعالیت آنتی اکسیدانی پلی فنل های رژیم غذایی نقش مهمی در پیشگیری از بیماری های ناشی از استرس اکسیداتیو در انسان دارد.

منابع

Anupama, S. K., Ansari, M. A., Anand, S., Sowbhagya, R., Sultana, S., Punekar, S. M., Lakshmeesha, T. R. 2022. Decalepis hamiltonii and its bioactive constituents mitigate isoproterenol-induced cardiotoxicity in aged rats. South African Journal of Botany. 151: 25-33.

Barbehenn, R.V., Constabel, C.P., 2011. Tannins in plant–herbivore interactions. Phytochemistry, 72(13):1551-1565.

Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V. and Komes, D., 2018. Overview of polyphenols and their properties. In Polyphenols: Properties, recovery, and applications Woodhead Publishing, pp: 3-44.

Charlton, A.J., Baxter, N.J., Khan, M.L., Moir, A.J., Haslam, E., Davies, A.P., Williamson, M.P., 2002. Polyphenol/peptide binding and precipitation. Journal of agricultural and food chemistry. 50(6): 1593-1601.

Cosme, P., Rodríguez, A.B., Espino, J., Garrido, M., 2020. Plant phenolics: **Bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications. Antioxidants. 9(12): 1263.**

Davatgaran-Taghipour, Y., Masoomzadeh, S., Farzaei, M.H., Bahramsoltani, R., Karimi-Soureh, Z., Rahimi, R., Abdollahi, M., 2017. Polyphenol nanoformulations for cancer therapy:

Experimental evidence and clinical perspective. International journal of nanomedicine. 12: 2689–2702.

Dundaiah, B., Ramachandregowda, S., Anand, S., Kariyappa, A.S., Gopinath, M.M., Tekupalli, R., 2019. Swimming exercise and dietary supplementation of Hemidesmus indicus modulates cognitive decline by enhancing brain-derived neurotrophic factor expression in rats. National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology. 9(10): 955-959.

Iglesias-Carres, L., Mas-Capdevila, A., Bravo, F.I., Aragones, G., Arola-Arnal, A., Muguerza, B., 2019. comparative study on the bioavailability of phenolic compounds from organic and nonorganic red grapes. Food Chemistry. 299: 125092.

Park J B. Flaxseed secoisolariciresinol diglucoside and visceral obesity, A closer look at its chemical properties, absorption, metabolism, bioavailability, and effects on visceral fat, lipid profile, systemic inflammation, and hypertension. Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity Book, 1st ed.; Watson, RR, Ed, pp: 317-328, 2014.

Oudot, C., Gomes, A., Nicolas, V., Le Gall, M., Chaffey, P., Broussard, C., Calamita, G., Mastrodonato, M., Gena, P., Perfettini, J.L., Hamelin, J., 2019. CSRP3 mediates polyphenols-induced cardioprotection in hypertension. The Journal of Nutritional Biochemistry. 66: 29-42.

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L., 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. Angewandte Chemie International Edition. 50(3): 586-621.

Sharma, R., 2014. Polyphenols in health and disease: Practice and mechanisms of benefits. In Polyphenols in human health and disease. Academic Press pp. 757-778.

Zhang, L., Han, Z., Granato D., 2021. Polyphenols in foods: Classification, methods of identification, and nutritional aspects in human health. Advances in Food and Nutrition Research; 98: 1-33.

Crespy, V., Williamson, G., 2004. A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. The Journal of nutrition. 134:3431–3440.

An Overview of Plant Phenolic Compounds and Protective effects of them against diseases

Mahboobeh Zare[1]

Faculty of medicinal plants, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

Abstract

Phenolic compounds are one of the most ubiquitous groups of plant metabolites. Plant phenolic compounds can act as antioxidants, structural polymers, attractants, UV screens and defense response chemicals. Also, these phytochemical have many advantages for human health. From a human physiological standpoint, phenolic compounds are vital in defense responses, such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-aging and anti-cancer activities. This research reviews the chemical classification and source of plant phenolic compounds and also provides a brief description their protective effects against diseases.

Keywords: Phenolic compounds, Antioxidant, Protective effects.

Email: [1] M.zare@ausmt.ac.ir

مروری بر روش‌های استخراج، فعالیت‌های بیولوژیکی و استراتژی های افزایش زیست فراهمی روتین

شهاب الدین خسروی[۱] *، سید علی اندی[۲]

[۱] * دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

[۲] استادیار دانشکده گیاهان دارویی، دانشگاه تخصصی فناورهای نوین آمل، آمل

چکیده

فلاونوئید روتین یک ترکیب فنولی رایج در رژیم غذایی می‌باشد که به دلیل مشخصات دارویی ارزشمند آن از جمله خواص ضد میکروبی، ضد التهابی، ضد سرطان و ضد دیابت توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در حال حاضر بیش از ۸۶۰ محصول حاوی روتین در ایالات متحده به بازار عرضه می‌شوند. نتایج فعالیت‌های دارویی روتین در شرایط آزمایشگاهی با توجه به حلالیت محدود آن در هر دو فاز آبی و لیپیدی و همچنین فراهمی زیستی پایین آن، بازده کمتری در شرایط بالینی دارد. از این رو کشف و طراحی تکنیک‌های جدید جهت افزایش فراهمی زیستی این ترکیب فلاونوئیدی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. استفاده از سیستم‌های مناسب تحویل روتین یا تبدیل آنزیمی یا شیمیایی آن به مشتقات بسیار محلول که می‌تواند سبب بهبود پتانسیل فراهمی زیستی آن شود و همچنین حفظ خواص زیستی این ترکیب می‌تواند ما را به سمت استنتاج‌هایی امیدوارکننده در درمان بیماری‌های مزمن مختلف سوق دهد. در این مقاله مروری به استراتژی‌های مناسب افزایش زیست‌فراهمی این ترکیب و همچنین روش‌های مناسب استخراج و فعالیت‌های بیولوژیکی آن پرداخته می‌شود.

واژگان کلیدی: فلاونوئید روتین، استخراج، فعالیت‌های بیولوژیکی، فراهمی زیستی

* Shahab1375khosravi@gmail.com

۱. مقدمه

فلاونوئیدها ترکیبات فنولی طبیعی می‌باشند که به وفور در گیاهان یافت می‌شوند. تاکنون بیش از ۸۰۰۰ فلاونوئید مختلف شناسایی شده است. این ترکیبات به عنوان متابولیت‌های تخصصی عملکردهای مختلفی از جمله خواص آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد ویروسی، ضد باکتریایی و ضد مالاریا داشته و همچنین محافظ سیستم قلبی-عروقی، کبد و سیستم عصبی می‌باشند (Rakha et al., 2022). روتین با نام کامل ۳،۴،۵،۷-تتراهیدروکسی-فلاون-۳-روتینوزید یک فلاونول است که به فراوانی در گیاهانی مانند گل شور (*Salsola soda*)، گندم سیاه (*Fagopyrum esculentum*)، چای (*Camellia sinensis*) و سیب (*Malus domestica*) یافت می‌شود. نام "روتین" از گیاه *Ruta graveolens* گرفته شده است که حاوی روتین می‌باشد. از نظر شیمیایی روتین یک گلیکوزید شامل آگلیکون کوئرستین همراه با دی‌ساکارید روتینوز است (Sharma et al., 2013). گزارشات بالینی نشان داده است که روتین در پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف اثربخش بوده است و برای درمان بیماری های مختلف از قبیل واریس و هموروئید تجویز می‌شود. در حال حاضر حدود ۸۶۰ فرآورده و مکمل‌های حاوی روتین در آمریکا به فروش می‌رسند. میزان مصرف خوراکی روتین از ۵۰۰ میلی‌گرم تا ۲۰۰۰ میلی‌گرم در روز می‌باشد که می‌توان بدون هیچگونه عارضه جانبی برای یک دوره شش ماهه ادامه داد (Incandela et al., 2002). بیش از ۷۰ گونه گیاهی حاوی روتین وجود دارد که گندم سیاه (*Fagopyrum esculentum*) از خانواده Polygonaceae به عنوان منبع اصلی روتین طبیعی گزارش شده است (Kim et al., 2005). از معایب عمده استفاده از این ترکیب فلاونوئیدی، فراهمی زیستی ضعیف آن است که می‌تواند ناشی از حلالیت کم آن در محلول‌های آبی و چربی، پایداری کم و نفوذپذیری محدود آن باشد. اگرچه این محدودیت‌ها مانع از اثرات بیولوژیکی روتین در شرایط بالینی می‌شوند، فعالیت زیستی قابل‌توجهی از این ترکیب در شرایط آزمایشگاهی گزارش شده است. بنابراین استفاده از روش‌های مناسب استخراج و همچنین استراتژی‌هایی به منظور افزایش فراهمی زیستی این ترکیب در شرایط آزمایشات بالینی از اهمیت قابل توجهی برخوردار می‌باشند (Gullon et al., 2017).

۲.۱. روش‌های استخراج روتین

برای بازیابی ترکیبات فعال زیستی از منابع طبیعی از جمله گیاهان دارویی، مرحله استخراج نقش بسیار مهمی دارد. در این مرحله باید ملزوماتی همانند تطبیق‌پذیری، سهولت استفاده و مقرون به صرفه بودن در نظر گرفته شود و همچنین باید عمده ترکیبات طبیعی موجود در گیاه استخراج شوند. در طول سال‌های گذشته، تحقیقات مختلفی برای استخراج ترکیبات ارزشمند طبیعی با استفاده از فن‌آوری‌های معمولی و نوآورانه صورت گرفته است (Thoo et al., 2013).

روش سوکسله که یک روش استخراج رفلاکس حرارتی شامل مراحل حرارت دادن، جوشاندن و رفلاکس برای یک دوره زمانی مشخص می‌باشد (Yang and Zhang, 2008) به طور گسترده‌ای برای نمونه‌های گیاهی استفاده می‌شود. استخراج در این روش ساده، دقیق و آسان به نظر می‌رسد، اما بازده استخراج روتین در این روش پایین می‌باشد (Ohnishi et al., 1999). علاوه بر این، در این روش به حجم زیادی از حلال‌هایی که می‌توانند خطرناک باشند، نیاز می‌باشد که همان‌گونه که اشاره شده

است به عنوان یک رویکرد ناسازگار با محیط زیست در نظر گرفته می‌شود. برای استخراج فلاونوئید روتین از گل سنجد (*Sambucus Canadensis*) از این روش با حلال اتانول ۹۵ درصد استفاده شده است (Sando and Lloyd, 1924).

استخراج به کمک اولتراسوند نسبت به روش رفلاکس حرارتی از بازده بالاتر ۵۰ درصدی برای استخراج روتین برخوردار است (Zhao et al., 1991). مکانیسم اصلی استخراج با امواج فراصوت به پدیده کاویتاسیون (Cavitation) مربوط می‌شود. امواج فراصوت، مراحل فرآیند استخراج ترکیبات گیاهی، یعنی تورم بافت به‌منظور جذب حلال و نیز خروج ترکیبات از بافت به حلال را از طریق ایجاد تخلخل و منافذ در دیواره سلول‌ها سرعت می بخشند و از اینرو بازده استخراج ترکیبات مؤثره در این روش به نسبت بالاتر می‌باشد (خواجه نوری و حقیقی اصل، ۱۳۹۲).

اخیراً یک فناوری استخراج تازه توسعه یافته به نام استخراج به کمک نیروی مکانیکی- شیمیایی (Mechanochemical) به طور مؤثری مورد استفاده قرار گرفته است و برای ترکیباتی مانند روتین که حلالیت کمی در آب دارند از راندمان بالایی برخوردار است. گزارش شده است که این تکنیک توانسته است فلاونوئید روتین را از گیاه *Hibiscus mutabilis* با سرعت قابل ملاحظه‌ای استخراج کند (Xie et al., 2011). این فناوری پیشرفته از ترکیب نیروی شیمیایی و مکانیکی و بدون استفاده از حلال در دمای بسیار پایین بهره می‌برد. نیروی مکانیکی برای انتشار روتین از سلول‌های گیاهی استفاده می‌شود، در حالی که مواد شیمیایی مانند کربنات سدیم و دی سدیم ترابورات نقشی تعیین‌کننده در جداسازی روتین به شکل جامد با سایر ترکیبات گیاهی دارند (Jovanovic et al., 1994).

انرژی مایکروویو به دلیل اثر گرمایشی آن به افزایش سرعت فرآیندهای مختلف بیولوژیکی کمک می‌کند. مایکروویو باعث ایجاد افزایش ناگهانی دما در داخل ساختار سلولی و منجر به پارگی دیواره سلولی و آزاد شدن سریع ترکیبات گیاهی به محیط اطراف می‌شود (Deng et al., 2006). از مزایای این روش کاهش زمان استخراج و همچنین مقدار حلال مصرفی است (Li et al., 2004). Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۹ برای استخراج روتین از نمونه گیاهی *Euonymus alatus* از روش میکروویو استفاده کردند. استخراج روتین به کمک مایکروویو نسبت به روش سوکسله و اولتراسونیک در مدت زمان کوتاهتری انجام شد (Zhang et al., 2009).

اخیراً ثابت شده است که استخراج به کمک مادون قرمز می‌تواند روشی جایگزین برای استخراج اجزای فعال از گیاهان دارویی باشد. اگرچه این روش ممکن است به اندازه روش استخراج به وسیله مایکروویو کارآمد نباشد، آسان‌تر، ارزان‌تر و به نسبت دارای تابش کمتری خواهد بود (Chen et al., 2010).

از طرف دیگر، تلاش در به کارگیری حلال‌های آلی کم‌خطر و حتی بی‌خطر جهت استخراج ترکیبات خاص یا فعال از گیاهان دارویی سبب ایجاد روش استخراج با آب فوق گرم به عنوان روشی مؤثر شده است. روش آب فوق گرم با استفاده از مقادیر کم حلال‌های آلی مانند اتانول یا بدون آن برای استاندارد کردن مواد شیمیایی و نیز کنترل کیفی گیاهان دارویی بسیار کارآمد می‌باشد (گل محمد و همکاران، ۱۳۸۷).

۲.۲. فعالیت‌های بیولوژیکی

روتین به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی که دارد، طیف وسیعی از کاربردهای دارویی را نشان داده است. از این‌رو می‌توان از این ترکیب برای درمان و یا پیشگیری بیماری‌های مختلف از جمله سرطان، دیابت، فشار خون و کلسترول بالا استفاده کرد. رادیکال‌های آزاد که به دلایل مختلف بیش از اندازه طبیعی در داخل بدن تولید می‌شوند، می‌توانند منتج به بر هم زدن فرآیندهای متابولیک گردند (Sharma et al., 2013).

فلاونوئیـدها به عنوان بزرگترین گروه از ترکیبات فنولی گیاهی دارای گـروه‌هـای هیدروکسـیل می‌باشند که قـدرت آنتـی اکسـیدانی این ترکیبات رابطـه مسـتقیمی با گروه‌های هیدروکسیلی آن‌ها دارد. (ایرانشاهی و جوادی، ۱۳۹۸).

از فعالیت‌های بالقوه دیگر فلاونوئیدهایی مانند روتین می‌توان به خواص ضدباکتریایی به تنهایی و در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌ها با یک اثر سینرژیستی اشاره کرد (Cushnie and Lamb, 2011). این فعالیت‌ها به سه مکانیسم نسبت داده می‌شوند: آسیب غشای سیتوپلاسمی، مهار سنتز اسیدهای نوکلئیک، و بازدارنگی تولید ATP (Haraguchi et al., 1998). فعالیت ضد باکتریایی روتین بر روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس(*Staphylococcus aureus*)، و اشریشیا کلی(*Escherichia coli*) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از فعالیت ضدمیکروبی قابل توجه روتین بود (Soni et al., 2013). در مطالعه دیگری، عصاره هیدروالکلی *Pteris vittata* که حاوی مقادیر زیادی روتین بود، بر رشد هشت میکروارگانیسم روده‌ای با استفاده از دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آزمایش، فعالیت بازدارنگی معنی‌دار این ترکیب را بر روی سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) و کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*) نشان داد (Singh et al., 2008). علاوه بر فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی، فلاونوئیدهایی مانند روتین می‌توانند دارای اثرات ضدویروسی باشند (Middleton and Kandaswami, 1994).

روتین با مهار برخی از آنزیم‌های کلیدی می‌تواند اثر ضد التهابی نیز نشان دهد (Rabiskov et al., 2012).

مطالعات *in vitro* و *in vivo* متعددی نشان داده‌اند که گلیکوزید روتین با مکانیسم‌های از قبیل غیرفعال‌سازی عوامل سرطان‌زا، توقف چرخه و تقسیم سلولی و در نهایت بازدارندگی تکثیر سلول‌های سرطانی، القای آپوپتوز و ... می‌تواند دارای خواص ضد سرطانی باشد (Ren et al., 2003).

۲.۳. روش‌های افزایش فراهمی زیستی

از معایب اصلی روتین، فراهمی زیستی ضعیف آن می‌باشدکه ناشی از حلالیت کم آن در فازهای آبی و لیپیدی است. در سال های گذشته ایده‌های مختلفی برای حل این مشکل ارائه شده است. این استراتژی‌ها ممکن است فراهمی زیستی فلاونوئید-هایی همانند روتین را در صورت مصرف خوراکی افزایش دهند (Singh et al., 2013). در طول یک دهه اخیر، یک رویکرد جایگزین دارورسانی توسعه یافته به منظور غلبه بر حلالیت ضعیف برخی از داروها در آب با کاهش اندازه ذرات پیشنهاد شده است.

سرعت انحلال قرص نانوکریستالی روتین در مقایسه با قرص‌های موجود در بازار بیشتر بود. قرص‌های نانوکریستال بعد از ۳۰ دقیقه بطور کامل در آب حل شدند، در حالی که تنها ۵۵ درصد از مقدار کل روتین موجود در قرص موجود در بازار حل شد (Mauludin et al., 2009).

نانو ذرات پلیمری برای کپسوله‌سازی طراحی شده‌اند. داروهای چربی دوست نه تنها برای بهبود خواص فیزیکی و شیمیایی خود، بلکه برای جلوگیری از تخریب دارو در دستگاه گوارش و حفاظت از مواد حساس در برابر تخریب شیمیایی ناشی از نور UV نانوکپسوله می‌شوند. نانوکپسول‌ها نانوذرات پلیمری می‌باشند که از یک هسته روغنی احاطه شده توسط یک دیوار پلیمری به وسیله سورفکتانت‌ها در سطح مشترک ذرات/آب ساخته شده‌اند (Almeida et al., 2010). نانوکپسول‌ها و نانو امولسیون‌های بارگذاری شده با روتین به عنوان سیستم‌های میانی یا نهایی آبی برای توسعه نانوداروهای حاوی روتین سبب افزایش در پایداری نوری این ترکیب و فعالیت آنتی‌اکسیدانی طولانی مدت در شرایط آزمایشگاهی شده‌اند (Gullon et al., 2017).

برای مثال، روتین در جانشین‌های مختلف سیکلودکسترین کپسوله شده است تا حلالیت و سرعت انحلال دارو را افزایش دهد (Sri et al., 2007). در یک آزمایش کمپلکس روتین و بتا-دکسترین سبب افزایش پایداری و حلالیت کمپلکس به دست آمده در مقایسه با فرم آزاد شد. با این حال، کاهش جزئی در قدرت ضد باکتریایی آن مشاهده شد. علاوه بر این رهاسازی روتین از کمپلکس در یک سطح ثابت در مدت طولانی ۲۰ ساعت دو برابر بیشتر از این مقدار در فرم آزاد بود (Paczkowska et al., 2015).

اتصال گروه‌های هیدروکسی اتیل بر روی مولکول روتین برای بهبود حلالیت روتین در آب استفاده شده است. هیدروکسی اتیل روتوزیدها (HR) از لحاظ دارویی در درمان اختلالات وریدی، رگ‌های واریسی و هموروئید از اواسط دهه ۱۹۶۰ مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Gullon et al., 2017).

اگرچه روتین پایداری شیمیایی و عملکردی خوبی در عملکرد داروهای موضعی از خود نشان می‌دهد، حلالیت آن به عنوان یک عامل محدودکننده شناخته می‌شود. نانو ذرات ژلاتین حاوی روتین ممکن است نسبت به روتین آزاد از مزایایی همانند بهبود پایداری نوری، افزایش ایمنی ضد آفتاب‌ها با کاهش میزان فیلترهای شیمیایی و افزایش محتوای روتین در کرم‌های ضد آفتاب برخوردار باشد (Oliveira et al., 2016).

فیتوزوم ها (کمپلکس های فیتو-فسفولیپید) برای تحویل مواد فعال زیستی گیاهی مختلف توسعه داده شدند. فسفولیپیدها به عنوان یک مولکول آمفی پاتیک انحلال قابل توجهی در هر دو محیط آبی و لیپیدی نشان می دهند (Alexander et al., 2016). در یک بررسی به منظور توسعه یک کمپلکس فیتوزومی برای افزایش انتقال روتین، حلالیت روتین در آب از ۲/۸۸ میکروگرم بر میلی لیتر به ۴۵/۷۱ میکروگرم بر میلی لیتر افزایش یافت (Singh et al., 2012).

۳. بحث و نتیجه‌گیری

روتین یک فلاونوئید رایج در رژیم غذایی است که در میوه ها، سبزیجات و نوشیدنی های گیاهی یافت می‌شود. صدها فرمولاسیون موجود در بازار حاوی روتین در اشکال مختلف به تنهایی یا در ترکیب با دیگر عناصر فعال وجود دارند. روش‌های مرسوم و نوآورانه برای استخراج روتین از منابع طبیعی گزارش شده است که مقایسه دقیق بین این روش‌ها به دلیل تفاوت در منابع گیاهی مقدور نمی‌باشد. با این حال، طراحی تکنیک‌های استخراج سبز و پایدار جهت بهینه‌سازی استخراج روتین ادامه دارد. مطالعات متعددی به‌منظور بررسی فعالیت‌های بیولوژیکی روتین، اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد سرطانی، ضد دیابتی،

ضد میکروبی و محافظت عصبی این ترکیب فنولی را گزارش کرده اند. با این حال، اثرات مشاهده شده روتین در شرایط آزمایشگاهی به دلیل فراهمی زیستی ضعیف آن همیشه قابل تعمیم به شرایط بالینی نیست. بدین‌منظور، محققان بر روی استراتژی های مختلفی تمرکز کرده اند که سبب افزایش فراهمی زیستی روتین می‌شود. بررسی‌های اخیر اطلاعاتی در مورد مکانیسم‌های مورد استفاده برای افزایش حلالیت روتین در هر دو فاز آبی و چربی و سیستم‌های دارورسانی مبتنی بر تکنیک‌های نانوذرات، سیکلودکسترین و کمپلکس‌های فسفولیپیدی ارائه کرده است که علاوه بر افزایش حلالیت و فراهمی زیستی روتین، موجب افزایش خواص بیولوژیکی آن نیز می‌شود.

منابع

- ایرانشاهی، م.، جوادی، ب. ۱۳۹۸. اثرات نورولوژیک و محافظت عصبی گیاه بادرنجبویه با نام علمی *Melissa officinalis L.* فصلنامه کمیته تحقیقات دانشجویی. ۲۲(۶۹)، ۷۱-۶۰.
- خواجه نوری، م.، حقیقی اصل، ع.۱۳۹۳. بررسی استخراج ترکیبات طبیعی گیاهان با کمک امواج میکروویو و فراصوت. فصلنامه علوم و فناوری های نوین غذایی. ۱(۳)، ۹۱-۸۱.
- گل‌محمد، ف.، حسن ایکانی، م.، شکرالهزاده، س. ۱۳۸۷. مروری بر استخراج با آب فوق گرم و کاربرد آن در استحصال مواد موثره گیاهان دارویی. فصلنامه گیاهان دارویی. ۳(۲۶)، ۲۱-۱.

Allah Rakha, a., Nehal Umar, a., Roshina Rabail a, Masood Sadiq Butt, a., Marek Kieliszek, b., Abdo Hassoun, c., Rana Muhammad Aadil, a.2022. Anti-inflammatory and anti-allergic potential of dietary flavonoids: A review. Biomedicine & Pharmacotherapy. 156 (11): 1-10.

Almeida, J., Lima, F., da Ros, S., Bulhoes, L. O. S., de Carvalho, M. (2010). Nanostructured systems containing rutin: In vitro antioxidant activity and photostability studies. Nanoscale Research Letters. 5(10): 1603-1610.

Ameer, K., Shahbaz, H. M., & Kwon, J. H. (2017). Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food safety. 16(2): 295-315.

Alexander, A., Ajazuddin., Patel, R., Saraf, S., Saraf, Sh. 2016. Recent expansion of pharmaceutical nanotechnologies and targeting strategies in the field of phytopharmaceuticals for the delivery of herbal extracts and bioactives. Journal of Controlled Release. 241(10): 110-124.

Chen, Y.L., Duan, G.L., Xie, M.F., Chen, B., Li, Y. 2010. Infrared-assisted extraction coupled with high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of eight active compounds in Radix Salviae miltiorrhizae. Separation Science. 33(18): 2888–2897.

Cushnie, T., Lamb, J. 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents. 38(2): 99-107.

Deng, C.H., Yao, N., Wang, B., Zhang, X.M. 2006. Development of microwave-assisted extraction followed by headspace single-drop microextraction for fast determination of paeonol in traditional Chinese medicines. Journal of Chromatography A. 1103(1): 15–27.

Gullon, B., Lú-Chau,T.A., Moreira, M.T., Lema, J.M., Eibes, M. 2017. Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. Trends in Food Science & Technology. 67: 220-235.

Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., Kinoshita, T. 1998. Mode of antibacterial action of retrochalcones from Glycyrrhiza inflata. Phytochemistry. 48(1): 125-129.

Incandela, L., Cesarone, M. R., DeSanctis, M. T., Belcaro, G., Dugall, M., & Acerbi, G. 2002. Treatment of diabetic microangiopathy and edema with HR (Paroven, Venoruton; 0-(ß-hydroxyethyl)-rutosides): A prospective, placebo-controlled, randomized study. Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics. 7(1): 11-15.

Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M.G. 1994. Flavonoids as antioxidants. Journal of the American Chemical Society. 116(11): 4846–4851.

Kim, K. H., Lee, K. W., Kim, D. Y., Park, H. H., Kwon, I. B., & Lee, H. J. 2005. Optimal recovery of high-purity rutin crystals from the whole plant of Fagopyrum esculentum Moench (buckwheat) by extraction, fractionation, and recrystallization. Bioresource Technology. 96(15): 1709-1712.

Li, H., Pordesimo, L., Weiss, J. 2004. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. Food Research International. 37(7): 731–738.

Lee, Y. J., Jeune, K. H. 2013. The effect of rutin on antioxidant and antiinflammation in .64- 54: 43(2).streptozotocin-induced diabetic rats. Applied Microscopy

Mauludin, R., Müller, R. H., Keck, C. M. 2009a. Development of an oral rutin nanocrystal formulation. International Journal of Pharmaceutics. 370(2): 202-209.

Mutha, r., Tatiya, a., Surana, s. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. Future Journal of Pharmaceutical Sciences. 7(25): 1-11

Ohnishi, M., Morishita, H., Iwahashi, H., Toda, S., Shirataki, Y., Kimura, M., Kido, R. 1994. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. Phytochemistry. 36(3): 579–583.

Oliveira, C. A., Peres, D. D., Graziola, F., Chacra, N. A. B., de Araújo, G. L. B., et al. 2016. Cutaneous biocompatible rutin-loaded gelatin-based nanoparticles increase the SPF of the association of UVA and UVB filters. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 81(1): 1-9.

Paczkowska, M., Mizera, M., Piotrowska, H., Szymanowska-Powałowska, D., Lewandowska, K., Goscianska, J., et al. 2015. Complex of Rutin with β-Cyclodextrin as Potential Delivery System. Plos one. 10(3): 1-16.

Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Solmajer, T., & Jerala, R. 2003. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. Biochemical and Biophysical Research Communications. 306(2), 530e536.

Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., & Zhang, L. 2003. Flavonoids: Promising anticancer agents. Medicinal Research Reviews. 23(4): 519-534.

Saklani, R., Gupta, S. K., Mohanty, I. R., Kumar, B., Srivastava, S., & Mathur, R. 2016. Cardioprotective effects of rutin via alteration in TNF-a, CRP, and BNP levels coupled with antioxidant effect in STZ-induced diabetic rats. Molecular and Cellular Biochemistry. 420(2): 65-72.

Sando, C.E., Lloyd, J.U., 1924. The isolation and identification of rutin from the flowers of elder (Sambucus canadensis L.). Journal of Biological Chemistry. 737–745.

Sharma, S., Ali, A., Ali, J., Sahni, J. K., & Baboota, S. 2013a. Rutin: Therapeutic potential and recent advances in drug delivery. Expert Opinion on Investigational Drugs. 22(80): 1063-1079.

Singh, D., Rawat, M. S., Semalty, A., Semalty, M. 2012. Rutin-phospholipid complex: An innovative technique in novel drug delivery system-NDDS. Current Drug Delivery. 9(3): 305-314.

Singh, M., Govindarajan, R., Rawat, K., & Khare, P. B. 2008. Antimicrobial flavonoid rutin from Pteris vittata L. against pathogenic gastrointestinal microflora. American Fern Journal. 98(2): 98-103.

Soni, H., Malik, J., Singhai, A. K., Sharma, S. 2013. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of the hydrogels containing rutin delivery. Asian Journal of Chemistry. 25: 8371-8373.

Sri, K. V., Kondaiah, A., Ratna, J. V., & Annapurna, A. 2007. Preparation and characterization of quercetin and rutin cyclodextrin inclusion complexes. Drug Development and Industrial Pharmacy. 33(3): 245-253.

Thoo, Y. Y., Ho, S. K., Abas, F., Lai, O. M., Ho, C. W., & Tan, C. P. 2013. Optimal binary solvent extraction system for phenolic antioxidants from Mengkudu (Morinda citrifolia) fruit. Molecules. 18(6): 7004-7022.

Yang, Y., Zhang, F. 2008. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from Euonymus alatus (Thunb.) Sieb. Ultrasonics Sonochemistry. 15(4): 308–313.

Zhao, Y., Bao, C., Mason, T.J. 1991. A study of the isolation of effective compositions from traditional Chinese medicinal plants. In: Ultrasonics International 91 Proceedings. Butterworths. 87–90.

A review of extraction methods, biological activities and bioavalibility enhancement strategies of rutin

Shahaboudin khosravi [1*], Seyed Ali Andi [2]

[1*] M.Sc. degree student, Department of Horticulture, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari

[2] Assistant Professor, Faculty of Medicinal Plants, Amol University of Special Modern Technologies, Amol

Abstrac

Flavonoid rutin is a common phenolic compound in the diet, which has attracted a lot of attention due to its valuable medicinal properties such as anti-microbial, anti-inflammatory, anti-cancer, and anti-diabetic. Currently, more than 860 products containing rutin are marketed in the United States. The medicinal activity of rutin in clinical conditions is less efficient when compared with that of laboratory conditions. It could be attributed to its limited solubility in both aqueous and lipid phases, as well as low bioavailability in clinical conditions. Therefore, it is necessary to discover and design new techniques to increase the bioavailability of the latter compound. The use of suitable systems for the delivery of rutin or its enzymatic or chemical transformation into highly soluble derivatives to improve its bioavailability potential in parallel to preserve the biological properties of this compound can lead us to promising conclusions in the treatment of different chronic diseases. In this review article, appropriate methods for increasing the bioavailability of this compound, suitable extraction methods and its biological activities, are discussed.

Keywords: Rutin, Extraction, Biological Activities, Bioavailability

[*]Shahab1375khosravi@gmail.com

مطالعه اثر کاتچین هیدرات بر سلولهای بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تیمار شده با دی ۲-اتیل هگزیل فتالات

زهرا احمدی[۱]*، محمدحسین آبنوسی[۲]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک
[۲] دانشیار بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک

چکیده:

سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان (BMSCs[3])، سلول‌هایی باقابلیت تقسیم و تمایز می‌باشند که پیش ساز استئوبلاست‌ها و مسئول تولید ماتریکس استخوان هستند. انسان از طریق غذا، آب و تماس با تجهیزات پزشکی، در معرض DEHP قرار می‌گیرد. DEHPاز طریق خون محیطی BMSCs را آلوده و با القاء استرس اکسیداتیو، باعث اختلال در عملکرد این سلولها و در نتیجه کاهش جمعیت سلول‌های استئوبلاست میشود.کاتچین هیدرات (CH) به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی، میتواند این سلول‌ها را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت نماید. روش کار: BMSCs بعد از کشت، به مدت ۹۶ ساعت با غلظت‌های منتخب ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP و ۰/۲۵ میکرومولار CH تیمار و خودنوزائی و توانائی تکثیر، میزان پروتئین سلولی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (CAT، SOD)، میزان پر اکسیداسیون لیپید و توانایی آنتی‌اکسیدان کل اندازه‌گیری شد. نتایج: داده‌ها نشان داد که DEHP باعث کاهش توانایی زیستی و تکثیری BMSCs و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد. همچنین DEHP باعث افزایش میزان MDA وکاهش توان آنتی اکسیدانی کل شد. غلظتهای کم CH هیچگونه اثر نامطلوبی بر توان زیستی سلول‌ها نداشت اما غلظت ۰/۲۵ میکرومولار بیشترین اثر معنی دار افزایشی را بر توان تکثیری سلول‌ها نشان داد. نتایج این تحقیق نشان داد که CH باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و توان آنتی اکیسدانی کل شد. تیمار همزمان، CH توانست اثر سمی DEHP را مرتفع نماید ولی این جبران نتوانست اثر نامطلوب DEHP را کاملا در مقایسه با گروه کنترل بهبود بخشد. نتیجه‌گیری: تیمار ۹۶ ساعت CH برای مقابله با اثر سمی DEHP کافی نیست لذا تیمار با CH در طولانی مدت پیشنهاد میشود.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان، دی-۲-اتیل هگزیل فتالات، کاتچین هیدرات

mzargolahmadii1996@gmail.com

[3] Bone marrow mesenchymal stem cells

۱.مقدمه:

سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان (BMSCs) سلول‌های بنیادی بالغی هستند که قابلیت خود نوسازی و تمایز به انوع سلول-های استئوبلاست، کندروسیت و ادیپوسیت را دارند (Lin, 2012). وجود سلول های بنیادی مزانشیم در بافت هایی نظیر بافت چربی، پرده سینوویال ، عضله اسکلتی، پوست، استخوان ترابکولار، بند ناف، ریه، پالپ دندان، مایع آمنیوتی، کبد جنینی، پرزهای کوریونی جفت و حتی خون محیطی نیز گزارش شده است(Bobis, et al., 2006) . این سلول‌ها بعنوان پشتیبان سلولی برای استئوبلاست‌ها، نقش مهمی در حفظ هموستاز استخوان دارند، لذا این سلول‌ها با تمایز به سلول‌های استئوبلاست باعث جایگزینی ماتریکس استخوان شده و از پوکی استخوان جلوگیری می کند (Abnosi and Aliyari Babolghani,2022; De sousa, et al., 2014).

فتالات ها گروه متنوعی از استرهای فتالیک اسید هستند که از نظر طول و انشعاب زنجیره های جانبی آلکیل با یکدیگر متفاوت می باشند. فتالات های با زنجیره کوتاه به عنوان حلال و حامل در انواع محصولات مراقبت شخصی، از جمله لوسیون‌ها، عطرها، شامپوها، اسپری‌های مو و آرایش استفاده می‌شوند. فتالات‌های با زنجیره بلند، اغلب به عنوان نرم کننده در تهیه تجهیزات پزشکی ساخته شده از پلی وینیل کلراید (PVC) مانند: لوله های انتقال خون، کیسه های خون، کیسه های ادرار، سرم و محصولات فرعی استفاده میشود زیرا PVC، انعطاف ناپذیر بوده و محصولات آن خشک و شکننده است، از این نظر برای افزایش انعطاف پذیری PVC به آن فتالات اضافه میکنند(Panagioto, et al., 2021; Sampson and De Korte, 2011).

از آنجا که هیچ پیوند کوالانسی بین فتالات‌ها و پلاستیک ایجاد نمیشود، فتالات‌ها به راحتی و با تغییر دما یا قرار گرفتن در معرض حلال‌ها، از پلاستیک جدا شده و به محیط زیست وارد میگردند به طوری که امروزه این ترکیبات به عنوان آلاینده های زیست محیطی در نظر گرفته شده و عامه مردم در مواجه مکرر با آن قرار دارند(Pradhan, et al., 2018). انسان از طریق بلع، استنشاق و پوست در معرض این ترکیبات قرار می گیرد(Latini, 2005). از بین ۲۵ نوع مختلف از فتالات‌ها میتوان دی (۲-اتیل هگزیل) فتالات (DEHP)، دی ایسونونیل فتالات (DINP)، دی بوتیل فتالات (DBP)، دی متیل فتالات (DMP)، دی اتیل فتالات (DEP) را به عنوان رایج‌ترین اعضای این خانواده نام برد که در صنعت استفاده زیادی از آنها میشود (Pradhan, 2018; Panagiotou, et al., 2021). DEHP بعنوان یکی از پرکاربرد ترین اعضای خانوده فتالات‌ها در تحقیقات بیشتر مورد بررسی قرار گرفته است زیرا تصور میشود که متابولیت‌های حاصل از تجزیه آن سمی تر از خود DEHP است(Erythropel, et al., 2014). با توجه به اینکه DEHP ازنظر شیمیایی به پلیمر متصل نمی‌شود، می‌تواند از طریق آب، غذا و حتی در صورت استفاده از وسایل پزشکی باعث آلودگی انسان شود (Elsisi, et al., 1985; Bornehag, et al., 2004). تحقیقات صورت گرفته در اواخر دهه ۱۹۶۰ وارد شدن DEHP به بدن از طریق تجهیزات پزشکی را نشان داده است (Gimeno, et al., 2014). در درمان‌های پزشکی مثل همودیالیز، تغذیه روده ای، انتقال خون و فراورده های خونی در بیمارانی که مجبور به گرفتن خون بطور دائم هستند (بیماران تالاسمی و کم خونی داسی شکل و ...) بیمارانی که باید پلاسما دریافت کنند مثل TTP[1] در معرض آلودگی به دوز بالایی از

[1] Thrombotic Thrombocytopenic Purpura

DEHP قرار میگیرند(Sampson and De Korte, 2011). در مطالعه ی صورت گرفته که در سال ۲۰۱۵ بر روی بیماران بستری در بخش‌های پیوند مغز استخوان، افزایش حدود ۵۰۰ برابری غلظت DEHP در سرم خون این افراد را گزارش کرد. مطالعات انجام شده، غلظت DEHP در خون و محصولات خونی که در کیسه‌های پلاستیکی نگهداری میشوند را ۵۲/۶ تا ۵۵/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کرده است. که این غلظت به مدت زمان نگهداری وابسته است. ارزیابی های صورت گرفته برای تعیین میانگین DEHP موجود در خون پس از نگهداری در کیسه‌های پلاستیکی به مدت دو هفته، ۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بعد از سه هفته ۴۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان می‌دهد. نتایج مطالعه آبنوسی و علی یاری با عنوان تأثیر DEHP بر روی توانائی زیستی سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP طی ۴۸ ساعت هیچ تاثیری در زنده ماندن سلول‌ها نداشته است.در صورتی که با افزایش مدت زمان تیمار، این ترکیب باعث کاهش توانایی حیات و PDN[1] در سلول‌های مورد بررسی شد. این یافته ها نشان دهنده عدم تاثیر سمی این غلظت از DEHP در کوتاه مدت و افزایش تاثیر سمی آن در دراز مدت است. این نتایج بیان کننده این موضوع است که غلظت‌های کم در طولانی مدت میتوانند تهدیدی برای توانایی حیات سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان باشد(Abnosi and Aliyari Babolghani, 2022). همچنین در راستای تایید اثرات سمی DEHP، آبنوسی و همکاران در سال ۲۰۲۳ اثر غلظت‌های متفاوت DEHP بر سیکل سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان را مورد بررسی قرار دادند. مشاهد شد که DEHP در دراز مدت علاوه برایجاد اختلال در میزان پروتئین و الکترولیت‌ها، این آلاینده زیست محیطی باعث القای استرس اکسیداتیو نیز شده است. بررسی چرخه سلولی نیز نشان داد که این ترکیب سبب توقف چرخه سلولی سلول‌های تیماری در مرحله G1 میشود و از طریق فعال سازی فاکتور آپوپتوزی p53 علاوه بر مهار چرخه سلولی، باعث فعال شدن پروکاسپازهای ۳و۹ و در نهایت القای آپوپتوز از طریق مسیر داخلی شده است. در این مطالعه ارزیابی آسیب دیدگی DNA با استفاده از آزمون کامت ، درجات مختلفی از شکستگی DNA را در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف DEHP نشان داد (Abnosi,et al., 2023) . به دلیل ارتباط مستقیم سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان با خون محیطی، آلوده شدن به DEHP و مسموم شدن قابل پیشبینی است. که در این صورت خود نوزائی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان تحت تأثیر DEHP قرار میگیرد و با کاهش جمعیت سلول‌های استئوبلاست، فرد ممکن است دچار پوکی استخوان[2] شودکه یک مشکل بالینی روبه رشد است و بروز آن در جهان در حال افزایش است(Abnosi and Babolghani 2020; Abnosi and Babolghani, 2022) . فلاونوئیدها یک گروه از متابولیت‌های ثانویه گیاهان میباشند که بطور گسترده در بعضی گیاهان یافت میشود. فلاونوئیدها را می توان بر اساس ساختار و موقعیت حلقه هتروسیکلیک به شش گروه فلاون ها، فلاوانون‌ها، ایزوفلاون‌ها، فلاونول‌ها، فلاوانول‌ها و آنتوسیانینها تقسیم بندی نمود. حدود ۲۵ درصد وزن خشک برگ سبز چای را فلاوانول‌ها (Flavanols) تشکیل میدهند. قسمت اعظم فلاوانول‌ها را در برگ سبز چای، موادی به نام کاتچین‌ها (Catechins) تشکیل میدهند که برخی خواص چای مانند خاصیت ضد میکروبی، ضدسرطانی، ضدمیکربی و آنتی اکسیدانی به همین ترکیبات

[1] Papulation doubling number
[2] Osteoprosis

برمیگردد(Romagnolo and Selmin, 2012; Wranicz and Szostak-Wegierek, 2014) .کاتچین ها دارای خواص آنتی اکسیدانی قوی، جاذب گونه های اکسیژن فعال (ROS) و کلاته کننده یون‌های فلزی هستند. کاتچین ها به دلیل خواص آنتی اکسیدانی خود میتوانند با حذف رادیکال های آزاد واکنش های زنجیره ای رادیکال‌های آزاد را متوقف کرده و از اکسید شدن لیپیدهای سلولی جلوگیری کنند(Bernatoniene and Kopustinskiene, 2018). یکی از انواع کاتچین‌ها، کاتچین هیدرات با فرمول مولکولی C15H16O7 و وزن مولکولی ۲۹۰/۲۷ گرم بر مول است. در راستای تایید اثرات آنتی اکسیدانی کاتچین هیدرات، آبنوسی و منصوری در سال ۲۰۱۷ با بررسی تاثیر کاتچین هیدرات روی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان نشان دادند که تیمار سلول‌ها با دوز۴۰۰ میکرومولار کاتچین هیدرات با افزایش توان آنتی اکسیدانی سلول، باعث کاهش میزان محتوای مالون دی آلدئید و افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز گروه تیماری نسبت به گروه کنترل شد(Abnosi and Mansoori, 2017). در سال ۲۰۲۱ آبنوسی و همکاران مطالعه ای درمورد تاثیر کاتچین هیدرات بر تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت انجام دادند. در این مطالعه بررسی ژن‌های ALP، BMP2،BMP7، SMAD1، RUNX2، OC و ON نشان داد که تیمار با کاتچین هیدرات به مدت ۲۱ روز باعث افزایش بیان ژن‌های دخیل در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان به استئوبلاست گردید(Abnosi, et al .,2022). با توجه به اهمیت BMSCs در سلامت استخوان، در مطالعه حاضر توان محافظتی کاتچین هیدرات در جبران اثر اکسیداتیو DEHP بر این سلول‌ها موردبررسی قرار گرفته است. در این مطالعه توان‌زیستی و تکثیری، همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در حضور DEHP بررسی و از طرفی توانایی کاتچین هیدرات در افزایش میزان توان آنتی‌اکسیدانی کل سلول و افزایش توان سلول در مقابله با استرس اکسیداتیو ناشی از DEHP مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲ مواد و روش‌ها:

برای مطالعات و بررسی‌ها در این پژوهش از رت های نر نژاد ویستار دوماهه که تحت شرایط استاندارد دما، تغذیه و نور مناسب نگهداری شدند استفاده‌شده است.

۲-۱ کشت سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان:

برای جداسازی و کشت سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان ابتدا در شرایط استریل استخوان ران و ساق جدا گردید. بعد از جدا کردن بافت های پیوندی، استخوان‌ها به فالکون حاوی محیط کشت کامل (DMEM+penicillin and streptomycin+15%FBS[1]) با حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. در اتاق کشت ، زیر هود لامینار با قیچی استریل دو سر استخوان‌ها قطع و به‌وسیله محیط کشت کامل با عمل شست‌وشو، مغز استخوان را خارج و به ۳ میلی‌لیتر محیط کشت کامل انتقال داده شد. پس از پیپتاژ کردن محیط کشت حاوی مغز استخوان، فالکون به مدت ۵ دقیقه در سانترفیوژ

[1] Fetal Bovine Serum

با دور ۶۹۰ (g) قرار گرفت. مایع رویی را خارج کرده و به رسوب حاصل ۱میلی‌لیتر محیط کشت DEMEM حاوی ۱۰ درصد FBS ، پنی‌سیلین و استرپتومایسین اضافه و در فلاسک T25 مخصوص کشت سلول به انکوباتور با شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO2 5% و دارای رطوبت منتقل شد. بعدازاینکه سلول‌ها کف فلاسک را پر کردند، عمل پاساژ انجام شد. برای عمل پاساژ سلول‌های چسبیده به کف فلاسک را با تریپسین EDTA[1] جدا و به فلاسک های جدید منتقل شدند. طی پاساژ، سلول‌ها به خلوص ۹۲٪ (با توجه به بررسی‌های فلوسایتومتری) رسید و برای انجام آزمون‌ها استفاده شد.

۲-۲ انتخاب دوز مؤثر:

با توجه به مطالعات آبنوسی و علیاری در سال ۲۰۲۲ از غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP برای بررسی تأثیر این آلاینده بر توانائی خود نوزائی سلول‌های مورد بررسی به مدت ۴ روز استفاده شد. از طرفی با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از توانائی زیستی و توانائی تکثیری، غلظت ۰/۲۵ میکرومولار کاتچین هیدرات(CH) که بیشترین توانایی تکثیر سلولی را داشت برای بررسی اثر مهارکنندگی DEHP استفاده شد. گروه‌های آزمایشی با سه تکرار برای هر آزمون به ترتیب زیر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

گروه اول (Control): سلول‌ها تنها با محیط کشت کامل بدون حضور DEHP یا CH تیمار شدند.

گروه دوم (DEHP): سلول‌ها با محیط کشت کامل در حضور DEHP تیمار داده شدند.

گروه سوم (CH): سلول‌ها با محیط کشت کامل در حضور کاتچین هیدرات تیمار داده شدند.

گروه چهارم تیمار همزمان (DEHP+CH): سلول‌ها به‌صورت همزمان با محیط کشت کامل و غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP به همراه ۰/۲۵ میکرومولار کاتچین هیدرات تیمار داده شدند.

۲-۳ اندازه‌گیری زنده‌مانی سلول‌ها بر اساس آزمون تریپان بلو:

در هر چاهک پلیت ۹ خانه تعداد ۵۰۰۰۰ سلول به مدت ۲۴ ساعت برای چسبیدن سلول به کف پلیت کشت داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت محیط رویی سلول‌ها خارج و محیط کشت کامل جدید حاوی غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰۰ میکرومولار DEHP و غلظت ۰/۲۵ میکرومولار کاتچین هیدرات به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از ۴ روز محیط رویی خارج و سلول‌ها با PBS شستشو شدند، سپس چاهک‌ها تریپسینه و با محیط کشت کامل خنثی شدند. به ۱۰میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی به نسبت ۱:۱ رنگ تریپان بلو ۰/۴ درصد اضافه گردید. پلیت ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سلول‌ها به‌وسیله لام نئوبار شمارش و تعداد سلول‌های مرده (آبی‌رنگ) و سلول‌های زنده (بی‌رنگ) مشخص گردید. درصد زنده‌مانی سلول‌ها در هر غلظت با استفاده از فرمول زیر و با توجه به ضریب رقت (2X) محاسبه گردید.

$$\text{درصد توانایی زیستی} = \frac{\text{تعداد سلول زنده}}{\text{تعداد کل سلول}} \times 100$$

[1] Ethylene Diamine Tetra Acetic acid

۲-٤ بررسی توان تکثیری سلول‌ها بر اساس دو برابر شدگی جمعیت (PDN)[1]:

دو برابر شدگی جمعیت به‌صورت عددی میانگین کل جمعیت را بیان کرده و نشان‌دهنده سرعت‌های مختلف تقسیم است. تعداد ۵۰۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی سلول‌ها تخلیه و محیط کشت کامل همراه غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP، ۰/۲۵ میکرومولار کاتچین هیدرات، و مخلوط غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP و ۰/۲۵ میکرومولار کاتچین هیدرات به سلول‌ها اضافه شد. هر سه روز یک‌بار به مدت ۹۶ ساعت محیط کشت تعویض گردید. سلول‌ها تریپسینه و شمارش شدند. با استفاده از فرمول زیر دو برابر شدگی جمعیت اندازه‌گیری شد. در فرمول زیر N تعداد سلول‌ها بعد از شمارش و .N تعداد سلولهای اولیه است.

$$PDN=(\log N/N. \times 3.31)$$

۲-۵ تیمار و استخراج عصاره سلولی:

سلول‌های پاساژ سه در فلاسک T25 کشت و پس از ۹۶ ساعت تیمار، دو بار با بافر Tris-HCl-NaCl شستشو، سپس تریپسینه و به اپندورف منتقل شد. برای لیز کردن سلول‌ها از روش انجماد و ذوب استفاده و با دور ۱۰۲۰۰(g)، ۱۰ دقیقه سانترفیوژ و برای بررسی‌های بعدی از محلول رویی حاوی عصاره سلولی استفاده شد.

۲-٦ اندازه‌گیری میزان پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش لاوری:

برای بررسی میزان فعالیت آنزیمی سلول ابتدا با استفاده از روش لاوری میزان پروتئین نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. ازسرم آلبومین گاوی[2](BSA) به‌عنوان استاندارد لاوری استفاده شد.

برای ساخت محلول لاوری در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر، ۰/۴ گرم سود و ۲ گرم سدیم کربنات حل شد. در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر ۰/۱ گرم سولفات مس حل گردید. در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر ۰/۲ گرم سدیم پتاسیم تارتارات حل شد. برای تهیه محلول کمپلکس لاوری به ۹۸ میلی‌لیتر از محلول مرحله اول، ۱ میلی‌لیتر از محلول مرحله دوم و ۱ میلی‌لیتر از محلول مرحله سوم اضافه شد.

به هر لوله‌آزمایش حاوی ۱۰۰ میکرولیتر عصاره سلولی، ۵ میلی لیتر از محلول واکنش اضافه و ۱۰دقیقه در تاریکی قرار داده شد. سپس معرف فولین سیکالتیوکه به نسبت ۱:۱ با آب مقطر رقیق شده به آن اضافه گردید و مجددا لوله ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. جذب هر نمونه را با دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۵۰ نانومتر خوانده و پس از رسم نمودار استاندارد از فرمول

[1] Population Doublling Number
[2] Bovine serum albumin

خطی Y=0/0015X + 0/0224 با R^2=0/9984 برای محاسبه غلظت پروتئین در نمونه‌ها استفاده شد. مقداری از نمونه‌ها که حاوی غلظت مساوی پروتئین بود برای آنالیزهای بعدی استفاده شد.

۲-۷اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD):

SOD آنزیمی است که واکنش تجزیه رادیکال سوپر اکسید و تولید پراکسید هیدروژن را تسهیل می‌کند. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم مطابق روش Giannopolitis انجام شد. برای ساخت محلول واکنش ابتدا حاوی ۱/۹ میلی‌گرم متیونین، ۷/۹ میلی‌گرم ریبوفلاوین ، ۶/۱ میلی‌گرم نیتروبلوتترازولیوم و ۳/۳ میلی‌گرم EDTA هرکدام به‌صورت جداگانه در حداقل بافر فسفات پتاسیم حل شدند

درنهایت محلول‌ها باهم ترکیب‌شده و حجم نهایی محلول به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. عصاره سلولی به همراه ۱میلی‌لیتر از محلول واکنش در لوله‌آزمایش ترکیب شد. کنترل و شاهد این آزمون محلول فاقد عصاره بود. نمونه شاهد در تاریکی و سایر نمونه‌ها به مدت ده دقیقه در اتاقک نور قرار داده شدند. جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز برحسب یک واحد در دقیقه به ازای یک میلی‌گرم از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{فعالیت سوپراکسیددیسموتاز} = \frac{\text{OD کنترل} - OD \text{ نمونه}}{OD \text{ کنترل}}$$

فعالیت یک واحد آنزیم برابر با مقدار آنزیمی که از احیای ۵۰٪ نیتروتترازولیوم جلوگیری می‌کند در نظر گرفته شد.

۲-۸اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT):

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از این نظر حائز اهمیت است که هیدروژن پراکسید توسط آنزیم کاتالاز تجزیه می‌شود. جذب H2O2در بافر PBS در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر در ۰/۴ تنظیم و نقطه شروع اندازه‌گیری سرعت واکنش در نظر گرفته شد. به لوله‌آزمایش ۵۰ میکرولیتر از عصاره سلولی، ۲۰۰ میکرولیتر بافر PBS و ۳۰۰ میکرولیتر H2O2 اضافه شد. با اضافه کردن نمونه‌ها پس از گذشت ۲ دقیقه سرعت حذف H2O2 اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس سرعت مصرف پراکسید هیدروژن در دقیقه و با استفاده از فرمول زیر و ضریب خاموشی $mM^{-1}\ cm^{-1}$ ۳۹/۴ محاسبه شد.

$$\text{فعالیت کاتالاز} = \frac{\text{اختلاف جذب}}{39/4}$$

۲-۹اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA):

به عصاره سلولی ۱ میلی‌لیتر محلول‌تری کلرو استیک اسید ۲۰٪ حاوی تیوباربیتوریک اسید ۵٪ اضافه شد. ترکیب حاصل در حمام آبگرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. لوله‌های آزمایش حاوی نمونه را از حمام آبگرم خارج کرده و سریعاً ده دقیقه در یخ قرار داده شدند. نمونه‌ها ده دقیقه با دور ۶۹۰ (g) سانترفیوژ شدند. در طول‌موج ۵۲۳ نانومتر

جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. چون در طول‌موج ۵۲۳ نانومتر بعضی از ترکیبات به عنوان ترکیبات مزاحم جذب دارند، پس جذب محلول در ۶۰۰ نانومتر نیز خوانده و از جذب خوانده شده در ۵۲۳ نانومتر کم شد. این جذب بر اساس تشکیل کمپلکس تیوباربیتوریک-مالون دی آلدئید است. غلظت کمپلکس تیوباربیتوریک اسید-مالون دی آلدئید از فرمول $A = \varepsilon bc$ و ضریب خاموشی $\varepsilon = ۱۵۵\ mmol^{-۱}\ cm^{-۱}$ برحسب میکرومولار محاسبه گردید.

۲-۱۰ اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) بر اساس روش FRAP:

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل با استفاده از روش Benzie and Strain اندازه‌گیری شد. در لوله‌آزمایش ۱۵۰ میکرولیتر عصاره سلولی، ۸۵۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر و ۱۷۰۰ میکرولیتر محلول واکنش FRAP ریخته شد. برای ساخت محلول واکنش ابتدا سه محلول زیر به‌صورت جداگانه تهیه و با نسبت ۱:۱:۱ یکدیگر مخلوط شدند: محلول اول (بافر استات سدیم ۳۰۰ میلی مولار): ۰/۷۳ گرم استات سدیم در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر حل‌شده و pH روی ۳/۶ تنظیم شد. محلول دوم (TPTZ):

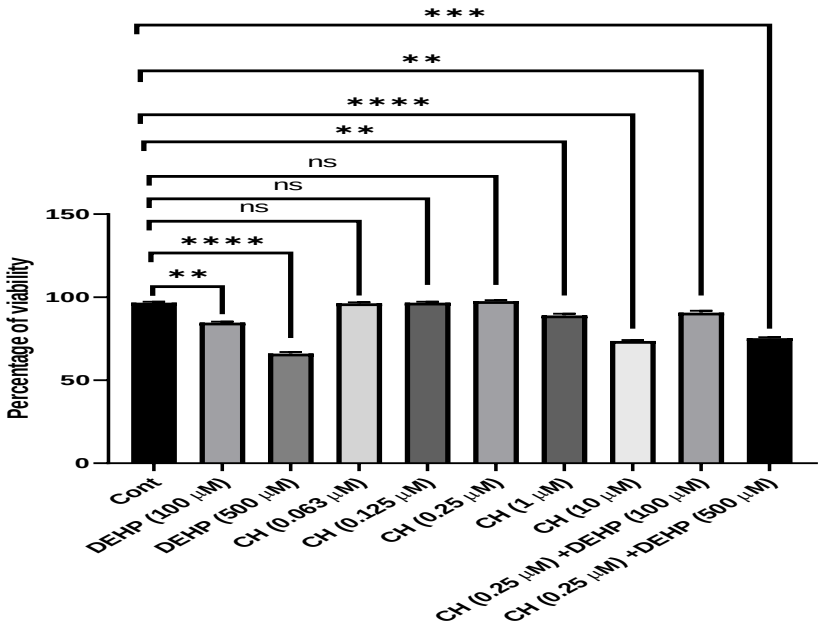
در محلول ۴۰ میلی مولار اسیدکلریدریک (در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر ۰/۰۳۲ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک حل شد)، ۰/۰۰۳۱ گرم TPTZ حل شد. محلول سوم (محلول کلرید آهن ۲۰ میلی مولار): ۰/۰۰۵۴گرم کلرید آهن در ۱ میلی‌لیتر آب حل شد.

لوله‌ها ۱۰ دقیقه در تاریکی قرارگرفته سپس جذب نمونه‌ها در۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از رقت‌های مختلف سولفات آهن پس از رسم منحنی استاندارد با استفاده از فرمول خطی $Y=0/0059X + 0/0552$ با $R^2=0/9982$ میزان آنتی‌اکسیدان کل نمونه‌های تیماری برحسب میکرو مول آهن/ میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

۳. نتایج:

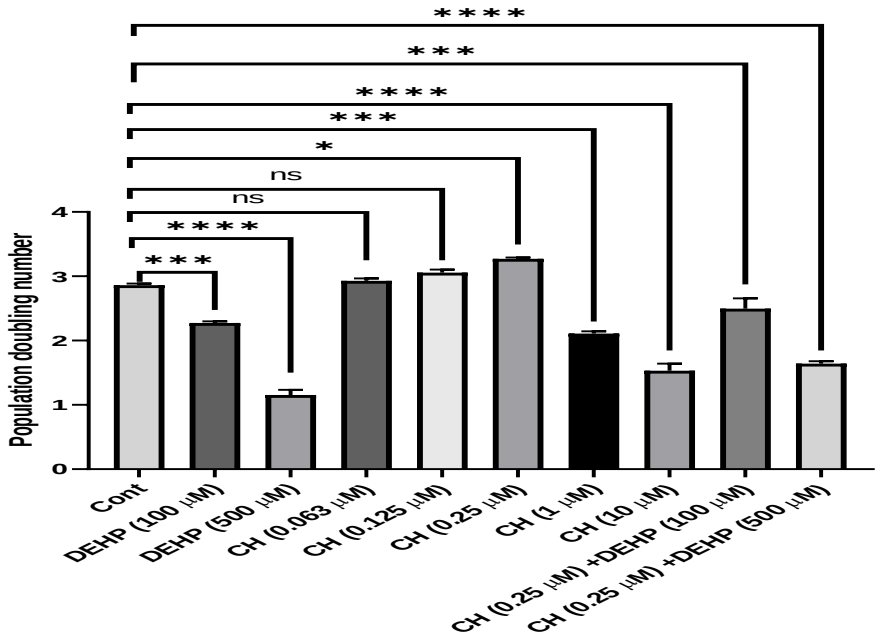
۳-۱ تأثیر کاتچین هیدرات و DEHP بر زنده‌مانی و توانائی تکثیر سلول‌ها:

همان‌طور که در نمودار۱ مشاهده می‌شود نتایج حاصل از آزمون تریپان بلو نشان داد تیمار با DEHP در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌ها شده که این کاهش معنی دار ($p<0.05$) وابسته به دوز میباشد. از طرفی تیمار با کاتچین هیدرات در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که غلظت‌های ۰/۰۶۳، ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ هیچ‌گونه تأثیر معنی داری ($p>0.05$) بر توانائی زیستی BMSCs نداشته است، این در حالی است که غلظت‌های ۱و ۱۰ میکرومولار باعث کاهش معنی‌دار توانائی زیست سلول‌ها شد. تیمار سلول‌های با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار کاتچین هیدرات و ۱۰۰ میکرومولار DEHP توانست اثر سمی این آلاینده را کاهش دهد. این در حالی است که در تیمار هم‌زمان غلظت ۰/۲۵ میکرومولار کاتچین هیدرات و ۵۰۰ میکرومولار DEHP اثر جبرانی مشاهده نشد.



نمودار ۱. نتایج حاصل از آزمون تریپان بلو.

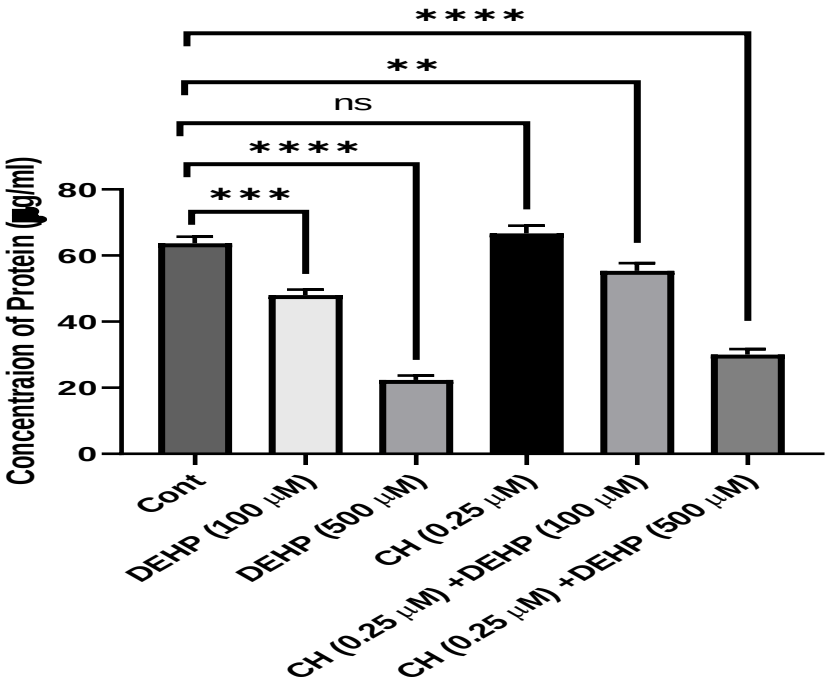
از طرفی آزمون دو برابر شدگی جمعیت (نمودار۲) نشان داد بالاترین میزان توانایی زیستی سلول در تیمار با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار از کاتچین هیدرات بوده است. لذا با توجه به نتایج حاصل از آزمون تریپان بلو و PDN، غلظت ۰/۲۵ میکرو مولار از کاتچین هیدرات برای بررسی توان این متابولیت ثانونه در کاهش اثر اکسیداتیو غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار انتخاب گردید.



نمودار۲. نتایج حاصل از آزمون PDN.

۳-۳ اندازه‌گیری میزان پروتئین:

تیمار سلولها با غلظتهای مختلف DEHP در مقایسه با کنترل باعث کاهش معنی داری ($p<0.05$) میزان پروتئین سلولی به‌صورت وابسته به دوز شد. از طرفی گروه تیمار شده با کاتچین هیدرات در مقایسه با گروه تیمار شده با DEHP باعث افزایش میزان پروتئین سلول‌ها گردید این درحالیست که در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی داری ($p>0.05$) مشاهده نشد. تیمار سلول‌ها بصورت همزمان، با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار کاتچین هیدرات و ۱۰۰ میکرومولار DEHP باعث کاهش اثر این آلاینده زیست محیطی در مقایسه با گروه های تیماری با DEHP شد ولی نتوانست در مقایسه با گروه کنترل اثر سمی DEHP را مرتفع سازد (نمودار۳).

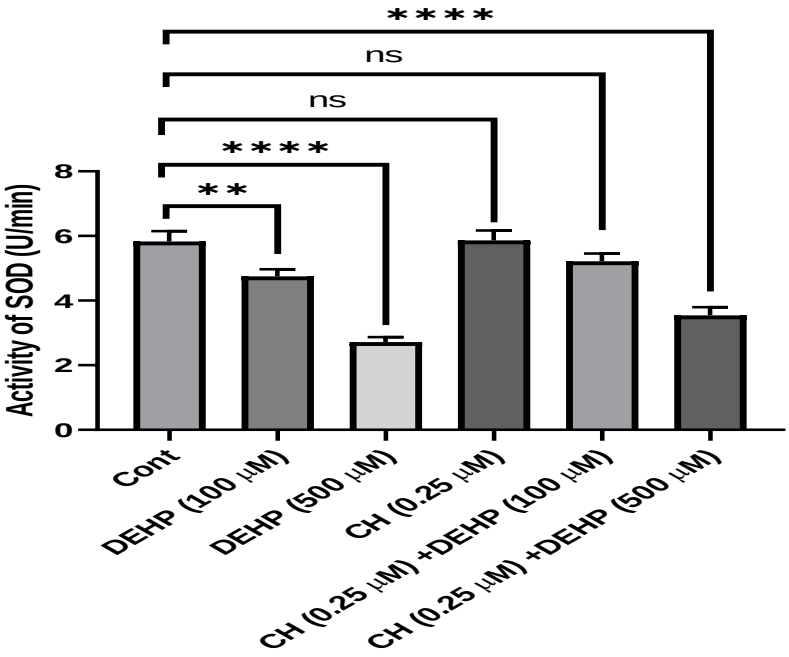


نمودار۳. اندازه‌گیری میزان پروتئین سلولی به روش لاوری.

۳-٤اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز:

همان‌طور که در نمودار ۴ مشادهد میشود گروه تیمار شده با غلظتهای مختلف DEHP در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش معنی دار ($p<0.05$) فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز گردید. از طرفی، اگر چه تیمار با کاتچین هیدرات در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی داری نداشته است ولی این آنتی اکسیدان طبیعی در تیمار همزمان با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار DEHP توانست اثر این آلاینده زیست محیط را مرتقع سازد، بصورتی که تغییر آن در مقایسه با گروه تیمار شده با ۱۰۰ میکرو مولار DEHP معنی

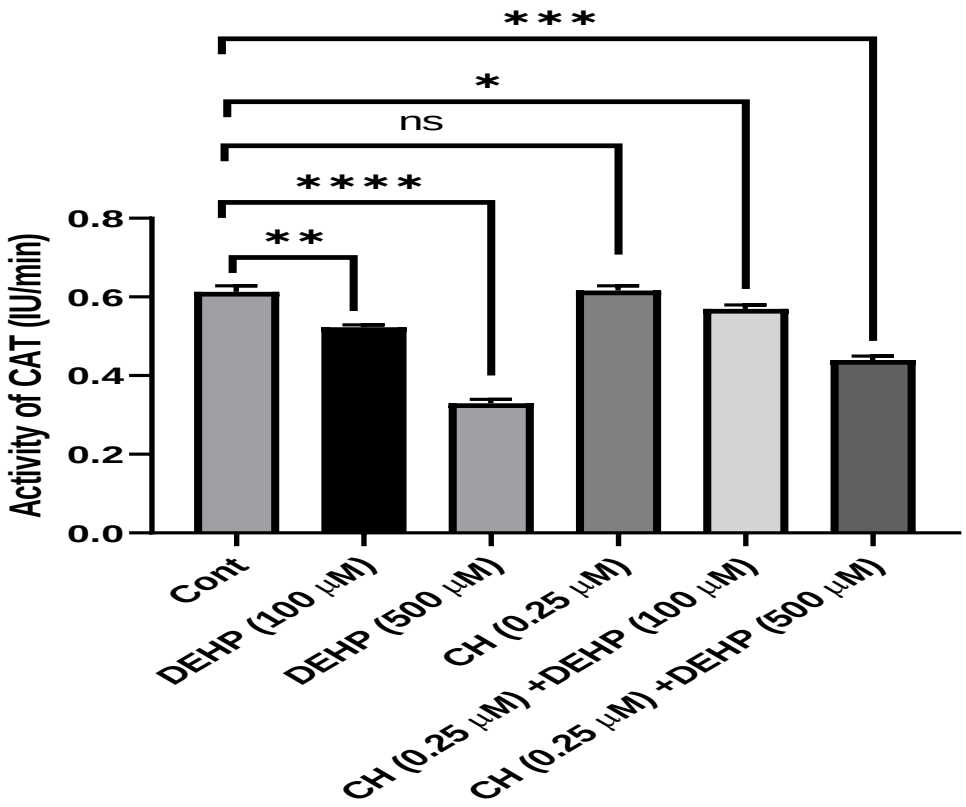
دار ($p<0.05$) و با گروه کنترل غیر معنی دار ($p>0.05$) میباشد.از طرفی آنالیز داده ها نشان داد کاتچین هیدرات ننوانسته است اثر غلظت ۵۰۰ میکرو مولار DEHP را مرتفع سازد.



نمودار۴. فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز.

۳-۵اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز:

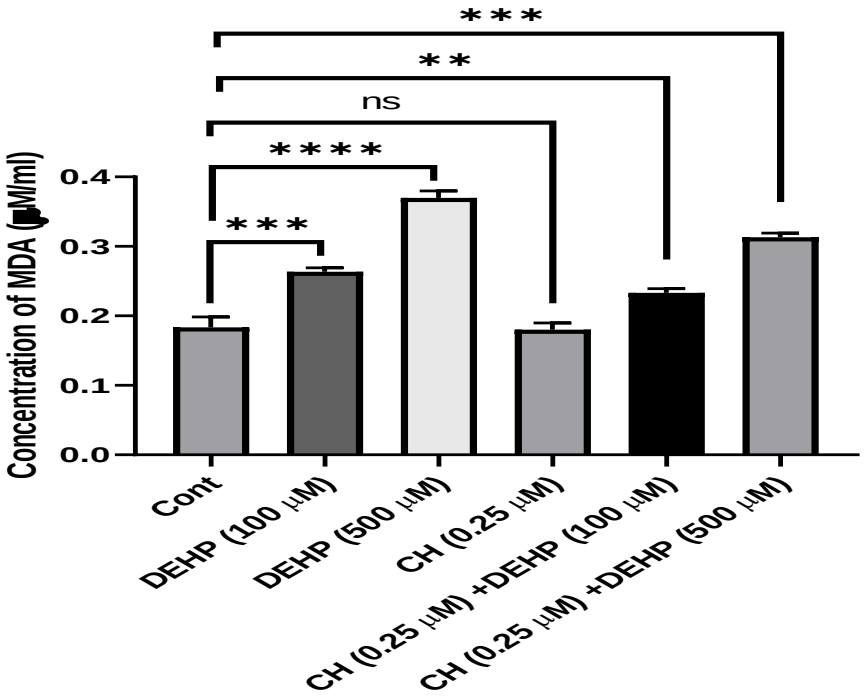
همان‌طور که در نمودار۵ می‌بینید گروه تیمار شده با DEHP در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش معنی دار ($p<0.05$) فعالیت آنزیم کاتالاز گردید. این در حالی است که نتایج حاصل از تیمار سلولها با کاتچین هیدرات و DEHP مشابه نتایج آن در بررسی فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز است. غلظت ۰/۲۵ میکرو مولار کاتچین هیدرات توانست اثر غلظت ۱۰۰ میکرو مولار DEHP را جبران نماید ولی در جبران اثر ۵۰۰ میکرومولار موفق نبود.



نمودار۵. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز.

۳-۶بررسی پراکسیداسیون لیپید :

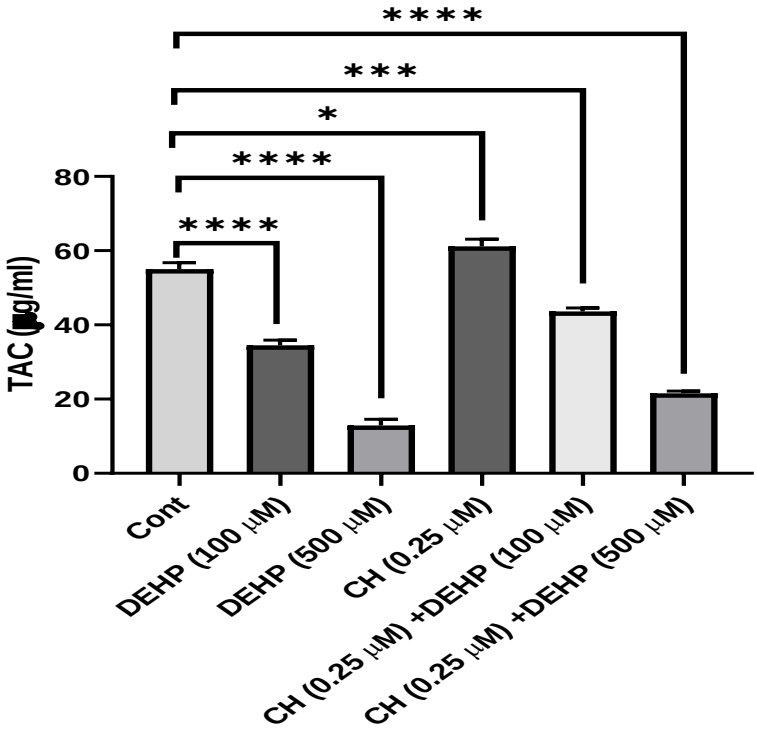
MDA به عنوانی شاخص پروکسیداسیون لیپیدهای غشاء اندازه گیری شد، در گروه تیمار شده با DEHP در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی دار ($p<0.05$) میزان MDA دیده شد. از طرفی در گروه تیماری با کاتچین هیدرات در مقایسه با گروه تیماری با DEHP کاهش معنی دار ($p<0.05$) MDA دیده شد. اگر چه در مقایسه با گروه کنترل،کاتچین هیدرات نتوانست اثر سمی DEHP را برطرف کند (نمودار۶).



نمودار۶. اندازه‌گیری میزان پر اکسیداسیون لیپید.

۳-۷اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل:

همان طور که در نمودار۷ مشاهده میشود، کاتچین هیدرات در مقایسه با گروه کنترل باعث افزایش معنی دار ($P<0.05$) آنتی آکسیدان کل سلول‌ها شده است. اگر چه در تیمار همزمان کاتچین هیدرات و DEHP با توجه به حضور این آلاینده میزان آنتی اکسیدان کل سلولها در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی دار ($p<0.05$) داشته است.



نمودار۷. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان کل سلول.

٤. بحث و نتیجه‌گیری:

نتایج این بررسی ها نشان داد، غلظت کم (۰/۰۶۳ تا ۰/۲۵ میکرو مولار) کاتچین هیدرات دارای اثر سمی بر سلول‌های BMSCs نیست، از طرفی غلظت ۰/۲۵ میکرو مولار باعث افزایش توانائی تکثیر این سلول‌ها گردید. اگر چه با توجه به اثر آنتی اکسیدانی کاتچین هیدرات این محصول طبیعی گیاهی توانست اثر اکسیداتیو غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP را مرتفع سازد ولی در مقایسه با گروه کنترل این جبران غیر معنی دار بود. لذا دلایل مختلفی ممکن است باعث عدم موفقیت کامل کاتچین هیدرات شده باشد، که مهمترین آن کوتاه بودن زمان تیمار است که پیشنهاد میشود تیمار با این محصول گیاهی در زمانهای بیشتر از ۴ روز بررسی شود. اگر چه اثر آنتی اکسیدانی کاتچین هیدرات نسبت به سایر مشتقات کاتچین کمتر مورد توجه قرار گرفته است ولی در مطالعاتی که روی این ماده انجام شده است، خاصیت آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد سرطانی(AL-Hazzani, et al ,.2011)،ضد افسردگی و بهبود عملکرد جنسی(Rai, et al., 2020) و همچنین بهبود در روند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان به استئوبلاست (Abnosi, et al .,2022) این ترکیب تایید شده است. به عنوان نتیجه گیری با توجه به مطالعات فوق الذکر و بررسی های انجام شده در طولانی مدت در خصوص اثر این متابولیت ثانویه بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان، احتمالا افزایش زمان تیمار سلولهای بنیادی مزانشیم مغز استخوان میتواند به بهبود نتایج حاصل از مطالعه حاظر کمک کند.

منابع

Abnosi MH , Mansoori S. Investigating the effect of catechin hydrate on viability, proliferation, and biochemistry of rat bone marrow mesenchymal stem cells in presence of boron as a micronutrient. Journal of Cell and Tissue. 2017; 8(3): 214-230.

Abnosi MH, Aliyari Babolghani Z. Diethylhexyl phthalate induced oxidative stress and caused metabolic imbalance in bone marrow mesenchymal stem cells. Physiology and Pharmacology. 2022; 26(1): 88-100.

Abnosi MH, Aliyari Babolghani Z. The inhibitory role of Di-2-ethylhexyl phthalate on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via down-regulation of RUNX2 and membrane function impairment. International Journal of Medical Toxicology and Forensic Medicine. 2020; 10(2): 26673-26673.

Abnosi MH, Sargolzaei J, Shayganfar Z. Induction of Caspase-dependent Apoptosis in Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells due to Di-2-Ethylhexyl Phthalate Toxicity was found to arrest the Cell Cycle at the G1 stage. Current Stem Cell Research & Therapy. 2023.

Al-Hazzani, Amal A, Alshatwi A A. Catechin hydrate inhibits proliferation and mediates apoptosis of SiHa human cervical cancer cells." Food and chemical toxicology. 2011; 49(12): 3281-3286.

Bernatoniene J, Kopustinskiene DM. The role of catechins in cellular responses to oxidative stress." Molecules. 2018; 23(4): 965.

BobisS, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. Folia histochemica et cytobiologica. 2006; 44(4): 215-230.

Bornehag CG, Sundell J, Weschler CJ,Sigsgaard T, Lundgren B, Hasselgren M, Hägerhed-Engman L. The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case–control study. Environmental health perspectives. 2004; 112(14): 1393-1397.

De Sousa EB, Casado P L, Neto V M, Duarte MEL, Aguiar DP. Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives. Stem cell research & therapy. 2014; 5: 1-6.

Elsisi A, Carter D, Sipes L. Dermal absorption and tissue distribution of phthalate esters. Toxicologist. 1985; 5: 246-247.

Erythropel HC, Maric M, Nicell JA, Leask RL, Yargeau V. Leaching of the plasticizer di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) from plastic containers and the question of human exposure. Applied microbiology and biotechnology. 2014; 98(24): 9967-9981.

Gimeno P, Thomas S, Bousquet C, Maggio AF, Civade C, Brenier C , Bonnet PA. Identification and quantification of 14 phthalates and 5 non-phthalate plasticizers in PVC medical devices by GC–MS. Journal of chromatography. 2014; B 949: 99-108.

Latini G. Monitoring phthalate exposure in humans. Clinica Chimica Acta. 2005; 361(1-2): 20-29.

Lin F.Adipose tissue–derived mesenchymal stem cells: a fat chance of curing kidney disease?.Kidney international. 2012; 82(7): 731-733.

Abnosi MH, Sargolzaei J, M Eshraghi. Effect of catechin hydrate on osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchyme stem cells treated with cadmium in laboratory conditions. Thesis.Arak University.2022.

Panagiotou EM, Ojasalo V , Damdimopoulou P. Phthalates, ovarian function and fertility in adulthood. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2021; 35(5): 101552.

PradhanA, Olsson PE, Jass J. Di (2-ethylhexyl) phthalate and diethyl phthalate disrupt lipid metabolism, reduce fecundity and shortens lifespan of Caenorhabditis elegans. Chemosphere. 2018; 190: 375-382.

RaiA, Gill M, Kinra M, Dsouza LA, Sumalatha S, Raj S, Shetty R, Nandakumar K, Chamallamudi MR, Kumar N. Assessment of preclinical effect of (+)-catechin hydrate on sexual function: An in silico and in vivo study. Andrologia. 2020; 52(10): e13737.

Romagnolo DF, Selmin OL. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. Journal of nutrition in gerontology and geriatrics. 2012; 31(3): 206-238.

Sampson J, De Korte D. DEHP-plasticised PVC: relevance to blood services. Transfusion medicine. 2011; 21(2): 73-83.

Wranicz J, Szostak-Wegierek D. Health outcomes of vitamin D. Part II. Role in prevention of diseases. Roczniki Państwowego Zakładu Higieny. 2014; 65(4).

Studing the effect of catechin hydrate on bone marrow mesenchymal stem cells treated with D-2-ethylhexylphthalate

[*]Zahra Ahmadi[1], Mohammad Hussein Abnosi[2]

[1] MSc student in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak.

[2] Associated professors in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak.

Abstract:

Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) are cells with the ability to divide and differentiate, which are the precursors of osteoblasts and responsible for the production of bone matrix. Humans are exposed to DEHP through food, water and contact with medical equipment. DEHP contaminate BMSCs through peripheral blood and due to induction of oxidative stress disrupts their function and as a result reduces population of osteoblast. Catechin hydrate (CH) can protect these cells from damage due to its antioxidant properties. Methods: BMSCs were cultured and treated for 96 hours with selected concentrations of 100 and 500 µM DEHP and 0.25 µM CH, then viability and proliferation, cells protein concentaration, antioxidant enzymes (CAT and SOD) activity, lipid peroxidation level and total antioxidant capacity (TAC), was measured. Results: the data showed, DEHP causes reduction of viability and proliferation of BMSCs as well as reduced activity of antioxidatn enzymes. DEHP, caused increase in lipid proxidation and TAC of the cells. Not only, low concentration of CH showed no unwante results on cell viability, but also the 0.25 µM concentration showed highest significant proliferative effect. The results showed that CH increases the activity of antioxidant enzymes and cells TAC. In co-treatment, CH reduce the toxic effect of DEHP, but could not completely improve the adverse effect of DEHP compared to the control group. Conclusion: CH treatment for 96 hours is not enough to deal with the toxic effect of DEHP, CH treatment is recommended for longer duration.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells, D-2-ethylhexylphthalate, Catechin hydrate, oxidative stress

mzargolahmadii1996@gmail.com

مطالعه مقدار آنتوسیانین کل در برگ سبز چای برخی اکسیشن‌های منتخب استان گیلان

طاهره رضائی[1*]، امیر صحراروا[1]، احسان کهنه[2] و معظم حسن‌پوراصیل[1]

[1] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

[2] گروه فناوری و مدیریت تولید چای، پژوهشکده چای، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان

چکیده

چای با نام علمی *Camellia Sinensis* L. یکی از مهمترین محصولات تجاری است که به طور گسترده در کشورهای آسیایی، آفریقایی و آمریکای لاتین رشد کرده و بعد از آب به عنوان اولین نوشیدنی غیر الکلی مصرف می‌شود. تنوع‌بخشی به محصولات و افزایش ارزش‌افزوده چای تولیدی در بازارها با استفاده از تولید فرآورده‌های جدید دارویی و بهداشتی از چای، یک روش استراتژیک برای بهبود وضعیت تولید، کشت و اقتصادکردن چای است. چای ارغوانی، ژنوتیپ جدیدی از چای است که از بوته چای با برگ‌های قرمزتا ارغوانی تولیدشده و غنی از آنتوسیانین است. چای ارغوانی در مقایسه با انواع چای معمولی (سیاه، سبز و اولونگ) مقدار پلی‌فنول بیشتر و پلی‌فنول GHG و تئوبرومین است که در چای‌های دیگر وجود ندارد. این تحقیق با هدف شناسایی و انتخاب بوته‌های چای با رنگ پایدار که حاوی مقادیر بیشتر آنتوسیانین است اجرا شد. بدین منظور با پایش میدانی، بوته‌های چای ارغوانی با رنگ پایدار از شهرهای استان گیلان شناسایی و پلاک‌گذاری گردید و سپس برگ‌های چای ارغوانی (یک غنچه و دو برگ) برای آنالیز مقدار رنگدانه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اکسیشن شماره ۴ از آستانه‌اشرفیه با ۳۲۲۵/۲۲ میکروگرم بر گرم آنتوسیانین کل بیشترین فعالیت آنتوسیانین را دارد و کمترین مقدار آنتوسیانین نیز در نمونه شماره ۳ (۱۳۹۰/۹۳ میکروگرم بر گرم) درشهرستان لنگرود ثبت شد. لذا باتوجه به نتایج بدست‌آمده که اکسیشن شماره ۴ مقدار آنتوسیانین بالاتر و تغییرات زمانی کمتری در مقدار آنتوسیانین دارد می‌تواند برای تحقیقات بعدی به منظور تولید نهال چای غنی از آنتوسیانین مورد پایش و مطالعه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: چای، آنتوسیانین، ارزش افزوده

E-mail: e.kahneh@areeo.ac.ir

۱. مقدمه

بیش از ۱۲۰ سال از ورود اولین نهال‌های چای به ایران می‌گذرد اما تاکنون تغییر محسوسی در محصولات تولیدی از برگ چای داده نشده است و همه کارخانه‌های موجود فقط از برگ سبز چای، به روش ارتودکس چای سیاه تولید می‌کنند. در سالیان اخیر نیز تعداد اندکی از کارخانه‌ها چای سبز نیز تولید کرده‌اند. درحالی که امروزه در کشورهای چای‌خیز با استفاده از ژنوتیپ‌های جدید چای، سعی بر استفاده دارویی و پزشکی از چای است تا فقط به عنوان یک نوشیدنی. تنوع‌بخشی به محصولات و افزایش ارزش‌افزوده چای تولیدی در بازارهای محلی و بین‌المللی با استفاده از تولید فرآورده‌های جدید دارویی و بهداشتی از چای، یک روش استراتژیک برای بهبود وضعیت تولید، کشت و کار و اقتصاد کردن چای است. باتوجه به قدیمی بودن باغ‌ها و مسن بودن بوته‌ها چای ایرانی، احیا باغ‌ها امری ضروری است لذا با شناسایی ژنوتیپ‌های جدید و با خواص دارویی بهتر می‌توان در جهت بهبود وضعیت معیشتی چایکاران و کارخانه‌های چایسازی گام برداشت.

گیاه چای (*Camellia sinensis* L.) متعلق به خانواده Theaceae، درختچه‌ای چوبی، همیشه سبز و چند ساله است (Kumari et al.,2019). به طور کلی، برگ‌های گیاه چای، سبز هستند اما گیاهان در مواجهه با محیط‌های اکولوژیکی مختلف تکامل پیدا کرده و مکانیسم‌های پیچیده‌ای را برای پاسخ به تنش‌ها و سازگاری با محیط به کار می‌برند که تنوع و تغییر رنگ برگ‌ها یکی از این راهکارها است (Xu et al., 2021). جهش‌هایی در برگ‌ها مانند اتیوله، آلبینو و ارغوانی شدن رخ داده و جوانه‌ها، برگ‌ها و ساقه‌های آنها بترتیب زرد، سفید و ارغوانی می‌شوند. در گیاه چای عوامل اثرگذار بر فنوتیپ رنگ برگها، رنگدانه‌های کلروفیل، کاروتنوئیدها، آنتوسیانین ها و فلاونوئیدها هستند (Shin et al.,2018).

چای ارغوانی، ژنوتیپ جدیدی از چای است که از بوته چای با برگ‌های قرمزتا ارغوانی تولیدشده و غنی از آنتوسیانین است. چای ارغوانی در مقایسه با انواع چای معمولی شامل چای سیاه، چای سبز و چای اولونگ، مقدار پلی‌فنول بیشتری دارد. عصاره چای ارغوانی حاوی پلی فنول GHG (1,2-di-Galloyi-4,6-Hexahydroxy diphenoyl-β-D-Glucose) و تئوبرومین است که به‌طور طبیعی در چای‌های دیگر وجود ندارد. مطالعات نشان داده که GHG خواص ضد چاقی و پیری دارد. اخیراً واریته‌هایی از چای ارغوانی در کشورهایی مانند کنیا، چین، ژاپن و هند توسعه یافته (Chen et al.,2020) که به علت جذابیت و منحصربودن رنگ و مزایای سلامتی متعدد به خوبی توسعه پیدا کرده و به موضوع مورد علاقه محققان تبدیل شده است (Kumari et al.,2019). ترکیبات اصلی برگ‌های چای ارغوانی علاوه بر پلی‌فنول‌های مفید موجود در چای سبز، آنتوسیانین‌ها مانند مالویدین‌ها و سیانیدین ۳-O-گالاکتوزید هستند بعلاوه چای ارغوانی کالری و کافئین کمتری نسبت به سایر چای‌ها دارد در نتیجه تقاضا برای تهیه آن توسط مصرف‌کنندگان افزایش یافته است (Hayat et al.,2015). امید است که چای ارغوانی بتواند منبع درآمدی بیشتر برای چای‌کاران خرده‌مالک باشد چون می‌توانند در کارخانه از آن عصاره حاوی آنتوسیانین و دیگر فلاونوئیدها تولید کرده و باعث افزایش ارزش افزوده محصولات تولیدی شود. لذا این تحقیق با هدف شناسایی اکسیشن‌های طبیعی از چای ایران که دارای رنگ پایدار و مقدار آنتوسیانین بیشتری هستند اجرا شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. منطقه مورد مطالعه

براساس مطالعات و بازدیدهای انجام‌شده از باغ‌های چای ایران در شهرستان‌های چایخیز استان‌های گیلان، چند بوته چای که خواص ظاهری متفاوتی از نظر رنگ برگ (ارغوانی و بنفش) را داشتند در شهرستان‌های مختلف شناسایی و علامت‌گذاری شد. بوته‌های انتخابی با نصب پلاکارد از سایر بوته‌ها متمایز شد.

۲.۲. روش تحقیق

۱،۲.۲. برداشت و آماده سازی نمونه‌ها

از هر بوته انتخاب شده، یک جوانه و دو برگ که استاندارد برگ‌چینی است با دست برداشت و به آزمایشگاه منتقل شد. برگ‌ها در آزمایشگاه برای انجام آزمایش‌های بعدی، آماده‌سازی شده و مقدار آنتوسیانین کل، کلروفیل و کارتنوئید در برگ این بوته‌ها اندازه‌گیری شد. به‌منظور بررسی تغییرات یا پایداری رنگ بوته‌ها در طی فصل رویشی و برگچینی در چند نوبت، بازدید انجام شد. در صورت پایدار بودن رنگ ارغوانی نسبت به برگچینی اقدام کرده و مجدداً مقدار رنگدانه‌ها اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری رنگدانه‌های کلروفیل، برگ‌ها تا زمان انجام آزمایش در فریزر نگهداری شدند. همچنین برای اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین برگ‌ها ابتدا در دستگاه آون به مدت ۲۴ ساعت و دمای ۶۵ درجه سانتیگراد خشک گردید و بعد از آماده سازی نمونه‌ها مراحل اندازه گیری رنگدانه آنتوسیانین انجام شد.

۲،۲.۲. اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین کل

مقدار آنتوسیانین کل به روش طیف سنجی (Giusti and Wrolstad, 2001) اندازه گیری شد. بطور خلاصه، نمونه‌ها (برگ خشک‌شده) به مدت ۵ دقیقه در محلول ۰/۱ درصد اسیدسیتریک با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور و سپس فیلتر شد. برای اندازه‌گیری از روش تفاضل پی‌اچ با دو بافر ۱-بافر کلرید پتاسیم ۰/۰۲۵ مولار در پی‌اچ ۱/۰ و بافر استات سدیم ۰/۴ مولار در پی‌اچ ۴/۵ استفاده شد. ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه حاوی آنتوسیانین با ۱/۸ میلی‌لیتر از هر بافر جداگانه مخلوط شده و جذب در طول‌موج ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر تعیین شد. تفاوت جذب دو نمونه بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$A=(A520nm-A700nm)\ at\ PH\ 1.0 - (A520nm-A700nm)\ at\ PH\ 4.5$$

غلظت آنتوسیانین‌های منومر در نمونه اصلی بر اساس فرمول زیر تعیین می‌شود:

$$Monomeric\ anthocyanins\ pigment\ (mg/1) = (A \times MW \times DF \times 1000)/ (\varepsilon \times 1)$$

۳،۲.۲. اندازه‌گیری کلروفیل و کارتنوئید

برگ سبز برای اندازه‌گیری مقادیر کلروفیل و کارتنوئید بر اساس روش آرنون آماده‌سازی شد. سپس جذب مایع رویی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد و مقادیر هر یک با استفاده از فرمول‌های زیر استفاده محاسبه شد (Arnon,1976).

مقدار کلروفیل a (Ca) =13.95A665 nm- 6.88A649nm

مقدار کلروفیل b (Cb) =24.96A 649nm- 7.32A 665nm

مقدار کاروتنوئیدها (Cx.c) = (1000A 470 nm-2.05Ca-114.8Cb)/245

داده‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار SAS و در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی نامتعادل تجزیه واریانس شد و در صورت معنی‌دار بودن، مقایسه میانگین با استفاده از آزمونLSD در سطح آماری ۵٪ انجام شد.

۳. نتایج

مطالعات روی بوته‌های چای با برگ‌های قرمز تا بنفش رنگ در سال ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ در شهرهای استان گیلان آغاز شد. این بوته‌ها در شهرستان‌های لاهیجان، سیاهکل، آستانه اشرفیه شناسایی شد و در مناطق بازدید شده سایر شهرستان‌ها، بوته‌ای که دارای رنگ ثابت یا با تغییرات کم باشد مشاهده نشد. بوته‌های با رنگ ارغوانی که دارای ثبات رنگ بودند انتخاب شد (شکل ۱) و مقدار رنگدانه آنتوسیانین کل در یک غنچه و دو برگ به روش اسپکتروفتومتری مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس پارامترهای مورد آزمایش در مکان‌های مختلف نمونه‌برداری نشان داد که مکان‌های نمونه‌برداری فقط تأثیر معنی‌داری بر مقدار آنتوسیانین برگ سبز چای داشته و مقادیر کلروفیلa و b و کارتنوئید تحت تأثیر مکان قرار ندارد(جدول ۱).

جدول ۱. خلاصه تجزیه واریانس ویژگی‌های مورد آزمایش در اکسیشن‌های منتخب

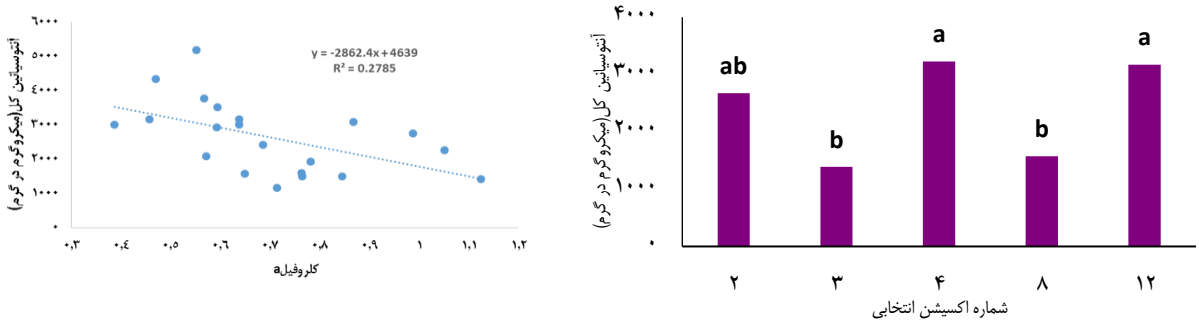
منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات			
		آنتوسیانین	کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنوئید
اکسیشن(مکان نمونه‌برداری)	۴	۱۰۰۷۹۸۸۷/۸۴*	۰/۰۶۸n.s	۰/۰۳۰ n.s	۰/۴۷ n.s
خطا	۱۶	۱۱۹۷۸۴۷۴/۲۲	۰/۶۷	۰/۰۶۱	۲/۳۱
کل	۲۰	۲۲۰۵۸۳۶۲/۰۶	۰/۷۴	۰/۰۹۱	۲/۷۸

*معنی دار سطح احتمال پنج درصد و ns عدم وجود تفاوت آماری معنی دار



شکل ۱. شاخساره قابل برگ‌چینی الف) برگ سبز چای معمولی ب) برگ سبز چای ارغوانی یکی از اکسیشن‌های انتخابی

نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ در مقدار آنتوسیانین برگ بین بوته‌ها در مکان‌های مختلف وجود دارد. با مقایسه میانگین‌ها مشخص شد که نمونه شماره ۴ با ۳۲۲۵/۲۴ میکروگرم بر گرم بیشترین مقدار آنتوسیانین کل را دارد ولی با نمونه شماره ۱۲ تفاوت معنی‌داری ندارد، کمترین مقدار آنتوسیانین کل نیز با ۱۳۹۰/۹۳ میکروگرم در گرم در نمونه شماره ۳ ثبت شد (شکل ۲).



شکل ۲. مقایسه میانگین مقدار آنتوسیانین کل در اکسیشن‌های منتخب و رابطه بین مقدار آنتوسیانین کل و کلروفیل a

Li وهمکاران (۲۰۲۰) نیز در کولتیوار Zyan، مقدار آنتوسیانین ۱۰۷۹/۸ میکروگرم در گرم وزن خشک را گزارش کردند. همچنین Wangو همکاران (۲۰۱۷) غلظت آنتوسیانین کل درکولتیوار Zijuan را ۳۷۷/۱۳ میکرو گرم در گرم وزن خشک گزارش کردند ازطرفی نتایج Hu وهمکاران (۲۰۲۰) مقدار آنتوسیانین در این رقم را ۳۳۳۶/۸۲ میکرو گرم در گرم وزن خشک نشان دادکه این تفاوت در مقدار آنتوسیانین احتمالاً بدلیل اختلاف ارتفاع همچنین تفاوت در محیط رشد است که از مهمترین عوامل تعیین‌کننده مقدار آنتوسیانین کل در نمونه‌های مختلف است. گزارش Wei و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادکه شدت نور بالاتر یا شرایط کیفیت نور بر سنتز آتوسیانین تأثیر دارد. براساس داده‌های هواشناسی، ساعات آفتابی بیشتر در آستانه اشرفیه در مقایسه با دیگر شهرها نیز می‌تواند دلیلی بر حضور بوته‌های با برگ ارغوانی رنگ در این منطقه باشد. Shin و همکاران (۲۰۱۸) به این نتیجه رسیدند که غلظت آنتوسیانین تأثیر زیادی در فنوتیپ جوانه و برگهای گیاه چای دارد که برخی از این تفاوت‌ها در شکل ۱ مشاهده می‌شود. البته بر اساس گزارش Li و همکاران (۲۰۲۰) در گیاه چای اختلاف ارتفاع بالاتر از سطح دریا باعث می‌شود اشعه ماوراء بنفش A و B باعث کد شدن ژن‌های مربوط به سنتز آنزیم‌های پیش‌ساز در مسیرساخت آنتوسیانین‌ها شود. ازطرفی نتایج Nakhumicha و همکاران (۲۰۰۹) مشخص کردکه دما و پی‌اچ از مهم‌ترین عوامل خارجی است که بر تجمع آنتوسیانین در بافت‌های گیاهی اثر دارد به‌طوری‌که کاهش دما باعث افزایش غلظت آنتوسیانین می‌شود. نتایج نشان داد که مقدار آنتوسیانین کل با مقدار رنگدانه‌های کلروفیلی و کارتنوئید رابطه منفی دارد، مقدار کلروفیل a بیشترین تأثیر منفی را بر مقدار آنتوسیانین کل در برگ‌ها داشت (شکل ۲).

جدول۲. میانگین مقدار رنگدانه‌های کلروفیلی و کارتنوئید در برگ اکسیشن‌های انتخابی

شماره اکسیشن انتخابی	کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنوئید
	میلی‌گرم در گرم وزن‌تر		
۲	۰/۶۱a	۰/۲۸a	۱/۵۴a
۳	۰/۷۷a	۰/۳۳a	۱/۸۵a
۴	۰/۷۲a	۰/۳۵a	۱/۹۰a
۸	۰/۷۱a	۰/۲۸a	۰/۶۸a
۱۲	۰/۷۳a	۰/۳۸a	۱/۸۶a

حروف مشابه در هر ستون، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند

٤. بحث و نتیجه‌گیری

اثر آنتی‌اکسیدانتی آنتوسیانین می‌تواند در حضور کاتچین تشدید شود؛ بنابراین حضور کاتچین‌های محلول در آب در چای ارغوانی یک مزیت افزوده است؛ بنابراین چای حاوی دو آنتی‌اکسیدانت در یک دم‌کرده خواهد بود که آن را به‌عنوان نوشیدنی سلامت‌بخش

معرفی می‌کند. حلالیت بالای آنتوسیانین چای در آب نیز برای صنایع غذایی مفید است، آنتوسیانین می‌تواند با خشک‌کن پاششی به پودر تبدیل‌شده و به‌عنوان رنگ‌دهنده بدون ترس از آلودگی با باقی‌مانده حلال‌های آلی که چندین بار در عصاره‌گیری بکار می‌رود استفاده شود. ازآنجایی‌که چای عموماً به‌عنوان عصاره (نوشیدنی) با آب مصرف می‌شود حلالیت بالای آنتوسیانین در آب نیز یک مزیت اضافه است و بدان معنی است که قابلیت زیست دسترسی آنتوسیانین تضمین‌شده است. در کنیا همچنین تحقیقاتی درباره عصاره‌گیری کاتچین‌ها، آنتوسیانین‌ها، آنتوسیانیدین‌ها (که به‌عنوان دارو مکمل، نگه‌دارنده در صنایع غذایی)، عصاره پلی‌فنول چای برای داروسازی و صنعتی، چای فوری و چای آماده نوشیدن و... از چای ارغوانی در حال انجام است. عوامل متعددی شامل ژنوتیپ، موقعیت جغرافیایی، شرایط رویشی، ترکیبات خاک و رژیم رطوبتی، زمان برداشت، عملیات پس از برداشت و ساختار فیزیکی برگ بر مقدار و ترکیب پلی‌فنول‌های برگ چای تأثیرگذار است. باتوجه به نتایج بدست آمده که اکسیشن شماره ۴ مقدار آنتوسیانین بالاتر و تغییرات زمانی کمتری در مقدار آنتوسیانین دارد می‌تواند برای تحقیقات بعدی به منظور تولید نهال چای غنی از آنتوسیانین مورد پایش و مطالعه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از مدیریت و همکاران پژوهشکده چای موسسه تحقیقات علوم باغبانی که ما را در انجام و ارتقای کیفی این پژوهش یاری دادند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

Arnon, D.S. (1967). Copper enzyme in isolated chloroplast polyphenol oxidase in Beta Vulgaris, journal of Plant Physiology, 24: 1 -15.

Chen X, Wang P, Zheng Y, Gu M, Lin X, Wang S, Jin S, Ye N. (2020). Comparison of metabolome and transcriptome of flavonoid biosynthesis pathway in a purple-leaf tea germplasm 'Jinmingzao' and a Green-leaf tea germplasm 'Huangdan' reveals their relationship with genetic mechanisms of color formation, International Journal Molecular Science, 21(11): 4167

Giusti, M and R. E. Wrolstad. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy, Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley and Sons, Inc.

Hayat K, Iqbal H, Malik U, Bilal U, Mushtaq S. 2015. Tea and its consumption: benefits and risks. Critical Reviews Food Sciences Nutrre, 55(7):939–954.

Hu, J. G., Zhang, L. J., Sheng, Y. Y., Wang, K. R., Shi, Y. L., Liang, Y. R., & Zheng, X. Q. (2020). Screening tea hybrid with abundant anthocyanins and investigating the effect of tea processing on foliar anthocyanins in tea. Folia Horticulturae, 32(2): 279-290.

Kumari M, Thakur S, Kumar A, Joshi R, Kumar P, Shankar R, Kumar R. (2019). Regulation of color transition in purple tea, (*Camellia sinensis*), Planta: 251(1):3.

Li, W., Tan, L., Zou, Y., Tan, X., Huang, J., Chen, W., and Tang, Q. (2020). The effects of ultraviolet A/B treatments on anthocyanin accumulation and gene expression in dark-purple tea cultivar 'Ziyan' (*Camellia sinensis*). Molecules, 25: 354, doi: 10.3390/ molecules25020354.

Nakhumicha Muriithi, A., Wamocho, L. S., and Njoroge, J. B. M. (2009). Effect of pH and magnesium on color development and anthocyanin accumulation in Tuberose florets. African Crop Science Society, 9: 227-234.

Shin, Y. H., Yang, R., Shi, Y. L., Li, X. M., Fu, Q. Y., Lu, J. L., and Liang, Y. R. 2018. Light-sensitive albino tea plants and their characterization. Hort Science, 53(2): 144-147.

Wang, L., Pan, D., Liang, M., Abubakar, Y. S., Li, J., Lin, J., ... & Chen, W. (2017). Regulation of anthocyanin biosynthesis in purple leaves of zijuan tea (*Camellia sinensis* var. kitamura). International journal of molecular sciences: 18(4), 833.

Wei, K., Zhang, Y., Wu, L., Li, H., Ruan, L., Bai, P., ... & Cheng, H. (2016). Gene expression analysis of bud and leaf color in tea. Plant Physiology and Biochemistry, 107, 310-318.

Xu, M. 2021. Advances in molecular mechanism of plant leaf color variation, Molecules Plant Breed. https://doi. org/ 10, 13271.

Studying the amount of total anthocyanin in green tea leaves of some selected accessions of Gilan province

Tahereh Rezaii[1], Amir Sahraro[1], Ehsan Kahneh[2*] and Moazzam Hassanpour Asil[1]

[1] Dept. of Horticultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
[2] Department, Tea Research Centre, Horticultural Science Research Institute, AREEO, Lahijan, Iran

Abstract

Tea, *Camellia Sinensis*, is one of the most important commercial products that is widely grown in Asian, African, and Latin American countries and is consumed as the first non-alcoholic beverage after water. Diversifying products and increasing the added value of produced tea in the markets by using the production of new medicinal and health products from tea is a strategic method to improve the production, cultivation, and economy of tea. Purple tea is a new genotype of tea that is produced from the tea plant with red to purple leaves and is rich in anthocyanins. Compared to other types of tea (black, green, and oolong), purple tea has more polyphenols and GHG polyphenols, and theobromine, which is not found in other teas. This research was carried out to screening tea plants with stable colors that contain higher amounts of anthocyanins. For this purpose, through field monitoring, purple tea plants with stable color were identified and labeled from the cities of Gilan province, and then purple tea leaves (one bud and two leaves) were analyzed for the amount of pigments. The results showed that accession number 4 from Astana-Ashrafieh has the highest anthocyanin content with 3225.22 µg/g, and the lowest amount of anthocyanins was recorded in No.3 (1390.93 µg/g) in Langrod city. Therefore, according to the obtained results, accession No.4 has a higher amount of anthocyanin and less temporal changes in the amount of anthocyanin. It can be monitored and studied for future research to produce tea seedlings rich in anthocyanin.

Keywords: Tea, anthocyanin, Value-added

[*] e-mail for the corresponding author: e.kahneh@areeo.ac.ir

مقایسه روزنه و گرده گیاه دارویی *Lycium depressum* در استان گلستان و خراسان شمالی

مجید محمداسمعیلی[۱] *، عبدالحکیم احمدی‌مقدم[۲]، محمود صالحی[۲]، علی ستاریان[۲]

[۱] گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس
[۲] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس

چکیده

گونه‌ی *Lycium depressum* از گیاهان سازگار با منطق خشک و نیمه خشک می باشد. هدف از این تحقیق بررسی و مقایسه روزنه و گرده این گیاه در استان گلستان و استان خراسان شمالی است. نمونه برداری در مناطق مورد مطالعه به روش تصادفی اجرا شد. از نظر مورفولوژیکی برای اندازه‌گیری اندام‌های مختلف گونه‌ی *L. depressum* ۳۰ نمونه در عرصه طبیعی از استان گلستان و۳۰ نمونه از استان خراسان شمالی مورد ارزیابی قرار گرفت. مقایسه میانگین طول روزنه در استان گلستان ۲۰۹/۲۳ میکرومتر و استان خراسان شمالی ۱۹۸/۹۲ میکرومتر، عرض $\frac{1}{2}$، $\frac{1}{3}$، $\frac{2}{3}$ روزنه به ترتیب در استان گلستان ۷۵/۸۶، ۶۲/۳۱ ، ۴۵/ ۶۱ میکرومتر و در استان خراسان شمالی ۸۲/۱۳ ،۶۲/۷۹، ۶۵/۹۶ میکرومتر بود. مقایسه میانگین طول گرده گل در استان گلستان۳۸/۰۱ میکرومتر و در استان خراسان شمالی ۴۱/۳۳ میکرومتر، عرض شیار گرده در استان گلستان ۲/۶۹ و در استان خراسان شمالی۵/۵۵ میکرومتر بود.

واژگان کلیدی: خراسان شمالی، گلستان، روزنه، گرده.

Ma_456@yahoo.com

۱. مقدمه

جنس لیسیوم از نوع درختچه‌ای و اکثرا خاردار هستند. دارای برگ‌های متناوب و حاشیه ساده و گاهی به صورت دسته‌های مجتمع است. گل‌هایی انتهایی (محورکاذب یا محوری) دارد و به صورت تک یا گل‌آذرین دم عقربی به رنگ سفید، قرمز، بنفش یا مایل به زرد است. کاسه گل فنجانی یا استکانی یا لوله‌ای است وکاسه‌ی گل دارای ۵ دندانه‌ی مساوی یا کوتاه است. دندانه‌ها نوک‌تیز یا بدون‌نوک تقریبا دولوبه است. جام‌گل قیفی یا لوله‌ای قیفی است. پهنک جام‌گل ۵ قسمتی (گاهی ۶ یا ۴) و به ندرت ۷ قسمتی است، بریدگی‌ها هم‌پوشان است. تعداد پرچم با تعداد بریدگی‌های پهنک جام برابر است، و پرچم‌ها بلندتر یا کوتاه‌تر از جام می‌باشند. بساک با شکاف طولی باز می‌شود و بدون‌کرک یا کرک‌دار است. تخمدان دو اتاقی که روی صفحه‌ای قرار دارد خامه، نخی شکل است. کلاله سرمانند و دوقسمتی است. میوه سته و پردانه و نارنجی، قرمز یا سیاه است، کاسه‌گل دارای بریدگی‌های نامنظم و حاوی میوه است. دانه کلیوی و عدسی شکل و مشبک چاله‌دار و بدون کرک است (خاتم ساز،۱۳۷۷). موسوی‌منش و همکاران در سال ۱۳۹۵ به بررسی گونه‌های خودروی *Lycium* در ایران، مشتمل بر، *L. shawii*، *L. ruthenicum*، *L. kopetdaghi* *L. depressum* و *L. edgeworthii* که از نظر گرده‌شناسی، ترکیبات شیمیایی و ریخت‌شناسی مورد ارزیابی قرار داد.. نظر به اینکه تاکنون وضعیت گرده‌شناسی این گیاهان در ایران بررسی نشده بود، در این تحقیق برای نخستین بار ارزش یافته‌های گرده‌شناسی در گونه‌های این جنس از نظر تفکیکی مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. منطقه مورد مطالعه

به‌منظور بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی *L. depressum*، نمونه‌های گوناگون از جمعیت‌های مختلف در شمال شهرستان گنبدکاووس در استان گلستان در طول جغرافیایی ۵۴ ۴۲.۷۹۳ شرقی و عرض جغرافیایی ۳۷ ۲۶.۹۲۲ شمالی و شمال شهرستان مانه و سملقان واقع در استان خراسان شمالی در طول جغرافیایی ۵۶ ۳۴.۲۲۴ شرقی و عرض جغرافیایی ۳۷ ۴۵.۶۷۲ شمالی جمع آوری گردید.

۲.۲. روش تحقیق

در تحقیق حاضر تعداد ۳۰ نمونه گیاهی از برگ جمعیت استان خراسان شمالی و ۳ نمونه گیاهی از برگ جمعیت استان گلستان گونه *L. depressum* برای مراحل انجام مطالعات روزنه انتخاب شده است. بدین صورت که ابتدا نمونه‌ها در بشر قرار گرفته و با افزودن آب مقطر، محلول حاصله به مدت ۶۰ تا ۹۰ دقیقه جوشانده شده است، تا نرمی برگ به حد مورد نظر برسد، اپیدرم نمونه ها را به کمک یک تیغ تیز جدا می‌کنیم، سپس به داخل شیشه ساعت حاوی محلول سفید کننده انتقال می دهیم تا عمل رنگبری اپیدرم انجام پذیرد. پس از رنگبری نمونه‌ها جهت مشاهده روزنه مقداری از اپیدرم نمونه را روی لام قرار می دهیم. پس از تهیه لام نمونه‌های مورد مطالعه با استفاده از استریو میکروسکوپ مورد بررسی قرار می گیرد. جهت بررسی وضعیت گرده ابتدا از نمونه‌های هرباریومی گونه *L. depressum* دو استان خراسان شمالی و گلستان، نمونه های انتخاب می کنیم و پرچم های آن‌را جدا می نمائیم، سپس قسمت‌های اضافی آن حذف میگردد. بساک‌ها داخل پتری قرار می‌گیرند و در زیر استریو

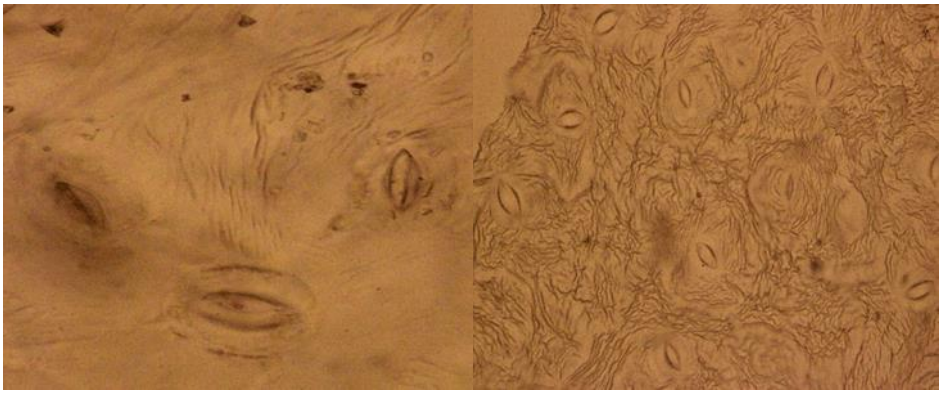
میکروسکوپ، گرده‌ها بوسیله‌ی سوزن تشریح جدا می‌شوند؛ سپس گرده‌ها با آب مقطر به صافی (قطر ۲۰۰ – ۶۰۰ میکرومتر) مخصوص انتقال داده می‌شود، فرآیند شستشوی گرده‌ها، به منظور حذف بهتر مواد و قسمت‌های اضافی بساک، چند بار انجام می‌شود.

۳. نتایج

مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده نشان داد که میانگین طول روزنه، استان گلستان ۲۰۹/۲۳ میکرومتر و استان خراسان شمالی ۱۹۸/۹۲ میکرومتر، عرض $\frac{1}{2}$ ، $\frac{1}{3}$، $\frac{2}{3}$ روزنه به ترتیب استان گلستان ۷۵/۸۶، ۶۲/۳۱ ، ۶۱/۴۵ میکرومتر و استان خراسان شمالی ۸۲/۱۳، ۶۲/۷۹، ۶۵/۹۶ میکرومتر می باشد. در استان گلستان و استان خراسان شمالی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ازنظر ویژگی‌های روزنه مشاهده نشد

جدول ۱ نتایج مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی روزنه برگ گونه‌ی *L. depressum*

ویژگی	استان خرسان شمالی	استان گلستان
طول روزنه	۱۹۸/۹۲	۲۰۹/۲۳
عرض۱/۲	۸۲/۱۳	۷۵/۸۶
عرض۱/۳	۶۲/۷۹	۶۲/۳۱
عرض۲/۳	۶۵/۹۶	۶۱/۴۵



شکل ۱. تصویر روزنه برگ *Lycium depressum* در استان خراسان شمالی و استان گلستان

مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده نشان داد که اندازه طول گرده گل در استان گلستان۳۸/۰۱ میکرمتر و استان خراسان شمالی ۴۱/۳۳ میکرومتر، عرض شیار گرده در استان گلستان ۲/۶۹ و استان خراسان شمالی۵/۵۵ میکرو متر است. با توجه به داده‌های بدست آمده اختلاف معنی داری نشان می دهد، ولی عرض$\frac{1}{2}$، $\frac{1}{3}$، $\frac{2}{3}$ دانه گرده به ترتیب استان گلستان ۲۰/۹۷ ، ۱۷/۴۱۵ ، ۱۶/۸۳۳ و استان خراسان شمالی ۲۱/۶۵۷ ، ۱۷/۹۰ ، ۱۷/۳۰ میکرومتر و طول شیاراستان گلستان ۳۶/۷۱ میکرمتر و استان خراسان شمالی۳۷/۸۱ میکرومتر است. گونه *L. depressum* از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ازنظر ویژگی‌های طول شیار، عرض$\frac{1}{2}$ ، $\frac{1}{3}$، $\frac{2}{3}$ دانه گرده نشان نمی دهد.

جدول ۲ نتایج مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی گرده گل گونه‌ی *L. depressum*

ویژگی	استان خرسان شمالی	استان گلستان
طول گرده	۴۱/۳۳[a]	۳۸/۰۱[b]
عرض۱/۲	۲۱/۶۵	۲۰/۹۷
عرض۱/۳	۱۷/۹۰	۱۷/۴۱
عرض ۲/۳	۱۷/۳۰	۱۶/۸۳
طول شیار	۳۷/۸۱	۳۶/۷۱
عرض شیار	۵/۵۵[a]	۲/۶۹[b]

٤. بحث و نتیجه‌گیری

نتایج بررسی دانه‌های گرده مشخص ساخت که صفاتی از دانه‌های گرده مانند تعداد شیار گرده و الگوی تزئینات سطحی دارای ارزش تشخیصی هستند. با مطالعات به روش تاکسونومیکی عددی ریخت شناسی دانه گرده *L. depressum* مشخص شد .که صفات طول محور قطبی، طول شیار، نسبت P/E ، طول محوراستوایی و عرض شیار دارای ارزش افتراقی هستند. گونه‌ی *L. depressum* در بین گونه ها ی جنس Lycium بزرگترین دانه گرده را به خود اختصاص داده است. در منابع جنس *Lycium*از لحاظ وضعیت منفذ گرده *Colporate* اشاره شده است. در گونه‌ی *L. depressum* وضعیت منفذ گرد *Colporate*می باشد. همه‌ی گونه‌های جنس *Lycium* از لحاظ شیار *Tricolpate* می باشد به‌جز گونه‌ی *L. shawii* که دارای ۵ شیار است که این وضعیت نیز در تصاویر تهیه شده مشاهده گردید. تزئینات روی اگزین دانه گرده گونه‌ی *L. depressum* به‌شکل مخطط منظم (Strait) است. باتوجه به اندازه گیری های صورت گرفته بر روی دانه‌ی گرده نتایج جدول

تجزیه واریانس در این صفات اختلاف معنی داری را نشان نمی دهد. باتوجه به مشاهده و ارزیابی تصاویر دانه‌ی گرده استان گلستان و استان خراسان شمالی از لحاظ تزئینات روی اگزین و وضعیت منفذ گرده اختلافی مشاهده نگردید. وضعیت منفذ گرد *Colporate*می باشد، تزئینات روی اگزین دانه گرده به‌شکل مخطط منظم (Strait) است.

منابع

بخشی خانیکی، غ. محمدی، ب. ۱۳۹۱. مطالعه اکولوژی برخی از گونه‌های جنس سالسولا (کنوپودیاسه) در استان گلستان، مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی، دوره دوم.

خاتم ساز.م.(۱۳۷۷) فلور ایران تیره سیب زمینی جلد ۲۴ موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع

شربتی ، ف.، محمداسمعیلی،م.، بهمنش، ب.، ۱۳۹۷. بررسی اثر شوری بر جوانه زنی گونه دیوخار *Lycium depressum* در رویشگاه اینچه برون استان گلستان هفتمین کنفرانس ملی مرتع و مرتعداری ایران.

عمرعطا، ت، ۱۳۹۷. مطالعه بیوسیستماتیکی دو گونه ارس (*Juniperus excelsa* & J. *polycarpos*) استان گلستان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی دانشگاه گنبد کاووس. ص۶۲ –۲.

قزلی، ع. محمداسمعیلی، م.، ستاریان، ع.، کسلخه، ر.۱۳۹۸. بررسی بیوسیستماتیکی و اکولوژیکی جنس دیوخار *Lycium depressum* stocks در استان گلستان. پایان نامه کارشناسی ارشد،دانشگاه گنبد کاووس.

Comparison of stomata and pollen of the medicinal plant *Lycium depressum* in Golestan and North Khorasan provinces

Majid Mohammadesmaeili[*1], Abdolhakim Ahmadimoghadam[2], Mahmoud Salehi[2], Ali Sattarian[2]

[1] Department of Range management and watershed, Faculty of **a**gricultural and natural resources, University of Gonbad kavous, Gonbad kavous, Iran

[2]Department of Biology, Faculty Basic sciences and technical engineering, University of Gonbad kavous, Gonbad kavous, Iran

Abstract

Lycium depressum is one of the plants adapted to dry and semi-arid conditions. The purpose of this research is to investigate and compare the stomata and pollen of this plant in Golestan province and North Khorasan province. Sampling in the study areas was carried out by random method. Morphologically, 30 samples from Golestan province and 30 samples from North Khorasan province were evaluated in order to measure different organs of *L. depressum* species. Comparison of the average length of the stomata in Golestan province is 209.23 micrometers and North Khorasan province is 198.92 micrometers, the width of the stomata is 2.1, 3.1, and 2.3 micrometers respectively in Golestan province, 75.86, 62.31, and 61.45 micrometers respectively. North Khorasan is 82/13, 62/79, 65/96 micrometers. Comparison of the average length of pollen in Golestan province is 38.01 micrometers and North Khorasan province is 41.33 micrometers, pollen groove width is 2.69 micrometers in Golestan province and North Khorasan province is 5.55 micrometers.

Keywords: North Khorasan, Golestan, Stomata, Pollen

[*] ma_456@yahoo.com

مقایسه روشهای استخراج ژنوم کل در گیاه دارویی *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss.

زهرا علیدوستی شهرکی[۱]، عاطفه امیراحمدی*[۱]، پریسا فرخ[۱]، آرزو رضایی[۱]، جواد قاسمیان[۲]

۱. دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان، دامغان، ایران
۲. دانشکده ریاضی و علوم کامپیوتر، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

چکیده

استخراج DNA یکی از اساسی ترین و ضروری ترین تکنیک ها در مطالعه DNA است. جداسازی ژنوم شامل فرآیند خالص سازی DNA از یک نمونه با استفاده از ترکیبی از روشهای فیزیکی و شیمیایی است. در حوزه گیاهان دارویی استخراج DNA از اهمیت بسیاری برخوردار است. در این فرآیند، DNA خالص از سایر ماکرومولکول‌هایی که در ساختار سلول وجود دارند مانند پروتئین‌ها و لیپیدها جدا می‌شود. گیاه کما یکی از گیاهان دارویی ارزشمند از خانواده چتریان است. در این مطالعه پنج روش استخراج ژنوم کل در برگهای تازه و خشک گیاه کما مورد رزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که در تمام روشهای استخراج، ژنوم حاصل دارای ناخالصی می باشد. بیشترین میزان DNA استخراج شده از نمونه های تازه مربوط به روش CTAB اصلی و بیشترین میزان DNA استخراج شده از نمونه های خشک مربوط به روش موری و تامپسون می باشد. همچنین در گیاه کما بدون حضور PVP و بتامرکاپتواتانول می‌توان ژن هسته‌ای را با موفقیت توسط PCR تکثیر نمود. نتایج بررسی کمیت و کیفیت DNAهای استخراج شده از گیاه کما نشان داد که روش CTAB اصلی برای نمونه‌های جوان و تازه کما و روش CTAB تغییر یافته اول برای نمونه‌های خشک از کیفیت (کمترین میزان ناخالصی در DNA استخراج شده) بهتری نسبت به سایر روش‌ها برخوردار بودند. کیفیت DNA این نمونه‌ها روی ژل آگارز هم مطلوب بودند.

واژگان کلیدی: CTAB، موری و تامپسون، nrDNA ITS، کما

۱. مقدمه

جداسازی DNA یکی از اساسی‌ترین و ضروری‌ترین تکنیک‌ها در مطالعه DNA است و به طور گسترده در تحقیقات سلولی و مولکولی، تشخیص بیماری‌های ژنتیکی و سرطان‌ها، مهندسی ژنتیک، بیوتکنولوژی و همچنین پزشکی قانونی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Lázaro-Silva et al., 2015; Tan and Yiap, 2009). استخراج DNA با کیفیت اولین گام در آنالیز و دست‌ورزی DNA است (Lázaro-Silva et al., 2015; Nunes et al., 2011). جداسازی DNA شامل فرآیند خالص سازی DNA از یک نمونه با استفاده از ترکیبی از روش‌های فیزیکی و شیمیایی است. در این فرآیند، DNA خالص از سایر ماکرومولکول‌هایی که در ساختار سلول وجود دارند مانند پروتئین‌ها و لیپیدها جدا می‌شود (Brady et al., 1990).

DNA را می‌توان از تمامی سلول‌ها چه زنده و چه مرده استخراج نمود (Sahu et al., 2012). در حوزه گیاهان دارویی استخراج DNA از اهمیت بسیاری برخوردار است. در گذشته اکثر تحقیقات در گیاهان دارویی به استخراج مواد موثره و ترکیبات ثانویه گیاهان معطوف شده بود. در حالی که امروزه پژوهشگران در تلاش هستند تا بتوانند راهکارهای جدیدی را برای اصلاح گیاهان دارویی ارائه دهند. امروزه خطرات مختلف از جمله خشکسالی، چرای بیش از حد دام، برداشت بیش از حد گیاهان دارویی، ذخایر ژنتیکی این گیاهان را در خطر انقراض قرار داده است. از این رو محققین به دنبال استفاده از روش‌های نوین بیوتکنولوژی در جهت ارائه راهکارهای حفاظت ژنتیکی می‌باشند که همه این کارها منوط بر استخراج DNA با کیفیت و کمیت بالا در این گیاهان است. با وجود تنوع فراوان بین روش‌های استخراج، اشتراک‌هایی نیز ما بین آن‌ها وجود دارد و باید به این نکته توجه کرد که استخراج DNA باید به ملایم‌ترین شیوه ممکن صورت گیرد تا از آسیب به DNA و شکستن آن به قطعات کوچکتر جلوگیری شود (Anuradha et al., 2013) .

یکی از مهم‌ترین نکات در استخراج DNA این است که روش به کار رفته باید سریع، ایمن و مقرون به صرفه باشد. همچنین روش استخراج DNA موثر باید طی استخراج به DNA آسیب نرساند و آلاینده‌ها را به طور موثر از بین ببرد. صرف نظر از نوع رویکرد مولکولی، پاکسازی نمونه‌های ژنومی DNA باید مقدار کافی از DNA را با خلوص کافی تولید کند تا از مهار یا دخالت در واکنش‌های آنزیمی طی PCR، از قبیل آنالیز RAPD، AFLP و SSR جلوگیری شود (Nunes et al., 2011). برخی از مهم‌ترین روش‌های استخراج DNA از سلول‌های گیاهی شامل روش‌های: مورای و تامسون، CTAB و دلاپورتا است (Henderson et al., 2013; Csaikl et al., 1998; Jordan et al., 2001).

بعضی از این روش‌ها مبتنی بر نمک و بعضی دیگر مبتنی بر حرارت هستند که روش‌های مبتنی بر نمک برای استخراج DNA با کیفیت بالا مورد استفاده قرار می‌گیرند (Shabnam and Saeed, 2016; Rezadoost et al., 2016) . روش‌های مبتنی بر حرارت منجر به لیز سلولی سریع در بافت‌های مختلف می‌شوند (Shabnam and Saeed, 2016; Akkurt, 2012). برخی از مطالعات برای استخراج DNA از گیاهان آبزی از روش CTAB استفاده کردند (Shabnam and Saeed, 2016; Sika et al., 2015; Stein and Thompson, 1978). اما این روش گاهی اوقات نیاز به یکسری تغییرات برای استخراج DNA با کیفیت دارد به طوری که این DNA را بتوان برای PCR به کار گرفت. همچنین همان طور که اشاره شد کیت‌های تجاری زیادی برای استخراج DNA از گیاهان وجود دارد ولی مشکل اساسی این کیت‌ها هزینه زیاد آن‌ها برای هر نمونه است (Shabnam and Saeed, 2016; Kim et al. 1997). دستورالعمل مورای و تامسون به خاطر سهولت آن معمولا کارایی خوبی دارد (Csaikl et al., 1998; Henderson et al., 2013). اما در برخی موارد نیز این روش پاسخگو نمی‌باشد و هر گونه گیاهی و هر نمونه خاص از گیاه نیازمند تیمار ویژه‌ای می‌باشد (Csaikl et al., 1998; Tan and Yiap, 2009).

با وجود روش‌های استخراج مختلف، گاهی اوقات DNA استخراج شده از نظر کیفیت و یا کمیت مطلوب نیست. وجود متابولیت‌های ثانویه در گیاهان عالی، استخراج DNA را با مشکل مواجه می‌کند (Csaikl et al., 1999). که این موضوع به دلیل حذف نشدن مواد زائدی هم‌چون: پلی‌فنل‌ها، تانن‌ها و برخی پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهای متصل شونده با DNA (Lázaro- Silva et al., 2015; Csaikl et al., 1998) و یا غلظت کم DNA استخراج شده می‌باشد (Boom et al., 1990; Csaikl et al., 1998). همان‌طور که قبلا گفته شد پودر CTAB یکی دیگر از موادی است که در روش CTAB مورد استفاده قرار می‌گیرد. CTAB به عنوان یک ماده شوینده با مولکول DNA کمپلکس تشکیل داده و آن را از موادی هم‌چون کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و غیره جدا می‌کند (Ferdous et al., 2012). به دلیل اهمیت بسیار زیاد گیاهان دارویی در زندگی انسان، در این مطالعه چندین روش استخراج ژنوم در گیاه دارویی کما مقایسه شدند.

۲. مواد و روش‌ها

گیاه کما *Ferula ovina* مورد استفاده در این مطالعه از شیب‌های شمالی انبان کوه در ارتفاع ۱۵۵۰ متر جمع‌آوری گردید. گیاهان جمع‌آوری شده با آب مقطر شستشو داده شدند و قسمتی از آن‌ها در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و قسمت دیگری نیز در دمای اتاق خشک شدند. سپس از برگ تازه و خشک گیاه کما *Ferula ovina* به پنج روش شامل CTAB، دو روش تغییر یافته CTAB، روش تغییر یافته موری و تامسون و روش کیت Gene All استخراج DNA انجام گرفت.

روش CTAB اصلی

مراحل روش استخراج CTAB به صورت زیر است:

۱) ۰/۲۵ گرم برگ گیاه تازه و یا ۰/۱۲۵ گرم برگ گیاه هرباریومی به همراه ۳ میلی لیتر بافر CTAB گرم شده (۶۰ درجه سانتی گراد) در هاون سابیده شدند و ۶ میکرولیتر ۲-مرکاپتواتانول (۰/۲ درصد v/v بافر استخراج) به آن اضافه شد.

۲) ۴۰۰ میکرولیتر از مخلوط همگن به میکروتیوبها انتقال یافته و میکروتیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد در حمام قرار داده شدند.

۴) دو برابر حجم به هر نمونه کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه شد و مخلوط شدند.

۵) میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند.

۶) دو برابر حجم مایع رویی، ایزوپروپانول سرد به هر نمونه اضافه گردید.

۷) میکروتیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند.

۸) مایع رویی دور ریخته شد و رسوب با ۲۵۰ میکرولیتر محلول حاوی (اتانول ۷۶٪ و استات آمونیوم ۱۰ میلی‌مولار) شستشو داده شد.

۹) میکروتیوب‌ها به مدت دو دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و با دور ریختن مایع رویی، رسوب حاصل در دمای اتاق خشک گردید.

۱۰) ۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه به هر میکروتیوب اضافه شد و رسوب DNA حل گردید و در نهایت DNA استخراج شده در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

روش CTAB تغییر یافته اول

این روش CTAB تغییر یافته طبق روش اصلی انجام شد. تنها تفاوت این روش با روش اصلی در این است که در آن از بتامرکاپتواتانول استفاده نشد.

روش CTAB تغییر یافته دوم

این روش CTAB تغییر یافته نیز طبق روش اصلی انجام شد. در این روش از استات آمونیوم در بافر شستشو استفاده نشد و جهت شستشو رسوب DNA تنها اتانول ۷۶ درصد به کار رفت.

روش تغییر یافته موری و تامسون

مراحل استخراج DNA با روش تغییر یافته موری و تامسون

۱) ۰/۲۵ گرم برگ گیاه تازه و یا ۰/۱۲۵ گرم برگ گیاه هرباریومی به همراه ۱۸۷۵ میکرولیتر بافر CTAB در هاون اتوکلاو شده سابیده شد و سپس ۷/۵ میکرولیتر مرکاپتواتانول (۰/۴ درصد) به آن اضافه شد.

۲) ۷۵۰ میکرولیتر از مخلوط همگن به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد و سه میکروتیوب برای هر گیاه تهیه گردید.

۳) ۷۵۰ میکرولیتر از مخلوط همگن به هر میکروتیوب اضافه شده و میکروتیوب‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در حمام قرار داده شدند.

۴) ۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) به هر نمونه اضافه و هم زده شد.

۵) میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در در ۱۰۰۰۰ rpm در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند.

۶) مایع رویی برداشته شد و به میکروتیوب‌های جدیدی انتقال یافت و ۰/۳۳ حجم مایع رویی ایزوپروپانول سرد به هر نمونه اضافه گردید.

۷) میکروتیوب‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند.

۸) مایع رویی دور ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE، ۰/۱ حجم هموژنات سدیم اگزالواستات ۵/۲ مولار و ۲ برابر حجم هموژنات اتانول ۹۵ درصد سرد به هر میکروتیوب اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

۹) نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند سپس مایع رویی دور ریخته شد و یک میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد به رسوب میکروتیوب‌ها اضافه گردید.

۱۰) میکروتیوب‌ها به مدت چهار دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و با دور ریختن مایع رویی رسوب در ۳۰ میکرولیتر بافر TE حل شد و DNA به دست آمده در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

روش کیت Gene All

طبق پروتوکل کیت انجام شد.

بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

پس از استخراج DNA، کمیت و کیفیت آن از گیاهان مختلف و روش‌های متفاوت، با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر بررسی شد و نسبت جذب در ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر به عنوان شاخص کیفیت محاسبه شد. هم‌چنین کیفیت DNA استخراجی با الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد TBE (w/v) نیز بررسی شد.

ژن‌های تکثیر شده با PCR

بخش‌هایی از ناحیه فاصله انداز رونویسی شونده داخلی۱ (ITS) در DNA ریبوزومی هسته‌ای۲ (nrDNA) توسط پرایمرهای عمومی به نام های ITS5m و ITS4 طی واکنش PCR تکثیر شدند.

تحلیل آماری در این مطالعه با برنامه SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. به دلیل تعداد کم تکرارها در هر جمعیت، امکان بررسی نرمال بودن داده‌ها و استفاده از آزمون‌های پارامتریک وجود نداشت. بر همین اساس از توزیع احتمال آماره من-ویتنی۳ و همچنین آزمون کروسکال-والیس۴ استفاده شد.

۳. نتایج و بحث

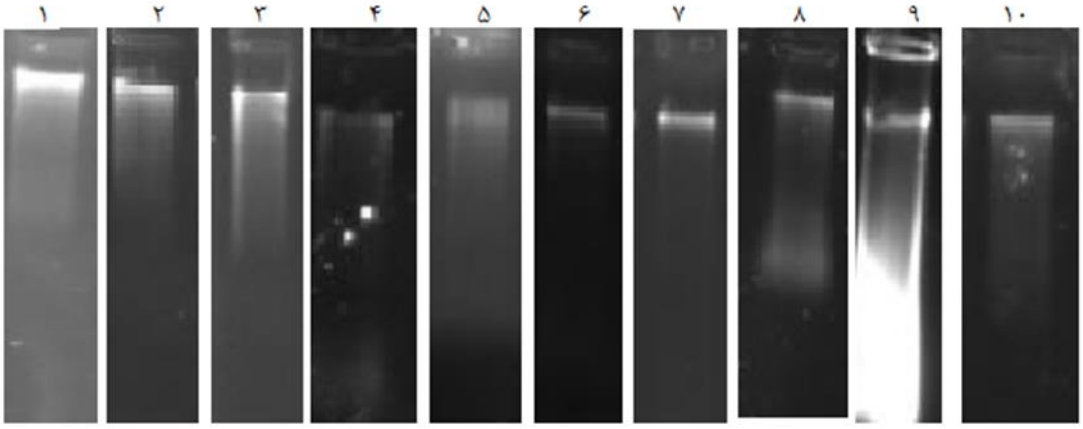
جدول ۱. نتایج جذب DNA استخراج شده (انحراف معیار± میانگین) از گیاه کما *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss با روش‌های مختلف

روش‌های استخراج DNA	A260/A280	A260/A230	غلظت DNA (µg/ml)	A320
CTAB اصلی نمونه تازه	۱/۰±۵۸/۲۲	۰/۰±۷۰/۲۰	۶۶±۱۲۷/۱۸	۰/۰±۰۳/۰۳
CTABتغییر یافته اول نمونه تازه	۱/۰±۵۰/۱۲	۰/۰±۳۷/۰۵	۴۳±۱۱۱/۴	۰/۰±۰۸/۰۵
CTABتغییر یافته دوم نمونه تازه	۱/۰±۳۶/۰	۰/۰±۵۱/۰۳	۱۱±۴۱/۳۱	۰/۰±۱۰/۱۳
موری و تامسون نمونه تازه	۱/۰±۳۷/۰۹	۰/۰±۵۱/۰۳	۱۷±۶۸/۴۳	۰/۰±۰۳/۰۱
کیت نمونه تازه	۱/۰±۳۰/۰۴	۰/۰±۵۶/۱۱	۶۰/۲۷±۵/۵۷	۰/۰±۰۲/۰

[1] Internal Transcribed Space
[2] Nuclear Ribosomal DNA
[3] Mann Whitney
[4] Kruskal Wallis

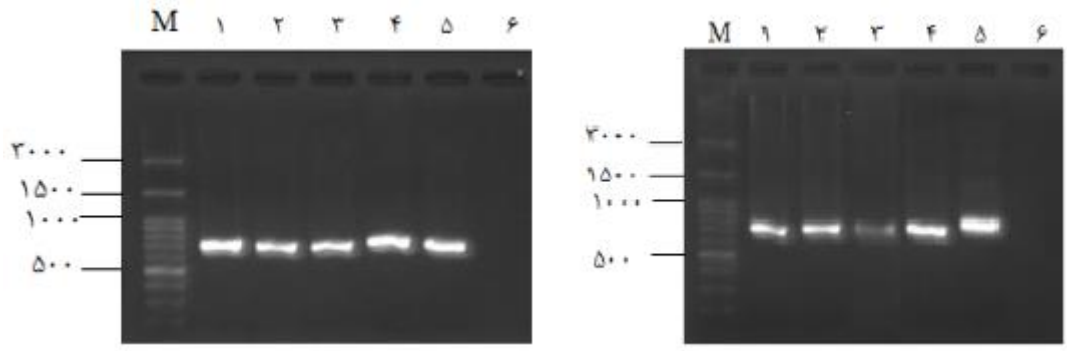
CTAB اصلی نمونه خشک	۱/۰±۵۲	۰/۰±۶۰/۱۴	۲۱±۱۷۵/۹	۰/۰±۰۳/۰
CTABتغییر یافته اول نمونه خشک	۱/۰±۶۴/۱۲	۰/۰±۹۵/۱۰	۲۲۱±۵۲۳	۰/۰±۱۰/۰۶
CTABتغییر یافته دوم نمونه خشک	۱/۰±۱۶/۰۱	۰/۰±۶۷/۳۱	۱۴۰±۱۱۸	۰/۰±۰۴/۰۶
موری و تامسون نمونه خشک	۱/۰±۲۸/۰۲	۱/۰±۰۴/۰۱	۴۵±۲۵۹۱	۰/۰±۶۶/۱۹
کیت نمونه خشک	۱/۰±۴۵/۱۹	۰/۰±۵۷/۱۲	۵۰/۰±۵/۷	۰/۰±۰۱/۰۱

روش‌های (الف تا ث) به ترتیب شامل روش CTAB اصلی، CTAB تغییر یافته اول، CTAB تغییر یافته دوم، موری تامسون وکیت در گیاه تازه کما است. روش‌های (ج تا د) به ترتیب شامل روش CTAB اصلی، CTAB تغییر یافته اول، CTAB تغییر یافته دوم، موری تامسون وکیت Gene All در گیاه کمای خشک است. نتایج به دست آمده میانگین با سه بار تکرار هستند.



شکل ۱- الکتروفورز DNA استخراج شده از گیاه تازه و خشک کما با روش‌های مختلف: چاهک‌های شماره (۱تا ۵) و (۶ تا ۱۰) به ترتیب شامل روش‌های CTAB اصلی، CTAB تغییر یافته اول، CTAB تغییر یافته دوم، موری تامسون و کیت Gene All در گیاه تازه و خشک کما (*Ferula ovina*) می‌باشد.

همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود از نظر ظاهری روش CTAB اصلی در نمونه تازه کما (*Ferula ovina*) و روش CTAB تغییر یافته اول در نمونه‌های خشک بهتر بوده‌اند.



شکل ۲. الکتروفورز محصولات PCR قطعات ITS در DNA ریبوزومی هسته‌ای در گیاه کما (Ferula ovina). چاهک‌های ۱ تا ۵ به ترتیب مربوط به محصول PCR به دست آمده از DNA استخراج شده با روش‌های CTAB اصلی، CTAB تغییر یافته اول، CTAB تغییر یافته دوم، موری تامسون و کیت Gene All است. ژل سمت چپ مربوط به گیاه کمای تازه و ژل سمت راست مربوط به گیاه کمای خشک می‌باشد. M نشانگر وزن مولکولی DNA (DM2300) است. چاهک شماره ۶، مربوط به کنترل منفی است.

در همه روش‌های استخراج DNA به کار رفته برای گیاه کما، محصول PCR در اندازه مورد نظر تکثیر شد. اندازه محصول PCR قطعه ITS کما ۷۱۶bp می‌باشد.

جداسازی DNA ژنومی ایده آل برای طیف گسترده‌ای از روش‌های زیست شناسی مولکولی به کار می‌رود، اما این کار در بعضی از گیاهان دشوار است، به خصوص در گیاهانی که حاوی فنل‌ها، پلی‌فنل‌ها، پلی ساکاریدها، ترپن‌ها و رزین‌ها هستند (Kruskal et al., 1952; Porebski et al., 1997) چه بسا بسیاری از دانشجویان و محققان به ناچار باید زمان زیادی صرف بهینه سازی روش استخراج DNA از گیاهانی بنمایند که حاوی چنین ترکیباتی می‌باشند(Ziegenhagen and Scholz, 1998) . از آنجایی که در اکثر فنون آزمایشگاهی از تکنیک PCR برای آنالیز DNA استخراج شده استفاده می‌شود و با توجه به حساسیت زیاد این روش به یک الگوی مناسب با کمیت و کیفیت مطلوب، (Schenk et al., 1999; Olson and Morrow, 2012). بهینه‌سازی روش‌های استخراج DNA اهمیت یافته است. وجود ترکیبات بازدارنده در محلول DNA استخراج شده باعث جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های پلیمراز در واکنش PCR و همچنین مانع عمل آنزیم‌های برشگر می‌شود . ,.Choudhary et al) (2008; Kouchi and Hata, 1993. انتخاب روش استخراج DNA در گیاهان دارویی منوط به مواردی چون نوع گیاه، متابولیت‌های ثانویه گیاه و تعداد نمونه می‌باشد. در بعضی تحقیقات به دلایل مختلفی نمونه‌های گیاهی مورد مطالعه از طبیعت جمع آوری می‌شود که این گیاهان معمولا به صورت خشک هستند و استخراج DNA از بافت گیاهی این نمونه‌ها به علت وجود کربوهیدرات‌ها، ترکیبات پلی فنلی و پروتئین‌ها با مشکلاتی روبه‌رو است (Fang et al., 1992; Azmat et al., 2012).

پلی فنل‌ها و فنل‌ها در فرم اکسید شده به صورت کوالانسی به پروتئین‌ها و DNA متصل می‌شوند و به DNA رنگ قهوه‌ای می‌دهند و همچنین پلی‌ساکاریدها نیز به شکل کمپلکس با اسیدهای نوکلئیک متصل می‌شوند (Varadarajan and Prakash, 1991; Choudhary et al., 2008; Angeles et al., 2005; Katterman and Shattuck, 1983)، که تغییر در pH و ترکیب بافر استخراج می‌تواند در بهبود کمیت و کیفیت DNA استخراج شده تا حدودی موثر باشد (Kouchi and Hata, 1993; Lodhi et al., 1994). به طور کلی، بافت‌های بالغ گیاهی به دلیل داشتن غلظت‌های بالای پلی‌ساکاریدها، پلی فنل‌ها و سایر متابولیت‌های ثانویه برای استخراج DNA ارجح نیستند (Azmat et al., 2012). پلی ساکاریدها یکی از مهم‌ترین عوامل مهار واکنش PCR هستند که روی فعالیت آنزیم DNA پلیمراز تاثیر می‌گذارند. به همین دلیل روشی برای جداسازی DNA بهتر است که DNA

استخراج شده حاوی کمترین میزان پلی ساکارید باشد. در ضمن روش‌هایی که نیاز به تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی نداشته باشد و با هزینه کمتری بتوان DNA قابل استفاده از لحاظ کمی و کیفی به دست آورد، بسیار حائز اهمیت هستند.

کمیت و کیفیت DNAهای استخراج شده از گیاه کما در این مطالعه با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری (جدول ۱) و الکتروفورز روی ژل آگارز (شکل ۱) بررسی گردید و در نهایت کیفیت DNAها از لحاظ قابلیت تکثیر ژن هسته‌ای با روش PCR آزمایش شدند (شکل ۲). این امر به این خاطر بود که خلوص DNA می‌تواند به شدت تحت تاثیر پلی ساکاریدها، لیپیدها، پلی فنل‌های موجود در نمونه و یا حتی مواد شیمیایی به کار رفته برای استخراج، مانند CTAB قرار گیرد (Abdel-Latif and Osman, 2017).

نتایج اسپکتروفتومتری نشان داد که DNA استخراج شده با روش CTAB اصلی برای نمونه‌های جوان و تازه کما و روش CTAB تغییر یافته اول برای نمونه‌های خشک از کیفیت (کمترین میزان ناخالصی در DNA استخراج شده) بهتری نسبت به سایر روش‌ها برخوردار بودند. کیفیت DNA این نمونه‌ها روی ژل آگارز هم مطلوب بودند.

مقایسه نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که از میزان ۰/۲۵ گرم ماده برگی تازه برای گیاه کما بیشترین مقدار DNA به میزان ۱۲۷ میکروگرم در میلی‌لیتر برای برگ‌های تازه جوان با روش CTAB اصلی و از میزان ۰/۱۲۵ گرم ماده برگی خشک بیشترین مقدار DNA به میزان ۲۵۹۱ میکروگرم در میلی‌لیتر برای برگ‌های خشک با روش موری و تامسون بدست آمده است. در نمونه تازه برگ گیاه کما روش CTAB اصلی هم از نظر کیفیت و هم از نظر کمیت، در میان پنج روش بهترین نتیجه را نشان داد. اما در مورد نمونه خشک برگ گیاه کما اگر چه کیفیت DNA در روش CTAB تغییر یافته اول مطلوب است، اما میزان DNA به دست آمده ۵۲۳ میکروگرم در میلی‌لیتر و کمتر از روش موری و تامسون بوده است. می‌توان این گونه نتیجه گرفت که روش موری و تامسون از نظر مقدار DNA استخراج شده روشی مناسبی برای نمونه‌های برگ خشک کما است. اما به طور کلی تفاوت معناداری ($P > ۰/۰۵$) بین هیچ یک از روش‌های به کاربرده شده برای نمونه‌های تازه و خشک کما وجود نداشت.

در این مطالعه دامنه جذب ۲۶۰/۲۸۰ برای نمونه‌های تازه و خشک کما ۱/۱۶-۱/۶۴ بود که نشان دهنده وجود ناخالصی‌های پروتئینی یا ترکیبات پلی فنلی در تمام نمونه‌های استخراج شده است. دامنه جذب ۲۶۰/۲۳۰ هم برای نمونه‌های تازه و خشک کما بین ۰/۳۷-۱/۰۴ بود که نشان می‌دهد در تمام DNAهای استخراج شده آلودگی‌های کربوهیدارت، فنل، نمک و یا ترکیبات تریس یا EDTA وجود دارد.

اگر چه مطالعه‌ای روی گونه گیاه کما در زمینه استخراج DNA انجام نشده است که بتوان نتایج پژوهش حاضر را با آن مقایسه کرد، ولی در کار تحقیقاتی دیگری، استخراج DNA روی برگ‌های گیاه *Ferula jaeschkeana* با تغییراتی در روش استخراج CTAB انجام گرفت. از آنجا که برگ‌های این گیاه سرشار از پلی‌فنل‌ها و پلی ساکاریدها است، محققین محتویات بافر جداسازی را بهینه سازی کردند، آن‌ها برخی از مراحل استخراج را با استفاده مکرر از غلظت بالای PVP و اصلاح دما و مدت زمان رسوب DNA اصلاح نمودند. همچنین از CTAB دو درصد، PVP سه درصد و بتا-مرکاپتواتانول دو درصد برای بهینه سازی بافر استخراج استفاده شد (Matin et al., 2014; Jordan et al., 2001). اما نتایج حاصل از گیاه کما تازه و خشک در این بررسی نشان داد که بدون حضور PVP و بتامرکاپتواتانول می‌توان ژن هسته‌ای را با موفقیت توسط PCR تکثیر نمود.

منابع

Abdel-Latif, A., Osman, G. 2017. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. Plant Methods. 1;13(1):1.

Akkurt, M. 2012. Comparison between modified DNA extraction protocols and commercial isolation kits in grapevine (Vitis vinifera L.). Genetics and molecular Research. 1;11(3):2343-51.

Angeles, J.G., Laurena, A.C., Tecson-Mendoza, E.M. 2005. Extraction of genomic DNA from the lipid-, polysaccharide-, and polyphenol-rich coconut (Cocos nucifera L.). Plant Molecular Biology Reporter. 1;23(3):297-8.

Anuradha, H.J., Vijayan, K., Nair, C.V., Manjula, A. 2013. A novel and efficient protocol for the isolation of genomic DNA from mulberry (Morus L.). Emirates Journal of Food and Agriculture. 124-31.

Azmat, M.A., Khan, I.A., Cheema, H.M., Rajwana, I.A., Khan, A.S., Khan, A.A. 2012. Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of Mangifera indica L. Journal of Zhejiang University Science B. 1;13(4):239-43.

Boom, R.C., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van, Dillen P.M., Van der Noordaa, J.P. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of clinical microbiology. 1;28(3): 495-503.

Brady, G., Barbara, M., Iscove, N.N. 1990. Representative in vitro cDNA amplification from individual hemopoietic cells and colonies. Methods Mol Cell Biol. 2(1): 17-25.

Choudhary, K., Mathur, N., Choudhary, O.P., Pillai, U. 2008. Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh leaves of Vigna species suitable for RAPD and restriction digestion. Advances in Biological Research. 2(5-6):83-9.

Csaikl, U.M., Bastian, H., Brettschneider, R., Gauch, S., Meir, A., Schauerte, M., Scholz, F., Sperisen, C., Vornam, B., Ziegenhagen, B. 1998. Comparative analysis of different DNA extraction protocols: a fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies. Plant Molecular Biology Reporter. 16(1):69-86.

Fang, G., Hammar, S., Grumet, R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biotechniques. 1;13(1):52-4.

Ferdous, J., Hanafi, M.M., Rafii, M.Y., Muhammad, K. 2012. A quick DNA extraction protocol: Without liquid nitrogen in ambient temperature. African Journal of Biotechnology. 11(27):6956-64.

Ferdous, J., Hanafi, M.M., Rafii, M.Y., Muhammad, K. 2012. A quick DNA extraction protocol: Without liquid nitrogen in ambient temperature. African Journal of Biotechnology. 11(27):6956-64.

Henderson, G., Cox, F., Kittelmann, S., Miri, V.H., Zethof, M., Noel, S.J., Waghorn, G.C., Janssen, P.H. 2013. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. PloS one. 11;8(9): e74787.

Jordan, R.C., Daniels, T.E., Greenspan, J.S., Regezi, J.A. 2001. Advanced diagnostic methods in oral and maxillofacial pathology. Part I: molecular methods. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology. 1;92(6):650-69.

Jordan, R.C., Daniels, T.E., Greenspan, J.S., Regezi, J.A. 2001. Advanced diagnostic methods in oral and maxillofacial pathology. Part I: molecular methods. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology. 1;92(6):650-69.

Katterman, F.R., Shattuck, V.I. 1983. An effective method of DNA isolation from the mature leaves of Gossypium species that contain large amounts of phenolic terpenoids and tannins. Preparative biochemistry. 1;13(4):347-59.

Kim, C.S., Lee, C.H., Shin, J.S., Chung, Y.S., Hyung, N.I. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. Nucleic acids research. 1;25(5):1085-6.

Kouchi, H., Hata, S. 1993. Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. Molecular and General Genetics MGG. 1;238(1-2):106-19.

Kruskal, W.H., Wallis, W.A. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. Journal of the American statistical Association. 1;47(260):583-621.

Lázaro-Silva, D.N., De Mattos, J.C., Castro, H.C., Alves, G.G., Amorim, L.M. 2015. The use of DNA extraction for molecular biology and biotechnology training: a practical and alternative approach. Creative Education. 19;6(08): 762.

Lázaro-Silva, D.N., De Mattos, J.C., Castro, H.C., Alves, G.G., Amorim, L.M. 2015. The use of DNA extraction for molecular biology and biotechnology training: a practical and alternative approach. Creative Education. 19;6(08):762.

Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., Reisch, B.I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars andVitis species. Plant Molecular Biology Reporter. 1;12(1):6-13.

Matin, M.M., Nakhaeizadeh, H., Bahrami, A.R., Iranshahi, M., Arghiani, N., Rassouli, F.B. Ferutinin, an apoptosis inducing terpenoid from Ferula ovina. Asian Pac J Cancer Prev. 1;15(5):2123-8.

Nunes, C.F., Ferreira, J.L., Fernandes, M.C., Breves, S.D., Generoso, A.L., Soares, B.D., Dias, M.S., Pasqual, M., Borem, A., Cançado, G.M. 2011. An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. Ciência Rural. 41(8): 1383-9.

Olson, N.D., Morrow, J.B. 2012. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. BMC research notes. 1;5(1):668.

Porebski, S., Bailey, L.G., Baum, B.R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant molecular biology reporter. 1;15(1):8-15.

Rezadoost, M.H., Kordrostami, M., Kumleh, H.H. 2016. An efficient protocol for isolation of inhibitor-free nucleic acids even from recalcitrant plants. 3 Biotech. 1;6(1):61.

Sahu, S.K., Thangaraj, M., Kathiresan, K. 2012. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. ISRN Molecular Biology. 14: 2012.

Schenk, P.M., Sagi, L., Remans, T., Dietzgen, R.G., Bernard, M.J., Graham, M.W., Manners J.M. 2012. A promoter from sugarcane bacilliform badnavirus drives transgene expression in banana and other monocot and dicot plants. Plant molecular biology.1;39(6):1221-30.

Shabnam, A., Saeed, A. 2016. An efficient and simple CTAB based method for total genomic DNA isolation from low amounts of aquatic plants with a high level of secondary metabolites. Progress in Biological Sciences. 6(1): 95-106.

Sika, K.C., Kefela, T., Adoukonou-Sagbadja, H., Ahoton, L., Saidou, A., Baba-Moussa, L., Baptiste, L.J., Kotconi, S.O., Gachomo, E.W. 2015. A simple and efficient genomic DNA extraction protocol for large scale genetic analyses of plant biological systems. Plant Gene. 1;1:43-5.

Stein, D.B., Thompson, W.F. 1978. Isolation of DNA from tannin-containing plants. Plant Science Letters. 1;11(3-4):323-8.

Tan, S.C., Yiap, B.C. 2009. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. BioMed Research International. 30; 2009.

Varadarajan, G.S., Prakash, C.S. 1991. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. Plant Molecular Biology Reporter. 1;9(1):6-12.

Ziegenhagen, B., Scholz, F. 1998. Methods for difficult plant species/tissues. InMolecular tools for screening biodiversity 1998 (pp. 32-35). Springer, Dordrecht.

Comparison of total genome extraction methods in medicinal plant *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss.

Zahra Alidoosty shahraky[1], Atefe Amirahmadi*[1], Parisa Farrokh[1], Arezou Rezaei[1], Javad Ghasemian[2]

1. School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran
2. School of mathematics and computer sciences, Damghan University, Damghan, Iran.

Abstract

DNA extraction is one of the most basic and essential techniques in the study of DNA. Genome isolation involves the process of purifying DNA from a sample using a combination of physical and chemical methods. In the field of medicinal plants, DNA extraction is very important. In this process, pure DNA is separated from other macromolecules present in the cell structure such as proteins and lipids. *Ferula ovina* is one of the valuable medicinal plants from the Apiaceae family. In this study, five genome extraction methods were evaluated in fresh and dry leaves of Dorema plant. The results of this study showed that in all extraction methods, the resulting genome has contaminations. The highest amount of DNA extracted from fresh samples is related to the original CTAB method and the highest amount of DNA extracted from dry samples is related to Murray and Thompson method. Also, nuclear gene can be successfully amplified by PCR in the Dorema plant without the presence of PVP and betamercaptoethanol. The results of examining the quantity and quality of DNAs extracted from Dorema plant showed that the original CTAB method for young and fresh Dorema samples and the first modified CTAB method for dry samples had better quality (the lowest amount of impurities in the extracted DNA) than other methods. DNA quality of these samples on agarose gel was good.

Keywords: CTAB, Murray and Thompson, nrDNA ITS, *Ferula ovina*

نقش متابولیت های ثانویه گیاهی تولید شده در کشت بافت گیاهی در پیشگیری از آلزایمر

اسماعیل پورمحمد*، اکبر نورسته نیا، فاطمه جمال امیدی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

چکیده

امروزه اهمیت و نقش پررنگ گیاهان دارویی سلامت محور، در جلوگیری، درمان و از بین بردن بیماری‌ها، به خوبی بر همگان روشن گردیده است. ما کاربرد و استفاده از متابولیت های ثانویه گیاهی سلامت محور را از اجداد و نیاکان خویش به ارث برده ایم و با توسعه فناوری‌ها، رونق شرکت‌های دانش‌بنیان و سرمایه گذاری در حوزه مبتنی بر این گیاهان، دامنه استفاده درمانی و پیشگیرانه گیاهان دارویی را در زندگی و جامعه افزایش داده ایم. پلی فنول ها ریز مغذی های ترکیبات طبیعی هستند که از گیاهان در برابر آسیب محافظت می کنند و دارای خواص آنتی اکسیدانی قوی با مزایای سلامتی بالقوه برای انسان ها نیز هستند. پلی فنول ها به خاطر نقششان در محافظت از بدن در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از عوامل استرس زای محیطی مانند آلودگی و غذاهای سرخ شده که باعث ایجاد رادیکال های آزاد در بدن ما می شوند، شناخته می شوند. آنتی اکسیدان ها می توانند این رادیکال های آزاد مضر را خنثی کنند و از آسیب رساندن به سلول های ما جلوگیری کنند، بیماری آلزایمر شکل پیشرونده ای از زوال عقل است که باعث مشکلات حافظه، تفکر و رفتار می شود. این بیماری با تأثیرات عمیقی بر هوش، مراقبت از خود، اختلال گفتار و اختلال عملکرد، اختلال عملکرد حرکتی و شناختی همراه است. گیاهان دارویی را می توان با مکانیسم های مختلفی در درمان و پیشگیری از آلزایمر استفاده کرد و در آینده به عنوان داروهای طبیعی موثر ضد آلزایمر بکار برد.

واژگان کلیدی: متابولیت های گیاهی ، آلزایمر ، پلی فنول ، متابولیت ثانویه

کشت بافت گیاهی

* E-mail: Esmailpurmohamad@gmail.com

در سال ۱۹۰۲، گوتلیب هابرلند مبانی نظری کشت بافت گیاهی رو ارائه کرد. او اشاره کرد که چگونه کشت سلولی گیاهان می توانند کمک کنند که ما به درک خواص و پتانسیل سلولی کل گیاه پی ببریم. او همچنین توضیح داد که چگونه این تکنیک می تواند به دانشمندان در درک فرآیندهای پیچیده گیاهان و ارتباط متقابل آنها با سایر موجودات و محیط اطرافشان کمک کند. با این حال، هابرلند واقعاً نتوانست نظریه خود را از طریق یک آزمایش به نمایش بگذارد. او با برخی از سلول‌های تمایز یافته و سلول‌های برگ آزمایش کرد که نتیجه ای حاصل نشد، وی همچنین پیش‌بینی کرد که استفاده از سلول‌های رویشی می‌توانند راه بهتری برای دستیابی به جنین مصنوعی باشند. با گذشت زمان، هابرلند به دلیل ایده ها و مفاهیم پیشنهادی خود به عنوان پدر کشت بافت شناخته شد. کشت بافت عبارت است از تکثیر محصولات در آزمایشگاه در شرایط استریل. این توانایی را که انسان ها بتوانند گیاهان را به صورت کلونی تکثیرکنند، برای قرن ها رایج بوده است. از جمله تکثیر با قلمه، پیوند، بنه و غده (Swanson, 1992). کشت بافت گیاهی یکی از پیشرفت‌های بزرگ در تاریخ تحقیقات گیاهی است. این فناوری پیشرفته امکان بازسازی یک گیاه کامل را تنها از چند سلول فراهم می کند. در حال حاضر کاربردهای بیشتری از تکثیر کلونال وجود دارد که با استفاده از کشت بافت گیاهی و بیوتکنولوژی محقق می شود. همچنین با استفاده از این تکنیک می توان از گونه های در خطر انقراض نیز محافظت کرد، ژنوم گیاهان را حفظ و ثابت کرد که یک دارایی با ارزش و بی نظیر در کشاورزی است .مزیت اصلی این روش این است که مواد به طور یکنواخت و عاری از ویروس تولید می شوند و همچنین از میزان آفت کش های مصرفی در مراحل بعدی تولید کاسته می گردد. که هم از نظر زیست محیطی و هم از نظر اجتماعی بسیار سودمند می باشد. علاوه بر این، با استفاده از این تکنیک می توان در رشد برخی از محصولات زراعی که توانایی تکثیر از طریق بذر را ندارند و یا روند تکثیر آنها (به‌طور باورنکردنی) کند است هم مورد استفاده قرار داد و افزایش سرعت ایجاد کرد. همچنین جهت تولید ارقام یا ژنوتیپ های جدید هم می توان استفاده کرد (Rafiq, 2007).

از مهم ترین موارد استفاده از کشت بافت، می توان به تولید متابولیت های ثانویه و استفاده از ترکیبات متابولیتی در زمینه محصولات دارویی و آرایشی و زیبایی هم نام برد. محقق در روش کشت بافت قسمتی از گیاه را انتخاب می کند و پس از ضدعفونی و استریل، به محیط کنترل شده آزمایشگاهی انتقال می دهد. محققین در آزمایشگاه کشت بافت با استفاده از تجهیزات آزمایشگاهی شرایط مناسب جهت تکثیر و رشد نمونه ها اعم از شرایط آب، غذا، هوا، نور، دما و رطوبت را فراهم می کند. بطور خلاصه با توجه به توسعه و تمایل به بهره وری بالای تولید در چند دهه گذشته، از تکنیک‌های کشت بافت برای بهبود رشد گیاه، فعالیت‌های بیولوژیکی، تبدیل و تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده شده است. کشت بافت گیاهی امروزه ابزاری ضروری در پیشرفت علوم کشاورزی و کشاورزی مدرن می باشد (Thorpe, 2013).

در کشت بافت گیاهی، بیشتر اوقات یک ریز نمونه را برای شروع رشد در محیط کشت مصنوعی قرار می دهند. سلول های غیر فعال، تمایز یافته و تقسیم شده و ریز نمونه، در حین رشد در محیط غذایی، ابتدا متحمل تغییراتی برای وارد شدن به حالت مریستمی می شوند. ایده انجام آزمایشات با استفاده از بافت ها و اندام های مجزا شده گیاهان تحت شرایط آزمایشگاهی کنترل شده در اواخر قرن نوزدهم مطرح شده و در تحقیقات هابرلند فیزیولوژیست گیاهی معروف آلمانی، حدود ۹۰ سال پیش

بیان شده است (ملایری، ۱۳۷۵). کشت بافت جهت تکثیر گیاهان زینتی برای تولید تجاری و همچنین باغات خانگی و محوطه سازی تقاضای زیادی دارد (Chebet and Okeno, 2003).

کشت سلول و بافت گیاهی راهکاری برای بررسی مسیرهای بیوسنتزی مؤثر در تولید متابولیت های ثانویه و افزایش بیان ژن های درگیر در این مسیرهای بیوسنتزی را فراهم نمود تا بتوان کارآیی گیاهان به عنوان منابع تجدیدپذیر برای تولید دارو را افزایش داد (Kumar and Gupta, 2008; Mulabagal and Tsay, 2004). براساس فرضیه توتی پتانسی، هر سلول گیاهی تمام اطلاعات ژنتیکی گیاه والد را داراست و می تواند دامنه وسیعی از مواد بیوشیمیایی که در گیاه کامل یافت می شود را تولید نماید (Ramachandra & Ravishankar, 2002).

کلیات

گیاهان می توانند در بخش های متعددی مانند داروسازی، آرایشی، مواد غذایی و غیره استفاده شوند، گیاهانی که دارای متابولیت های درمانی با اثرات فارماکولوژیک مفید هستند، گیاهان دارویی نامیده می شوند. آنها به دلیل مقرون به صرفه بودن، در دسترس بودن، سازگاری با محیط زیست و اثربخشی امیدوارکننده قابل مقایسه با داروهای مصنوعی با هزینه بالا، توجه بیشتری را در میان جمعیت رو به رشد به خود جلب می کنند. بنابراین، توجه اولیه تحقیقات تا به امروز بر روی گیاهان دارویی در زمینه‌های فیتوشیمی و باغبانی متمرکز شده است. امروزه جهت رفع نیاز به متابولیت های ثانویه در جامعه، روش ها و استراتژی های جدید موجب افزایش بهره وری کمی و کیفی شده است (Winter, 2012). کلاس های مختلف متابولیت های ثانویه تولید شده توسط کالوس آزمایشگاهی و کشت سوسپانسیون سلولی که در (جدول ۱) ارائه شده است، به عنوان یک پلت فرم اصلی برای تولید متابولیت های ثانویه استفاده می شود (Yue, 2016). گروه ناهمگنی از محصولات متابولیک طبیعی در گیاهان دارویی به نام متابولیت های ثانویه وجود دارد، که برای رشد و نمو گیاهان الزامی نیستند. متابولیت های ثانویه نقش های مهمی را به عنوان مولکول های سیگنال و به عنوان عوامل دفاعی ایفا می کنند (Ncube and Staden, 2015).

جدول ۱: طبقات متابولیت های ثانویه موجود در بافت گیاهی

S.No.	Alkaloids	Tepenoids	Steroids	Quinones	Phenylpropnoid
1	Acidines	Aenisnin	Brasinoide	Ae-emodin	Anthocyanins
2	Betalaines	Cucubitacins	Bufaienaldes	Anthraguinones	feicadd
3	Furoquinolines	Ditepenes	Caaserone	Benanquinones	Coumatins
4	Galanthamine	Ginsenosdes	Digoxin	Chrysophanol	Eugenol
5	Harringonines Isoquinolines	Meroterpenes	Digoxin	Emodin	Feri aid
6	Lobeline	Monoerpees	Digitoxigenin	B.lapachol	Aavonoids
7	Quilmes	Pacitae	Ecdyteroids	Naphthoquinones	Hydroxycinnamoy derivatives
8	Indole alkaboids	Sesquiterpenes	Helleborin	Phenanthrene quinone	Isoflavonoids
9	Isoquinoline alkabids	Sestepenes	Pysodine	Pumbagin	Lignans
10	Piperidine	Thapsigargin	Oubain	bein	Pheralinones
11	Thebaine	Triterpenes	sellidine	stikonin	Proanthoyanidins
12	Tigoneline	Usanetritrpenoid	Steuidal geosides	Thymoquinone	Stbenes
13	Tropane alkaloids	Withanolides	Steoidal lactones	Uslone	Tannins

متابولیت های ثانویه به عنوان محصولات مهم اقتصادی در نظر گرفته می شوند زیرا در داروها، طعم دهنده ها، عطرها، حشره کش ها، رنگ ها و غیره استفاده می شوند (Guerriero, 2018). این ترکیبات دارویی با تغییر مسیرهای تولید انرژی در مسیرهای متابولیک مانند فتوسنتز، گلیکولیز، چرخه کربس و توسط واسطه های بیوسنتزی تولید می شوند. آنها بر اساس بیوسنتز، ساختار و عملکرد در دسته های مختلف طبقه بندی می شوند. این ترکیبات از استیل کوآنزیم A، اسید موالونیک، اسید شیکیمیک یا مسیرهای ترکیبی بیوسنتز می شوند (Sandra, 2018). با توجه به اهمیت گیاهان دارویی به عنوان منبع دارویی در جهان و نیز تغییر نگرش در خصوص استفاده از این گیاهان در درمان بیماری ها، ضرورت دارد پژوهش های جامعی صورت گیرد (Mulabagal, 2004). گیاهان دارویی به دلیل داشتن خواص ضددرد، ضد التهاب، ضدافسردگی، ضد اضطراب و غیره در صنایع دارویی کاربرد فراوانی دارند. مواد مؤثره موجود در گیاهان دارویی به دلیل همراه بودن با مواد زیستی دیگر در بدن انباشته نمی شوند و اثرات جانبی کمتری از خود به جای می گذارند. این امر سبب برتری این مواد نسبت به داروهای شیمیایی شده است (Castilho et al, 2006). بطور کلی عقیده بر این است که تولید متابولیت های ثانویه برای تنظیم سازگاری گیاه نسبت به عوامل نامساعد و تنش های محیطی صورت می گیرد و نشان دهنده به کار افتادن یک نوع جریان دفاعی برای استمرار تعادل فعالیت های حیاتی است. تولید مواد مؤثره گیاهان دارویی با هدایت فرآیندهای ژنتیکی صورت می گیرد. ولی به طور بارزی تحت تاثیر عوامل محیطی نیز قرار می گیرد، به طوری که عوامل محیطی سبب تغییراتی در رشد گیاهان دارویی و نیز کمیت و کیفیت مواد مؤثره آنها نظیر آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، استروئیدها، اسانس ها و امثال آنها می گردد (تفریشی و عزیزی، ۱۳۸۵).

مفهوم متابولیسم، متابولیت های اولیه و متابولیت های ثانویه

متابولیسم به تمام واکنش های شیمیایی موجود در ماده زنده اطلاق می شود که توسط آنزیم ها تنظیم و کنترل می شوند. راه های متابولیسمی اولیه، متابولیت های اولیه را تولید می کنند که تقریبا در همه جای طبیعت حضور دارند و برای تمام اشکال حیات ضروری هستند. این ترکیبات شامل قندهای معمولی، آمینو اسیدها، پورین ها و پیر یمیدین ها، کلروفیل ها، کربوهیدرات ها، چربی ها، پروتئین ها، اسیدهای نوکلیک و سایر ترکیباتی هستند که واحدهای ساختاری ارگانیسم ها را تشکیل می دهند (Tolonen, 2003). تولید متابولیت های ثانویه مانند کاروتنوئیدها، آنتوسیانین ها، آلکالوئیدها و فنل ها از جمله سازوکارهای دفاعی گیاهان در برابر پرتو فرابنفش می باشد. برخی از این ترکیبات علاوه بر ویژگی های دفاعی برای گیاه، دارای خواص دارویی برای انسان و دام نیز می باشند (Nasibi & Manouchehri Kalantari, 2006). متابولیت های ثانویه ترکیباتی هستند که نقش اساسی در متابولیسم نداشته و توزیع آنها از موجودی به موجود دیگر متفاوت است و نسبت به متابولیت های اولیه تولید محدودتری دارند. اگر چه بعضی از متابولیت های ثانویه عملکرد ثابت شده در موجود ندارند، بقیه به وضوح نقش بسیار حیاتی را بازی می کنند. برخی از متابولیت های ثانویه گیاهان انواع مختلفی از یک گروه خاص را شامل می شود که نشان دهنده هویت فردی گونه است. تولید این مواد نیز می تواند با توجه به شرایطی مانند محیط ارگانیسم یا مواد غذایی، متفاوت باشد. این ترکیبات ممکن است در فراهم کردن دفاع بر علیه آفات و پاتوژنها و حفاظت در برابر تابش UV و تنش، نقش داشته باشند یا به عنوان ترکیبات معطر فرار و رنگدانه های جذب کننده نور عمل کنند (Tolonen, 2003).

بطور کلی می توان گفت که متابولیت های ثانویه در گیاهانی که آن را سنتز می کنند هیچگونه نقش قابل توجهی در حفظ فرآیندهای اساسی زندگی آنها ندارند، اما نقش مهمی را در تعامل گیاه با محیط ایفاء می کنند. تولید این ترکیبات اغلب کم (وزن خشک کمتر از ۱٪) و تا حد زیادی به رشد و نمو گیاه بستگی دارد. بسیاری از متابولیت های ثانویه دارای یک ساختار پیچیده و منحصر به فرد بوده و تولید آنها اغلب توسط شرایط تنش زیستی و غیر زیستی افزایش می یابد. متابولیت های ثانویه در سلول و یا اندام های خاص گیاه ذخیره می شود و اغلب در واکوئل جمع می شود. متابولیت های ثانویه با تنوع شیمیایی زیادی یافت می شود و مشخصات هر گیاه با متابولیت های ثانویه آنها تعیین می شود. بر اساس منشاء بیوسنتز، متابولیت های ثانویه را می توان به لحاظ ساختاری به پنج گروه عمده تقسیم کرد: پلی کتیدها، ایزوپرنوئیدها (مانند ترپنوئیدها)، آلکالوئیدها، فنیل پروپانوئیدها و فلاونوئیدها. در حال حاضر شناخت ما از نقش متابولیت های ثانویه نسبتا محدود است. به طور کلی نقش متابولیت های ثانویه برای بقای گیاه در اکوسیستم مهم است، از آن جمله جلوگیری از مهاجمان بالقوه با فعالیت ضد میکروبی و ضد علفخواری و جذب حشرات مفید و گرده افشان ها در این زمینه قابل توجه می باشند (Oksman, 2004). بررسی روند رشد سلول که معمولا با یک منحنی نمایی انجام می شود مشخص می کند که بیشتر متابولیت های ثانویه در طول مرحله ی پایانی رشد تولید می شود (Bourgaud, 2002).

راهکارهای افزایش متابولیت های ثانویه گیاهی از طریق کشت بافت

با وجود پیشرفت ها در زمینه شیمی، فعالان صنایع دارویی هنوز نیازمند گیاهان مطلوب به عنوان منابع بیولوژیک برای تولید تعدادی از متابولیت های ثانویه از جمله مواد دارویی هستند (Daryani *et al*, 2016). استفاده از راهکارهای فناوری زیستی از جمله کشت سوسپانسیون سلولی، کشت اندام، کشت ریشه های موئین و ساقه راه حلی مناسب برای تولید سریع و انبوه متابولیت های ثانویه می باشد. بیشتر عناصر محیط کشت گیاهی از قبیل قندها، فسفات، نیترات و تنظیم کننده های رشد، شاخص های مهمی در رشد و تجمع متابولیت های ثانویه می باشند. دستکاری محیط کشت باید در افزایش تجمع محصول موثر باشد. روند بیوسنتز بسیاری از متابولیت های ثانویه توسط عوامل خارجی مانند سطح مواد مغذی، عوامل تنش، نور و تنظیم کننده های رشد تغییر می یابد که تاثیر برخی از این عوامل مانند نور، دما، pH محیط کشت و اکسیژن یا هوادهی بر تجمع متابولیت های ثانویه در انواع کشت ها مورد بررسی قرار گرفته است. در اغلب کشت های اندام، تولید متابولیت همراه با رشد اتفاق می افتد، بنابراین امکان تولید ریشه و متابولیت در یک بیورآکتور وجود دارد (Rao, 2002).

انواع متابولیت های ثانویه

بطور کلی در گیاهان چهار گروه اصلی گلیکوزیدها، آلکالوئیدها، روغن های فرار و سایر مواد مؤثر، (مواد تلخ، فلاون ها، فلاونوئیدها، موسیلاژها و کربوهیدرات ها) وجود دارد. سایر مواد و ترکیبات به دلیل گستردگی و ناهماهنگی ساختار شیمیایی شان در این دسته ها جای نمی گیرند. این ترکیبات به طور عمده در عصاره حاصل از استخراج با حلال اندام گیاهی مورد نظر یافت می شود. هردسته از این مواد به دلیل دارا بودن گروه های عاملی خاص شیمیایی درون ساختار مولکولی خود فعالیت ویژه ای را از نظر خواص بیولوژیکی، شیمیایی یا دارویی نشان می دهند (قوام، ۱۳۹۵). بسیاری از متابولیت های ثانویه همانند فنل ها و فلاونوئیدها، در کشت های درون شیشه ای نیز بیوسنتز شده و به عنوان منبع مهمی برای تهیه ترکیبات با ارزش اقتصادی مورد استفاده قرار می گیرند (Ramirez-Estrada et al, 2016).

آنتوسیانین ها رنگدانه های قرمز تا آبی رنگ موجود در گلبرگ گل های گیاهان مختلف هستند. این ترکیب ها ممکن است تا ۳۰٪ وزن گلبرگ های خشک را به خود اختصاص دهند. آنتوسیانین ها اغلب به فرم گلیکوزیدی در گیاهان یافت می شوند. در pH معمولی بافت های گیاهی این دسته از ترکیبات به شکل کاتیونی وجود دارند. تانن به ترکیباتی اطلاق می شود که عموماً سخت و گس و قابض اند و توانایی پیوستگی به پروتئین ها را دارند و سبب رسوب آنها می گردند و به لحاظ داشتن این خاصیت قرن هاست که جهت تبدیل پوست حیوانات چرم در(دباغی) مورد استفاده قرار می گیرند. (تانن ها با وزن مولکولی بسیار کم در مقایسه با ساپونین) به چند دسته کلی شامل تانن های هیدرولیز شونده، تانن های متراکم و تانن های کاذب تقسیم می شوند. تانن ها به ویژه از پوست درختان بلوط و ریشه ها و ریزوم برخی گیاهان تیره گل سرخان قابل استخراج است. نقش اصلی تانن ها در گیاهان به خوبی شناخته نشده است. ولی این مواد به طور کلی از فراورده های ثانویه بازمانده از چرخه های متابولیکی گیاهان محسوب می شوند. از خاصیت سختی و قابض بودن تانن ها می توان به عنوان ضد اسهال های

معمولی، اسهال های خونی مزمن، التیام زخم ها و عفونت های مربوط به گلو و نای (لوله های گوارشی و تنفسی) استفاده نمود (Bell, 1980). از آنجایی که تانن ها سبب رسوب پروتئین در غشاهای مخاطی می گردند، در نتیجه باکتری ها را از وجود مواد غذایی در غشاهای مذکور محروم می سازند، از این رو خاصیت ضد باکتریایی نیز دارند. اگرچه استفاده از تانن ها به همراه چای یا شیر بدون زیان شناخته شده است ولی باید از مصرف زیاد مواد تاننی اجتناب نمود، زیرا امروزه تانن به عنوان موادی سرطان زا نیز شناخته شده اند (امیدبیگی، ۱۳۷۴). ترپنوئید ها بزرگ ترین گروه متابولیت ثانویه را در گیاهان شامل می شوند. ترکیبات متنوع این گروه معمولا در آب غیر محلول هستند. ترپن ها از واحدهای ۵کربنی ایزوپرن مشتق می شوند (Sangwan, 2001). ترپن ها بر اساس تعداد واحدهای ۵ کربنه ای که دارند طبقه بندی می شوند از مشتقات مونوترپنی می توان لیمونن، لینالول و ژرانیول را نام برد (Taiz and Zeiger, 2006). بیوسنتز ترپن ها از استیل کوآنزیم A و از طریق مسیر موالونیک اسید صورت می گیرد. بیشتر ترپن ها اعمال مشخصی در رشد و نمو گیاه بر عهده دارند، به عنوان مثال پیش ماده آبسیزیک اسید یک سزکوئی ترپن است. استروئید ها نیز مشتقات تری ترپن ها بوده و از اجزای ضروری غشای پلاسمایی به حساب می آیند. برخی از گیاهان دارای مخلوطی از مونوترپن ها و سزکوئی ترپن های فرار می باشند که روغن های فرار یا اسانس نامیده می شوند (Sangwan and Farooqi, 2001). در ساختمان بسیاری از متابولیت های ثانویه ازت وجود دارد. ترکیباتی که در این گروه قرار دارند ترکیبات دفاعی ضد گیاهخواران هستند که آلکالوئید ها و گلیکوزید های سیانوژنی در این دسته از ترکیبات قرار می گیرند. امروزه این ترکیبات به علت دارا بودن خواص دارویی به شدت مورد توجه قرار گرفته اند. بیشتر متابولیت های ثانویه نیتروژن دار از آمینو اسید های مشترکی ساخته می شوند (Taiz and Zeiger E, 2006).

برای نخستین بار یک محقق آلمانی از آلکالوئیدها به عنوان مواد نیتروژنه که خاصیت قلیایی دارند و در محیط اسیدی تولید نمک می نمایند نام برده است. آلکالوئیدها در انسان واکنش های فیزیولوژیکی قوی همراه با اثرات مخصوص ایجاد می کند که بر روی سیستم عصبی اثر می گذارد. آلکالوئیدها بسیار متنوع می باشند، به طوری که تعداد آلکالوئیدهای شناخته شده موجود در گیاهان بالغ بر چند هزار مورد می توان نام برد. اولین آلکالوئیدها در بین سال های ۱۸۰۳ تا ۱۸۱۶ از پیکره گیاهان جدا گشت. در سال های اخیر نیز بعضی آلکالوئید های جدید مورد شناسایی قرار گرفتد. آلکالوئید ها یک گروه متنوع از ترکیبات نیتروژن دار با وزن ملکولی کم هستند و به طور تقریبی در ۲۰٪ از گیاهان آوندی نیز یافت می شوند (زرگری،۱۳۶۶). آلکالوئیدهای داری حلقه هتروسایکلیک به عنوان متابولیت ثانویه نقش دفاعی در حفاظت گیاه در برابر علف خواران و عوامل بیماری زا را بر عهده دارند. بیشتر آلکالوئیدها علاوه بر نقش زیستی، نقش دارویی، تحریک کننده و همچنین سمی نیز دارند بعضی از انواع، دارای اثرات بارز و شاخص دارویی و بسیار مفید هستند. در این مورد می توان کافئین، استریکنین، کینین، مرفین و امثال آن را نام برد. گلیکوزید ها نیز گروه بزرگی از مواد موثره ی دارویی ارزشمند را تشکیل می دهند که از میان آنها می توان به گلیکوزیدهای سیانوژنتیک، گلیکوزیدهای آنتراکینون، گلیکوزیدهای ساپونینی ، کومارینی و غیره اشاره کرد (Volak, 1997). بطور کلی ترکیبات فنلی ساختار متنوعی دارند. ترکیبات فنلی و فلاونوئید ها به صورت مقادیر بالا در بافت های گیاهان انباشته می شوند و به نظر می رسد نقش های مکمل زیادی در چرخه زندگی گیاهان داشته باشند که شامل نقش های ساختاری

در بافت های مختلف حفاظتی و پشتیبان، دخالت در استراتژی های دفاعی، جذب حشرات گرده افشان، آللوپاتی، حفاظت در برابر اشعه ی فرا بنفش و مولکول های علامت دهی در تعاملات بین گیاه و محیط پیرامون آن می باشد (Gould, 2004) اصولا فنل به ترکیباتی اطلاق می شود که دارای یک یا چند حلقه آروماتیک هستند که حداقل به یک گروه هیدروکسیل متصل است. ترکیبات فنلی را می توان به دو دسته فلاونوئید ها و ترکیبات فنلی غیر فلاونوئیدی طبقه بندی نمود.

فلاونوئید ها بطور گسترده در بسیاری از گیاهان یافت می شود و فعالیت بیولوژیکی متنوع این ترکیبات از جمله آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد التهابی گزارش شده است (Jamshid *et al*, 2010). بطور مثال عصاره نعناع ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بالایی دارد و فعالیت آنتی اکسیدانی خوبی را نشان می دهد (Swetie *et al*, 2007). تا به امروز بیش از ۶۰۰۰ فلاونوئید مختلف شناسایی شده است و این تعداد همچنان رو به افزایش است. فلاونوئیدها ترکیبات پلی فنلی و شامل ۱۵ کربن هستند. تغییرات در موقعیت حلقه C مرکزی ساختارهای متعددی از قبیل فلاونول ، فلاون، فلاونون، ایزوفلاونه و آنتوسیانیدین ها را ایجاد می کند. فلاونول ها گسترده ترین فلاونوئیدها در غذاهای گیاهی هستند و شامل کوئرسیتین، کامپفرول، میریستین و ... می باشند. یکی از متنوع ترین دسته های فلاونوئیدها آنتوسیانین ها هستند که در روبش رادیکالهای آزاد و گونه های فعال اکسیژن (ROS) نقش دارند (Harborne and Williams, 2000). در سال های اخیر، این ترکیبات تغذیه ای حفاظت کننده به یک مقوله ی مهم در تحقیقات تغذیه ای انسان تبدیل شده است و شواهد نشان میدهد که مصرف طولانی مدت این ترکیبات بطور بالقوه برای تبدیل متابولیسم بدن انسان و پیشگیری یا کاهش خطر ابتلا به بیماری های قلب و عروق، چاقی و سرطان شیوه ای مناسب است (Anderson, 1998). خواص دارویی این مواد هنوز به خوبی شناخته نشده است. فلاون ها و مشتقات آنها (فلاونوئیدها) موادی هستند که به صورت آزاد در بسیاری از گیاهان و یا به صورت ترکیب همراه با گلیکوزیدها وجود دارند (امیدبیگی، ۱۳۷۴). این مواد از نظر شیمیایی متعلق به فنل ها می باشند. از برخی ترکیبات متعلق به این گروه می توان از کومارین ها و آنتوسیانین ها را نام برد. ماده اخیر (آنتوسیانین) بانی رنگ آبی و قرمز تعدادی از گل ها می باشند. مهمترین مشتقات فلاون ها معمولا به رنگ زرد می باشند (ابراهیم پور و همکاران، ۱۳۸۸). فنولیک اسیدها بطور کلی به عنوان هیدروکسی بنزوات نیز شناخته می شوند و معمولا اجزای سازنده ترکیبات پیچیده ای مثل لیگنین و تانن های قابل هیدرولیز را تشکیل میدهند. این ترکیبات همچنین میتوانند بعنوان مشتقات قندی و اسیدهای آلی در گیاهان یافت شوند. ترکیباتی مانند وانیلیک اسید، گالیک اسید و سالیسیلیک اسید از مشتقات هیدروکسی بنزوئیک اسید می باشند (Amakura, 2000).

استیلن ها ساختاره C_2H_2 دارند و فیتو الکسین های تولید شده گیاهان در پاسخ به بیماری، زخم و تنش هستند. منبع غنی آن ترکیبی به نام Tesveatrol می باشد که در انگور قرمز و بادام زمینی وجود دارد (Burns and Mullen, 2002).

پی کوماریک، کافئیک و فرولیک اسید ها از ترکیبات رایج این دسته هستند که در میوه ها و سبزیجات یافت می شوند. میوه هایی از قبیل سیب و خرما منبع ترکیبات فنلی متنوع هستند ترکیبات فنلی غیرفلاونوئیدی بیشتر شامل C_1-C_6 فنولیک اسیدها، C_3-C_6 هیدروکسی سینامات ها و استیلن پلی فنل می باشد (Clifford, 2003).

ساپونین ها گلیگوزیدهایی با وزن مولکولی زیاد هستند، از مهمترین خواص فیزیکی این مواد این است که به صورت محلول در آب کف می کنند. از اینرو ساپونین ها خاصیت پاک کنندگی دارند (ساپونین از کلمه لاتین "ساپو" به معنای صابون گرفته شده است) با استفاده از این خاصیت ساپونین ها، مردم اروپا قرن ها از ریشه گیاه طبی صابونی برای شستشو استفاده میکرده .اند ساپونین ها وقتی وارد گردش خون می شوند سبب همولیز گلبول های قرمز خون می گردند، از این رو بهتر است مصرف آنها به عنوان یک ماده نسبتاً سمی تحت نظر قرار گیرد. البته خوردن این مواد نه تنها چندان زیان آور نیست، بلکه ملین و خلط آور نیز هست و حتی می توان از آنها به عنوان ماده ضد سرفه استفاده نمود. ساپونین ها به عنوان عامل یاری دهنده جذب روده ای سایر مواد دارویی به همراه آنها مورد استفاده قرار می گیرند. ساپونین های استروئیدی که در برخی از گیاهان تیره سوسن، آماریلیس و تیره های دیگر وجود دارد نقش عمدهای را در صنایع جدید دارویی مخصوصاً در ارتباط با ساخت و عرضه گلیکوزیدهای قلبی موجود در برخی گیاهان ایفا می نماید (امیدبیگی، ۱۳۷۴). گلیکوزیدها همچون آلکالوئیدها گروه بزرگی از مواد مؤثره دارویی ارزشمند را تشکیل می دهند که در عین حال در میان آنها برخی از خطرناک ترین و سمی ترین مواد موجود در طبیعت یافت می گردد. این مواد در گروه زیادی از مواد گلدار وجود دارند. گلیکوزیدها در مسیرهای مختلف متابولیکی به شکل های گوناگونی ساخته میشوند. این مواد دارای ساختمان شیمیایی پیچیده و مخصوصی هستند و در بدن انسان اثرات خاصی نیز بر جای می گذارند. گلیکوزیدها پس از هیدرولیز (توسط اسیدها، برخی آنزیم ها و غیره) به ترکیبات قندی (گلی-کن) و غیر قندی (آگلی-کن) تبدیل می شوند که در میان آنها آگلی-کن ها، مصارف فراوانی در داروسازی دارند (Bell, 1980). اسید رزمارینیک در سرتاسر گیاهان *Boraginaceae* و زیرخانواده *Nepetoideae*، نعناعیان و در سرخس خانواده *(Blechaceaea)* توزیع یافته اند. برای سنتز شیمیایی رزمارینیک اسید مدت های طولانی تلاش شد و سرانجام در سال (۱۹۹۱) توسط آلبرچت به دست آمد. آنزیم های دخیل در بیوسنتز اسید رزمارینیک از پیش سازهای اسید آمینه آن در کشت سوسپانسیون گیاهان *Anchusa officinalis* و *Coleus blumei* از خانواده نعناییان (*Lamiaceae*) مشخص شدند. بیوسنتز اسید رزمارینیک در گیاهان مختلف، تقریبا مشابه یکدیگر می باشد. ۴-کوماریول ۴-هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید ماده حد واسط عمومی مسیر بیو سنتز اسید رزمارینیک است به نحوی که تیروزین نیز توسط واکنش های متفاوتی با این ترکیب تبدیل می شود .پیشروی این واکنش های شیمیایی توسط فعالیت دو آنزیم دیگر در نهایت موجب تولید ترکیب دارویی اسید رزمارینیک خواهد شد (Arranz and Jaime, 2015). اسید رزمارینیک دارای خواص دارویی آنتی اکسیدان، ضدالتهاب، ضد حساسیت و ضد بیماری های باکتریایی و ویروسی است و استفاده از آن در جلوگیری از پیشروی سرطان و درمان آن موثر بوده است (Bakirel, 2008).

اسانس ها از نظر ترکیب شیمیایی همگن نیستند بلکه به صورت ترکیبات مختلفی مشاهده می شوند. ولی به طور کلی از گروه شیمیایی موسوم به ترپن ها هستند و یا منشاء ترپنی دارند. این ترکیبات معمولاً از بو و مزه تندی برخوردارند و وزن مخصوص آنها غالباً از آب کمتر است به ندرت برخی از آنها وزن مخصوص بیشتر از آب دارند (Bell, 1980). این مواد به روغن های فرار نیز معروف می باشند. اسانس ها در سلول ها و کرک های ترشحی منفرد یا مجتمع، غده های ترشحی، مجاری ترشحی در قسمت های سطحی و درونی، اندام های مختلف مانند برگ ها، میوه ها، جوانه ها و شاخه های گیاهان وجود دارند. سلول ها و بافت های ترشحی مذکور ممکن است تنها در یک اندام گیاه وجود داشته باشند، یا ممکن است در اندام های مختلف گیاهان پراکنده باشند. در این صورت اسانس های حاصله از کمیت و کیفیت و همچنین اجزاء و عناصر تشکیل دهنده از اندامی به اندام دیگر تفاوت دارند (Amakura, 2000).

موسیلاژها، کربوهیدرات هایی با ساختمان شیمیایی بسیار پیچیده و با وزن مولکولی زیاد هستند. این مواد در الکل ها غیر محلول می باشند. موسیلاژها در آب حل می شوند و پس از جذب آب متورم و حجیم می گردند. از گیاهانی که حاوی ترکیبات موسیلاژی می باشند و در صنایع دارویی از اهمیت خاصی برخوردار هستند می توان، از *Althea*، *Cinum*، *Cetraria* و غیره نام برد از مهمترین خواص دارویی موسیلاژها، خاصیت ضد سوزش آنهاست به طوری که موسیلاژها لایه محافظ ظریفی بر روی غشاء مخاطی معده تولید می کنند و مانع اثر عوامل سوزش آور بر سطح مذکور می شود، از این رو این مواد برای مداوای زخم های موجود در دستگاه گوارش (روده و معده) و عفونت های مخاط حلق و گلو مورد استفاده قرار می گیرند. از خاصیت جذب آب موسیلاژها برای کاهش آب موجود در لوله گوارش در (اسهال های مزمن و به عنوان قابض) استفاده می کنند. همچنین از موسیلاژها میتوان در مواضع بیرونی و برای مداوای برخی بیماری های پوستی استفاده نمود. اهمیت ویتامین ها برای ادامه حیات بر کسی پوشیده نیست و فعالیت های متابولیکی بدون وجود ویتامین ها امکان پذیر نخواهد بود. ویتامین ها از محیط خارج بدن تأمین می شوند و در عادت های غذایی روزانه باید همواره مقادیر متناسبی از ویتامین ها وجود داشته باشد. در میان گیاهان دارویی، گیاهان کمی یافت می شوند که به مقدار کافی حاوی انواع ویتامین های مورد نیاز بدن انسان باشند (ساقه و برگ جعفری، میوه نسترن، میوه سنجد تلخ و غیره). ویتامین ها تحت تأثیرحرارت های بالا تجزیه می شوند و خاصیت خود را از دست می دهند. از این رو بهترین روش برای استخراج ویتامین ها گرفتن عصاره از اندام تازه گیاهان مورد نظر می باشد (امیدبیگی، ۱۳۷۴).

نام متابولیت های ثانویه در برخی از گونه ها و خانواده های خاص، از گیاهان غیردارویی متمایز شده اند. متابولیت های ثانویه معمولاً براساس منشأ زیست شناختی به سه گروه مهم شامل ترپن ها، فنول ها و ترکیبات نیتروژن دار تقسیم می شوند ترپن ها یا ترپنوئیدها بزرگترین گروه متابولیت های ثانویه به شمار می روند که عموماً غیرقابل حل در آب هستند. نکته مشترک موجود در ساختار کلیه ترپن ها وجود واحدهای پنج کربنی مشابه در تمام آنهاست که به واحدهای ایزوپرن مشهورند تولید متابولیت های ثانویه مانند کاروتنوئیدها، آنتوسیانین ها، آلکالوئیدها و فنل ها از جمله سازوکارهای دفاعی گیاهان در برابر پرتو

فرابنفش می باشد. برخی از این ترکیبات علاوه بر ویژگی های دفاعی برای گیاه، دارای خواص دارویی برای انسان و دام نیز می باشند (Nasibi &Manouchehri Kalantari, 2006). گیاهان برای مقابله با تنش ها از سازوکارهای مختلفی مانند افزایش متابولیت های ثانویه شامل فلاونوئید و آنتوسیانین استفاده می کنند این ترکیبات نقش آنتی اکسیدانی دارند و جارو کننده گونه های فعال اکسیژن هستند. افزایش این ترکیبات در تیمار با اسید سالیسیلیک در بررسی های دیگر پژوهشگران نیز گزارش شده است (Balibrea *et al*, 2011; Ram *et al*, 2013).

نتیجه گیری:

علاوه بر این آلکالوئیدهایی همچون (مورفین) کشنده درد، (کدئین) ضد سرفه، (پاپاورین) مهارکننده فسفودی استراز، (افدرین) تحریک کننده، (کوئینین) ترکیب ضد مالاریا، (رسپرین) کنترل کننده فشارخون، (گالانتامین) مهار کننده استیل مولین استراز، (اسکوپولامین) ضد تهوع، (بربرین) برای درمان پسوریازیس، (کاپساسین) برای درمان دردهای روماتیک، (کلشی سین) برای درمان نقرس و بسیاری از ترکیبات دیگر از جمله متابولیت های ثانویه ای هستند که به عنوان دارو مورد استفاده قرار می گیرند. امروزه با وجود تکنیک های بیوتکنولوژی مانند کشت سلول، اندام و بافت گیاه، این امکان وجود دارد که بتوانیم ترکیبات مفید و مورد نیاز را در گیاهان تولید نماییم. محققین با استفاده از این روش ها سعی می کنند تاتولید متابولیت های ثانویه را در گیاهان افزایش دهند (Dixin and Sumner, 2003).

از دست دادن حافظه معمولاً اولین علامتی است که در بیماری آلزایمر رخ می دهد. با این حال، حافظه راه دور بهتر از حافظه های کوتاه مدت عمل می کند (The American Alzheimer Association, 1999-2002). تخمین زده می شود که تقریباً ۴۴ میلیون نفر در سراسر جهان به بیماری آلزایمر یا نوعی زوال عقل مرتبط هستند. تخمین زده می شود که این تعداد تا سال ۲۰۵۰ به ۱۳۰ میلیون افزایش یابد (Prince MJ *et al.*, 2015). بیماری آلزایمر هم توسط طب مدرن و هم سنتی قابل پیشگیری و تا حدی قابل کنترل است. برخی داروها بر یک انتقال دهنده عصبی یا دسته ای از انتقال دهنده های عصبی مانند سلژیلین و ریواستیگ ماین و همچنین آنتی اکسیدان هایی مانند ویتامین E تأثیر می گذارند. طب سنتی و گیاهی نیز نشان داده اند که علائم بیماری آلزایمر را کاهش می دهند. برخی از مهم ترین گیاهان دارویی و متابولیت های ثانویه دارویی مورد بحث قرارگرفت.گیاهان دارویی مانند Petroselinum crispum ، Thymus vulgaris، Hypericum perforatum، Matricaria chamomilla، Salvia officinalis، Allium sativum، Ziziphus، Lavandula officinalis، Curcuma longa، Salvia Rosmarinus، Cyperus rotundus از جمله میریستسین، لیمونن، اوژنول و آلفا توژن. بازی می کند نقش مهمی در درمان بیماران مبتلا به بیماری آلزایمر با جلوگیری از آسیب عصبی به مغز دارد، در آینده می توان آنها را به عنوان داروهای طبیعی موثر ضد آلزایمر استفاده کرد (Douglas S. A. Chaves, 2011).

زردچوبه (حاوی ترکیب کورکومین) با تشدید فعالیت مونوسیت ها و ماکروفاژها بر آمیلوئیدوژنز بتا بیماران آلزایمر تأثیر مثبت می گذارد (Yang F, Lim GP, 2005). اسانس آویشن حاوی فنل هایی مانند تیمول، کارواکرول، دارچین، لینول و پینن است. مهار آنزیم استیل کولین استراز توسط ترکیبات این گیاه می تواند از کاهش استیل کولین در بیماری آلزایمر جلوگیری کند (Asadzadeh and Heidarian Naeini, 2020).

Hypericum perforatum حاوی ترکیبات هایپریسین، هیپرفورین و پسودوهیپریسین است و در پیشگیری و درمان بیماری آلزایمر موثر بوده است (Zheng *et al.*, 2017). عصاره اتانولی بابونه با اثرات ترمیمی بر سیستم عصبی ممکن است در بیماران مبتلا به آلزایمر و اختلالات رفتاری مفید باشد و تقویت حافظه توسط عصاره را به اثرات آنتی اکسیدانی ترکیبات فعال آن نسبت می دهند (Alibabaei *et al.*, 2014). اثربخشی عصاره مریم گلی در درمان بیماری آلزایمر خفیف تا متوسط مشخص شده است (Akhondzadeh *et al.*, 2003). ترکیب اصلی سیر، آلیسین است. مصرف سیر ممکن است تجمع (Aβ) را در مغز انسان مهار کند و در نتیجه از مغز محافظت کند و اثر ضد آلزایمری ایجاد کند (Gupta,2008). رزماری گیاهی است حاوی ترکیبات ۱ و ۸ سینئول، آلفا پینن و کامفن است. اثر محافظت کننده رزماری با مکانیسم هایی از جمله پیشگیری از التهاب مغز و تشکیل سمیت βآمیلوئید (Aβ) در بیماری آلزایمر نقش دارد (Habtemariam, 2016).

Cyperus rotundus حاوی ترکیبات سینئول و ایزولوسین است و با اثرآنتی استیل کولین استراز باعث بهبود حافظه و یادگیری در این بیماری می شود (Rabiei *et al.*, 2013).

منابع

-ابراهیم پور، فرشاد، عبدی زاده، خالد (۱۳۸۸). گیاهان دارویی، انتشارات پیام نور. ص ۶۰

-امیدبیگی، رضا (۱۳۷۴)، رهیافت های تولید و فرآوری گیاهان دارویی، انتشارات فکر روز، جلد اول صفحه ۳۱ و ۱۶۶.

-قوام منصوره ۱۳۹۵. بررسی چگونگی ارزیابی گیاهان دارویی از نظر وجود و میزان مواد مؤثره.نخستین همایش بین المللی گیاهان دارویی معطر و ادویه ای.دانشگاه گنبد کاووس

-قاضیان تفریشی، عزیزی. ۱۳۸۵ . بررسی نحوه تولید و خواص متابولیتهای ثانویه گیاهی. ماهنامه تخصصی کشاورزی زیتون، شماره ۱۷۰. صفحه ۳۸ تا ۴۳.

-زرگری، علی (۱۳۶۶) گیاهان داروئی، دانشگاه تهران، بی تا.

-Alibabaei., Z., Rabiei., Z., Rahnama., S., Mokhtari., S. (2014). Mahmoud Rafieian-kopaei. Matricaria Chamomilla extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine. Biomed Aging Pathol. 4(4): 355-360.

-Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., Tonagai, Y., (2000) . High performance liquid chromatographic determination with photo diode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. Journal of Chromatogr A. 896-87-93.

-Arranz, E., Jaime, L., García-Risco, M.R., Fornari, T., Reglero, G. and Santoyo, S. (2015). Anti-inflammatory activity of rosemary extracts obtained by supercritical carbon dioxide enriched in carnosic acid and carnosol. Int. J. Food Sci. Technol. 50: 674‑681.

-Anderson, D., Dobrzynska, M. M., Basaran, N., Basaran, A. & Yu, T.W., (1998). Flavonoids modulate comet assay responses to food mutagens in human lymphocytes and sperm. Mutation Research, Vol. 402, No. 1-2, pp. 269-77, ISSN 0027-5107.

-Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., Tonagai, Y., (2000). High performance liquid chromatographic determination with photo diode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. Journal of Chromatogr A.

-Agronin ME. Practical Guide in Psychiatry. 1st ed. Philadelphia: Lippincott Co. (2004). 72-280.

-American Alzheimer Association [homepage on the internet]. (1999-2002). California: The American Alzheimer Association. [updated2003May22; cited2004 Apr20].

-Asadzadeh, A., and Heidarian Naeini, F., (2020). The Effect of Thyme in the Suppression of Acetylcholinesterase for the Treatment of Alzheimer's Disease, 19th Annual Research Congress of Medical Students, Hamadan, Student Research Committee of Hamadan University of Medical Sciences.

-Akhondzadeh, S., Noroozian, M., Mohammadi, S., Ohadinia, A. H., Jamshidi, M., (2003).Salvia officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. J Clin Phar Therap. https://doi.org/10.1046/j.1365-2710.2003.00463.x.

-Bourgaud, F., Gravot, A., Goniter, E. (2002). Production of plant secondary metabolites. Plant science.161: 839-851.

-Bakirel, T., Bakirel, U., Keleş, O.U.,Ülgen, S.G. and Yardibi, H. (2008). In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus officinalis) in alloxan-diabetic rabbits. Journal of Ethnopharmacology. 116(1): 64-73.

-Bell, E.A., and Charlwood, B.V., (1980). Secondary plant product. Berlin, Springer. Pp: 674.

-Burns ,J., Mullen, W., Landrault, N., Teissedre, P.L., Lean, M.E.J., Crozier, A., (2002).Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from Cabernet. Sauvignon and hybrid grapes. J Agric Food Chemistry .50:4096–4102.

-Ncube, B.,Van Staden, J., (2015). Tilting plant metabolism for improved metabolite biosynthesis and enhanced human benefit, Molecules 20:12698-12731.

-Castilho, P., Liu, K., Rodrigues, A., Feio, S., Tomi, F. & Casanova, J. (2006). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Clinopodium ascendens (Jordan) Sampaio from Madeira. Flavour and Fragrance Journal, 22, 139-144.

-Chebet, D.K., Okeno, J.A., Mathenge, P., (2003). Biotechnological approaches to improve horticultural crop production in Kenya. Acta Hortic. 7:625:473.

-Clifford, M. N., (2003). The analysis and characterization of chlorogenic acids and other cinnamates. in Methods in polyphenol analysis, eds. Santos-Buelga, C., Williamson, G., The Royal. Society of Chemistry, Cambridge, UK. 314–337.

-Dixon, R.A., & Sumner, L.W. (2003). Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. Plant Physiology, 131(3), 878-885.

-Daryani, P., Zare, N., Chamani. E., Sheikhzadeh Mossadeg, P. & Javadi mojaddad, D. (2016). Eevaluation of the effects of different basal medium and plant growth regulators on in vitro growth of hazelnut. Journal of Horticultural Science. 30, 417-422.

-Douglas S. A. Chaves, Flavia S. Frattani, Mariane Assafim, Ana Paula de Almeida, Russolina B. Zingali, Sonia S. Costa. (2011). Phenolic Chemical Composition of Petroselinum Crispum Extract and Its Effect on Haemostasis. Natural Product Communications. https://doi.org/10.1177/1934578X1100600709.

- Guerriero, G., Berni, R., Muñoz-Sanchez, J.A., Apone, F., Abdel-Salam, E.M., Qahtan, A.A., Alatar, A.A., Cantini, C., Cai, G., Hausman, J.F., Siddiqui, K.S., Hernández-Sotomayor, S.M.T., Faisal, M., (2018). Production of plant secondary metabolites: examples, tips and suggestions for biotechnologists, Genes (Basel) 9(6).

-Sandra, G., Anabela, R., (2018). Production of plant secondary metabolites by using biotechnological tools, secondary metabolites - Sources and applications, in: R. Vijayakumar (Ed.), Secondary Metabolites Sources and Applications. Intech Open.

-Gould, K. (2004). Nature's Swiss army knife: The diverse protective roles of anthocyanins. In leaves. Journal of Biomedicine and Biotechnology 5:314-320.

-Harborne, J.B., Williams CA., (2000).Advances in flavonoid research since 1992. Elsevier Science Ltd .Nov;55(6):481-504. 896:87–93.

-Jamshidi, M., Ahmadi-Ashtiani, H., Rezazadeh, S., Fathiazad, F., Mazandarani, M. and Khaki, A. (2010). Study on phenolics and antioxidant activity of some selected plant of mazandaran province. Journal of Medicinal Plants, 2(34): 177-182.

-Winter, J.M., Tang, Y. (2012). Synthetic biological approaches to natural product biosynthesis, Curr. Opin. Biotechnol. 23:736-743.

-Kumar Gupta, A., and Neelam, M. (2006). Hepatoprotective activity of aqueous ethanolic extract of chamomile capitula in paracetamol intoxicated albino rats. American Journal of Pharmacology and Toxicology, 1(1): 17-20.

-Kwon, H.Y., Jung, I.H., Yi, J.H., Kim, J.H., Park, J.H., Lee, S.H., Jung, J.W., Lee, Y.C., Ryu, J.H., Kim, D.H. (2017). The Seed of Zizyphus jujuba var. spinosa Attenuates Alzheimer's Disease-Associated Hippocampal Synaptic Deficits through BDNF/TrkB Signaling. Biolog Pharmaceutical Bulletin. 40(12): 2096-2104.

-Mulabagal, V. & Tsay, H.S. (2004). Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Int J Appl Sci Eng, 2(1), 29-48.

-Mozafarian, V. (2015). Trees and shrubs of Iran. Vaziri Publication, 1050 p.Pérez-Balibrea, S., Moreno, D.A., & García-Viguera, C. (2011). Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. Food Chemistry, 129(1), 35-44.

-Nasibi, F. & Manouchehri Kalantari, Kh. (2006). Application of various UV bands to increase the amount of some secondary compounds in two species of Hyoscyamus. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research Quarterly. 2:140-145.

-Oksman-Caldentey, K.M. & Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. Trends in plant science, 9(9): 433-440.

-Pozo, J.C., Lopez-Matas, M.A., Ramirez-Parra, E., Gutierrez ,C. (2005). Hormonal control of the plant cell cycle. Physiolgy Plant .123:173-183.

-Prince, M.J., (2015). World alzheimer report. the global impact of dementia: an analysis of prevalence, incidence, cost and trends. London: Alzheimer's Dis Inter.

-Rafiq, M., Dahot, M.U., Mangrio, S.M., Naqvi, H.A. & Qarshi, I.A. (2007). In vitro clonal propagation and biochemical analysis of field established Stevia rebaudiana Bertoni. Pak. J. Bot, 39(7): 2467-2474.

-Rao, S. R. & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology advances, 20(2), 101-153.

-Ram, M., Prasad, K. V., Singh, S. K., Hada, B. S., & Kumar, S. (2013). Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of Rosa hybrida L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 113(3), 459-467.

-Rabiei, Z., Hojjati, M., Rafieian-Kopaei, M., Alibabaei, Z. (2013). Effects of Cyperus rotundus tuber ethanolic extract of learning and memory in animal model of Alzheimer. Biomed Aging Pathol. (4):185-91.

-Ramachandra, S. & Ravishankar, G.A. (2002). Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20:101-153.

-Solomon Habtemariam. (2016). The Therapeutic Potential of Rosemary (Rosmarinus officinalis) Diterpenes for Alzheimer's Disease. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. https://doi.org/10.1155/2016/2680409.

-Sangwan, N.S., Farooqi, A.H.A., Shabih, F., Sangwan, R.S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. Plant Growth Regulation 34:03-21.

-Swetie, R., Raesh, C.H. and Arun, S. (2007). Antioxidant potential of mt (Mentha spicata L.) in radiation processed lamb meat. Food Chemistry. 100(2):451-458.

-Taiz, L., Zeiger, E. (2006). Plant Physiology, 4th Edition. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts, USA. 260-287.

-Tolonen, A. (2003). Analysis of Secondary Metabolites in Plant and Cell Culture Tissue of Hypericum Perforatum L. and Rhodiola Rosea L. Oulun yliopisto

-Volak., J. and Jiri, S. (1997). Plants Medicinales Interpreter, 3rd Edn., Tehran University Publications, Tehran, pp:20.

-Veer Bala Gupta, S. S. Indi, Rao., K. S. J. (2008). Garlic extract exhibits antiamyloidogenic activity on amyloid-beta fibrillogenesis: relevance to Alzheimer's disease. Phytothe Res. https://doi.org/10.1002/ptr.2574.

- Yue, W., Ming, Q.L., Lin., B., Rahman,, K., Zheng., C.J., Han., T. Qin, L.P. (2016). Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites, Crit. Rev. Biotechnol. 36: 215–232.

-Yang, F., Lim, G.P., Begum, A.M., Ubeda, O.J., Simmons, M.R., Ambegaokar, S.S., et al. (2005). Curcumin inhibits formation of Beta amyloid oligomers, binds plaques and reduce amyloid in vivo. J Biol Chem. 280(7): 5892-5901.

-Zheng, Cao., Fan. Wang., Chunyu, Xiu., Jian., hang., Yan, feiL. (2017). Hypericum perforatum extract attenuates behavioral, biochemical, and neurochemical abnormalities in Aluminum chloride-induced Alzheimer's disease rats. Biomed Pharmacoth. 91: 931-937.

The importance of plant secondary metabolites produced in plant tissue culture in the prevention of Alzheimer's disease

Esmail Purmohamad[1*], Akbar Norsteh Nia, Fatemeh Jamal Omidi

Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Guilan University, Rasht

Abstract

Today, the importance and bold role of health-oriented medicinal plants in preventing, treating and eliminating diseases has been well explained to everyone. We have inherited the application and use of health-oriented plant secondary metabolites from our ancestors and with the development of technologies, the prosperity of knowledge-based companies and investment in the field based on these plants, the scope of therapeutic and preventive use of medicinal plants in life and We have increased the community. Polyphenols are natural compound micronutrients that protect plants from damage and have strong antioxidant properties with potential health benefits for humans as well. Polyphenols are known for their role in protecting the body from oxidative stress caused by environmental stressors such as pollution and fried foods that cause free radicals in our body. Antioxidants can neutralize these harmful free radicals and prevent them from damaging our cells. Alzheimer's disease is a progressive form of dementia that causes problems with memory, thinking, and behavior. This disease is associated with profound effects on intelligence, self-care, speech and functional impairment, motor and cognitive dysfunction. Medicinal plants can be used with different mechanisms in the treatment and prevention of Alzheimer's and in the future they can be used as effective natural anti-Alzheimer's drugs.

Keywords: plant metabolites, Alzheimer's, polyphenol, secondary metabolite

* email: Esmailpurmohamad@gmail.com