ارزیابی عملکرد حلال‌های قطبی و غیر قطبی بر خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه هلپه (*Teucrium polium* L.)

احمد اصغرزاده*[۱]، سیده فائزه تقی زاده[۲]، جواد اصیلی[۳]
[۱*] گروه علوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی، شیروان
[۲] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد
[۳] گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد
*نویسنده مسئول: asg.ahmad@yahoo.com

چکیده

در این پژوهش به بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی سرشاخه‌های گیاه هلپه *Teucrium polium* L. با استفاده از حلال‌های مختلف پرداخته شد. حلال‌ها به‌گونه‌ای انتخاب شدند که ویژگی‌های قطبی و غیر قطبی آن‌ها مدنظر قرار گرفتند. بدین منظور با استفاده از حلال‌های آب (خیلی قطبی)، متانول (قطبی)، اتیل استات (نسبتاً قطبی) و هگزان (غیر قطبی)، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. در بررسی به‌عمل‌آمده، اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد میان عصاره‌های مختلف مشاهده شد. نتایج حاصل از میزان مهار رادیکال‌های آزاد در عصاره‌ها مختلف نشان داد که متانول از قابلیت بیشتری برخوردار بوده است و پس از آن به ترتیب آب، اتیل استات و هگزان قرار داشتند. در مقایسه میان شاخص IC50 (۵۰ درصد قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد) عصاره‌های مختلف و استانداردهای vit C و BHT (۲۷/۲۴ و ۲۹/۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نیز کمترین IC50 مربوط به متانول (۳۵/۹۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و بیشترین آن در عصاره هگزانی (۹۷/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) محاسبه شد.

***کلمات کلیدی:* اتیل استات، رادیکال آزاد، متانول، مهار کنندگی، هگزان**

مقدمه

گیاه هلپه با نام علمی *Teucrium polium* L. که در طب سنتی ایران کلپوره نیز نامیده می‌شود گیاهی است علفی، پایا که معمولاً در نواحی بایر، سواحل سنگلاخی و ماسه‌زارها می‌روید. در ایران این گیاه در نواحی مختلف شمال، مغرب، جنوب و مرکز ایران، منطقه البرز، اطراف تهران خصوصاً در نواحی نیمه بایر و کوهستان‌های نیمه‌خشک پراکندگی وسیعی دارد و در نواحی کوهستانی البرز تا ارتفاعات ۱۵۰۰ متر دیده می‌شود (Mahmoudi and Nosratpour, 2013). این جنس غنی از مونوترپن‌ها، سسکوئیترپن‌ها، آلکالوئیدها، ساپونین، ترکیبات پلی‌فنولی، اسیدهای چرب، استرول و روغن‌های اسانسی، گلیکوزیدهای فنیل پروپانوئیدی، گلیکوزیدهای ایریدوئید، فلاونوئیدها، تانن‌ها، آلفا و بتاپنین، لوکوآنتوسیانین و اسانس‌های فرار هستند که بیش‌ترین مواد این اسانس ژرمارکرین، بتاکاریوفیلن، هرمون و کاریوفیلین اکساید است. این جنس غنی از دی‌ترپن‌ها با اسکلت دی‌ترپن‌های نوکلرودان است (الماسری و همکاران، ۲۰۱۴). ترکیبات منحصربه‌فرد عصاره هلپه شامل آپیژنین، روتین، دی متوکسی آپی ژنین، ورباسکوزید، پلپوموزید می‌باشند (De Marino *et al.*, 2012). یافتن آنتی‌اکسیدان‌ها از منابع طبیعی به‌ویژه گیاهان و استفاده از آن‌ها بسیار مطلوب است (Milos *et al.*, 2000). در بین ترکیبات آنتی‌اکسیدان، فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی و به‌طورکلی پلی‌فنول‌ها که دارای پراکندگی وسیع در طبیعت هستند، بسیار مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Liu *et al.*, 2008). این ترکیبات دارای خصوصیات فارماکولوژیک وسیعی می‌باشند. استفاده از روش‌های مختلف برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضروری است زیرا خصوصیات انحلالی ترکیبات و حلال‌ها در روش‌های مختلف متفاوت است. در

این تحقیق از چهار حلال آب (خیلی قطبی)، متانول (قطبی)، اتیل استات (نسبتاً قطبی) و هگزان (غیر قطبی) در بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه هلپه استفاده شد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی گیاه و عصاره گیری

سرشاخه‌های گیاه هلپه اوایل تابستان سال ۱۳۹۵ توسط هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد شناسایی شد و در سایه و در دمای اتاق خشک گردید و سپس توسط خردکن کاملاً به‌صورت پودر در آمدند. عصاره گیری با هر یک از حلال‌های آب (خیلی قطبی)، متانول (قطبی)، اتیل استات (نسبتاً قطبی) و هگزان (غیر قطبی) در ۳ مرحله صورت گرفت. مرحله حذف حلال با استفاده از دستگاه روتاری و فریز دراییینگ انجام شد.

تعیین فعالیت روبشگری رادیکال DPPH

این روش توانایی هیدروژن دهندگی (الکترون‌دهندگی) را اندازه‌گیری می‌کند. بنابراین میزان فعالیت روبشگری رادیکال آزاد توسط آنتی‌اکسیدان را نشان می‌دهد (Kirby and Schmidt, 1997). ابتدا برای تهیه محلول‌های مختلف نمونه (۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره‌ها در متانول حل شدند. ۲ میلی‌لیتر از محلول نمونه با ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH (۰/۲ میلی‌مولار) مخلوط شد و پس از تکان دادن در دمای اتاق و تاریکی ۳۰ دقیقه نگهداری و جذب آن‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Saha *et al.*, 2004). متانول برای صفر کردن دستگاه استفاده شد (kulisic *et al.*, 2004). درصد رنگ بری محلول DPPH طبق معادله محاسبه می‌شود.

$$\text{٪مهار} = (B_0 - B_1/B_0)\times ۱۰۰$$

B_0 = جذب محلول کنترل منفی، B_1 = جذب مخلوط واکنش

در این آزمایش از ویتامین C و BHT به‌عنوان استاندارد استفاده شد. آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام گرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD ($p < 0.05$) صورت گرفت.

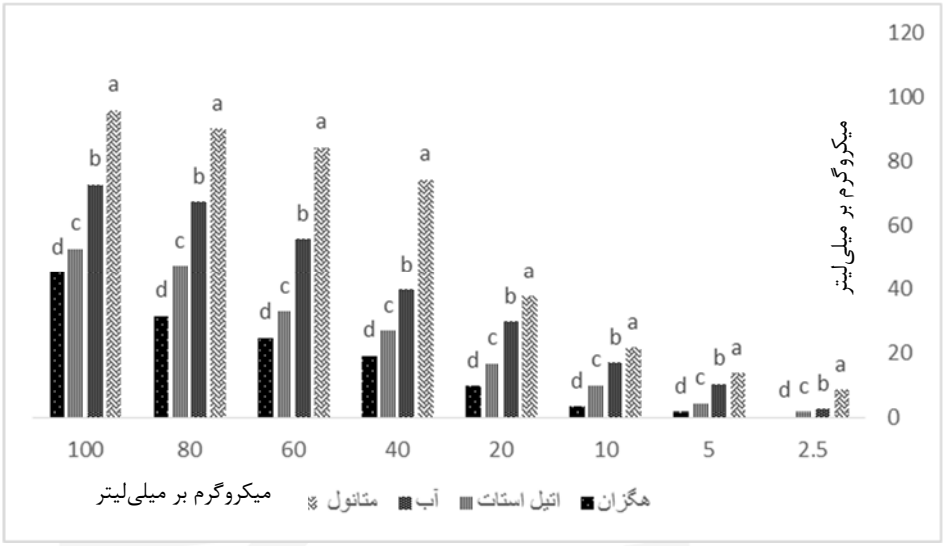
نتایج و بحث

نتایج اثرات آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی، متانولی اتیل استاتی و هگزانی، سرشاخه‌های گیاه هلپه نشان داد که میان حلال‌های مختلف تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد. نتایج حاصل از بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی استانداردهای BHT و ویتامین C در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- درصد مهار محلول DPPH برای ویتامین C و BHT به روش DPPH

غلظت‌های مختلف (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۲/۵	۵	۱۰	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰
Vit C	۲۰/۳۳	۲۶/۲۷	۳۳/۱۲	۴۰/۷	۸۱/۰۳	۹۰/۹۹	۹۴/۱۶	۹۹/۱۷
BHT	۱۷/۱۲	۲۵/۸۹	۳۰/۹۹	۳۷/۶۵	۷۸/۷۱	۸۸/۴۲	۹۲/۳۸	۹۸/۵۶

نتایج حاصل از مقایسه درصد مهار محلول DPPH برای عصاره‌های مختلف، نشان داد که در تمامی غلظت‌های حاصل، عصاره متانولی دارای بیشترین بازده عملکرد از نظر مهار رادیکال‌های آزاد را داشته است. بعد از آن حلال آب و به ترتیب اتیل استات و هگزان بالاترین درصد فعالیت روبشگری رادیکال‌های آزاد را به خود اختصاص دادند (شکل ۱).



شکل ۱- در صد مهار محلول DPPH برای عصاره‌های آبی، متانولی، اتیل استاتی و هگزانی گیاه هلپه

جهت مقایسه اثرات آنتی‌اکسیدان عصاره‌های مذکور گیاه *Teucrium polium* L. در روش DPPH از پارامتر دیگری به نام IC_{50} استفاده شد. IC_{50} عصاره، غلظتی از عصاره می‌باشد که باعث ۵۰٪ مهار رادیکال‌های آزاد می‌شود. در جدول ۲ نتایج حاصل از محاسبه IC_{50} عصاره‌های مختلف، ویتامین C و BHT در روش DPPH آمده است.

جدول۲- نتایج حاصل از محاسبه IC_{50} استانداردها و عصاره‌های مختلف گیاه هلپه

نمونه مورد بررسی	IC_{50} (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
ویتامین C	۲۷/۲۴
BHT	۲۹/۶۷
عصاره آبی	۵۸/۱۳
عصاره متانولی	۳۵/۹۹
عصاره اتیل استاتی	۸۹/۷۸
عصاره هگزانی	۹۷/۱۲

با توجه به این‌که بالا بودن مقادیر IC_{50} نشان دهنده حداقل میزان اثرات آنتی‌اکسیدانی است و طبق داده‌های جدول ۲ و در مقایسه با استانداردها، کمترین مقدار IC_{50} در عصاره متانولی و پس از آن به ترتیب در عصاره‌های آبی، اتیل استات و هگزان محاسبه گردید. متانول قادر به استخراج تعداد زیادی ترکیبات قطبی و نسبتاً قطبی مانند آلکالوئیدها، استرول‌ها، تری‌ترپن‌ها، کربوهیدرات‌ها، کومارین‌ها، آنتوسیانین‌ها، ترپنوئیدها، ساپونین‌ها، تانن‌ها، لاکتون‌ها، فلاون‌ها و پلی‌فنول‌ها است (Leite *et al.*, 2006). حلال هگزان بیشتر برای استخراج ترکیبات اسانس و کومارین‌های غیر قطبی مؤثر واقع می‌شود و به مقدار کم می‌تواند ترکیبات فنلی را استخراج نماید (Dorman *et al.*, 2003). اتیل استات در استخراج ترکیبات فنلی بسیار کارآمد است (Jayaprakasha, 2003). ازاین‌رو به نظر می‌رسد که بیشتر ترکیبات مؤثر در بروز اثرات آنتی‌اکسیدانی در سرشاخه‌های گیاه هلپه از دسته‌ی آلکالوئیدها و ترپن‌ها باشند.

منابع

De Marino, S., Festa, C., Zollo, F., Incollingo, F., Raimo, G., Evangelista, G. and Iorizzi, M. 2012. Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from Teucrium polium L. Food Chemistry; 133: 21-28.

Dorman, H., Peltoketo, A., Hiltunen, R. and Tikkanen, M. 2003. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. Food Chemistry; 83(2): 255-262.

Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V. and Milos, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food Chemistry; 85: 633-640.

Jayaprakasha, G.K. 2003. Antibacterial and antioxidant activities of grape (Vitis vinifer) seed extracts. Food Research International; 117-122.

Leite, S.P., Raphael, J., Vieira, C., Medeiros, P.L., R.M.P., Menezes Lima, V.L., Xavier, H.S. and Lima, O. 2006. Antimicrobial Activity of *Indigofera suffruticosa*. Oxford. Journal; 3: 261-265.

Mahmoudi, R. and Nosratpour, S. 2013. Teucrium polium L. essential oil: phytochemiacl component and antioxidant properties. International Food Research Journal; 20(4).

Milos, M., Mastelic, J., and Jerkovic, I., 2000. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from organo (*Origanum vulgar* L. ssp. *hirtum*). Food Chemistry; 71: 79-83.

Liu, X., Zhao, M., Wang, J., Yang, B. and Jiang, Y. 2008. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six region in China. J. Food Composition Analysis; 21: 219-228.

Kirby, A.J. and Schmidt, R.J. 1997. The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs-1. J. Ethnopharmacology; 56: 103-108.

Saha, K., Lajis, N.H., Israf, D.A., Hamzah, A.S., Khozirah, S., Khamis, S. and Syahida, A. 2004. Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plant. Journal Ethno pharmacology; 92: 263-267.

Evaluation the Performance of Polar and non-Polar Solvents on the Antioxidant Properties of (*Teucrium polium* L.)

Ahmad Asgharzadeh[1]*, Seyedeh Faezeh Taghizadeh[2], Javad Asili[3]
[1*] Islamic Azad University of Shirvan, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture Sciences
[2] Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture and Landscape Engineering, Mashhad, Iran
[3] Pharmaceutical Research Center, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
*Corresponding Author: asg.ahmad@yahoo.com

Abstract

In this study, the antioxidant effects of aerial parts of *Teucrium polium* L. was studied by using different solvents. Solvents were selected in such a way that the polar and non-polar characteristics are taken into consideration. For this purpose, an experiment was conducted in a completely randomized design with three replication using solvent water (very polar), methanol (polar), ethyl acetate (relatively polar) and hexane (non-polar). The results indicated significant differences (P≤0.05) among extracts. The results of the inhibition of free radicals in the various extracts showed that methanol had greater effect as followed by water, ethyl acetate and hexane, respectively. In comparing the IC50 (50% power free radical inhibitor) among different extracts and standards, Vit C and BHT (27.24 and 29.67 µg/ml), the lowest IC50 was related to methanol (35.99 µg/ml), and the highest was calculated for hexane (97.12 µg/ml).

***Keywords*: Ethyl acetate, Free radical, hexane, Methanol**