نشریه جنگل و فراورده‌های چوب. مجله منابع طبیعی ایران
دوره ٦٦. شماره ٣. پاییز ١٣٩٢

تاریخ دریافت: ١٣٩١/٣/٢٠
تاریخ پذیرش: ١٣٩١/١٢/٢٠

ارزیابی میزان فنل و فلاونوئید تام و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست درختان راش، ممرز، و صنوبر

رؤیا فضلی؛ دانشجوی کارشناسی ارشد صنایع خمیر و کاغذ دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
نورالدین نظرنژاد *؛ استادیار گروه صنایع چوب و کاغذ دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
محمدعلی ابراهیم‌زاده؛ دانشیار گروه شیمی دارویی دانشگاه علوم پزشکی ساری، ساری، ایران

چکیـــده

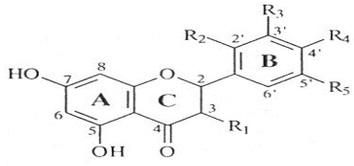
هدف این مطالعه، بررسی میزان فنول و فلاونوئید تام و بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی پوست درختان راش، ممرز، و صنوبر است. راش و ممرز از گونه‌های جنگلی شمال ایران، و صنوبر از گونه‌های دست‌کاشت است، ولی برخلاف فراوانی این درختان، اطلاعات بسیار کمی در مورد ترکیبات شیمیایی پوست آن‌ها و کاربردشان ارائه شده است. ترکیبات آنتی‌اکسیدانی که از شیوع بیماری‌های مزمن و تخریب بسیاری از مواد غذایی جلوگیری می‌کنند، از پوست این گیاهان نیز قابل استخراج است. بدین‌سبب، عصارهٔ استخراج‌شده از گیاهان، که باعث کاهش شیوع بیماری‌های مزمن می‌شود، در صنایع دارویی بسیار اهمیت دارد. پس از تهیهٔ پوست این درختان، عصاره‌های استنی به روش سوکسوله استخراج شدند. ابتدا میزان فنول و فلاونوئید عصاره‌ها اندازه‌گیری و سپس برای ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج‌شده، از دو روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل و قدرت احیاکنندگی، استفاده شد. نتایج نشان داد که میزان فنول و فلاونوئید در پوست درخت ممرز بیشترین، و در راش کمترین مقدار بوده است. نتایج آزمون به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل نشان داد که غلظت مهار ٥٠ درصد در عصارهٔ استنی پوست درختان راش، ممرز، و صنوبر به‌ترتیب ٦٣/٠٧، ٣٣/١٧، و ٨٦/٣ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است. همچنین عصارهٔ راش قدرت احیاکنندگی بیشتری در مقایسه با سایر گونه‌ها داشت.

واژگان کلیدی: راش، صنوبر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنول تام، ممرز.

* نویسنده مسئول تلفن: ٠٩١٣٢٢١٩٥٦٢
E. mail: F_wood.paper@yahoo.com

مقدمه

پوست بسته به نوع گونه و موقعیت رشد، در حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد ساقهٔ درختان را تشکیل می‌دهد که این نسبت برای شاخه‌ها و قسمت‌های بالایی درخت بیشتر و حدود ۲۰ تا ۳۵ درصد است. طی عمل‌آوری چوب در صنایع گوناگون از جمله برای تولید خمیرکاغذ، کاغذ، تخته‌خرده‌چوب و... پوست از چوب جدا می‌شود که مقادیر زیادی از آن به‌عنوان ضایعات باقی می‌ماند و قسمت اصلی آن برای تولید انرژی سوزانده می‌شود. در گذشته، فقط پوست معدودی از گونه‌های بلوط و گردو برای استخراج ترکیبات تانن به‌کار می‌رفت. امروزه، از پوست گونه‌های دیگر نیز استفاده می‌شود، ولی فقط مقادیر اندکی از پوست درخت به‌عنوان مادهٔ اولیه برای تولید ترکیبات شیمیایی به‌کار می‌رود. چوب‌درون و پوست مقدار زیادی مواد استخراجی آروماتیک دارند. بیشتر آن‌ها ترکیب‌های فنولی‌اند و بسیاری از آن‌ها از ساختار فنیل پروپانی مشتق می‌شوند. از مهم‌ترین این ترکیبات فلاونوئیدها هستند که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه محققان بوده‌اند (شکل ۱). ترکیبات فنولی یک گروه متابولیت‌های ثانویهٔ آروماتیک گیاهی‌اند که به‌طور گسترده در سراسر گیاه پخش شده‌اند و تأثیرات بیولوژیکی متعددی چون فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدباکتریایی دارند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولیک در گیاهان عمدتاً به‌علت ویژگی‌های اکسایش‌ـکاهش و ساختار شیمیایی آن‌هاست که نقش مهمی در خنثی‌کردن رادیکال‌های آزاد، احاطه‌کردن فلزات انتقالی، و فرونشاندن مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه‌گانه از طریق تغییر مکان یا تجزیهٔ پراکسیدها دارند. این ویژگی‌ها با تأثیرات مفید آنتی‌اکسیدان‌های فنولیک بر روی سلامت در ارتباط است که به‌دلیل تأثیرات بازدارندگی این ترکیبات در مقابل پیشرفت بسیاری از بیماری‌های وابسته به تنش چون بیماری‌های قلبی‌ـعروقی، سندرم رودهٔ التهابی و بیماری آلزایمر است. فلاونوئیدها به‌شکل آزاد و گلیکوزیدی یافت می‌شوند و بزرگ‌ترین گروه فنول‌های موجود در طبیعت را تشکیل می‌دهند.



شکل ۱. ساختمان کلی فلاونوئیدها

نقش رادیکال‌های آزاد در ایجاد بسیاری از بیماری‌ها به اثبات رسیده است [۱]. واکنش‌های بیوشیمیایی متعددی در بدن، اکسیژن فعال تولید می‌کنند که توانایی تخریب مولکول‌ها را دارند. مواد آنتی‌اکسیدانی این اثر زیان‌بخش رادیکال‌های آزاد را بلوکه می‌کند. این ترکیبات موجب به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد و سمیت‌زدایی می‌شوند. در مقایسه با گیاهان آنتی‌اکسیدان‌ها طبیعی هستند [۲]. آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی معایبی دارد که برخی از آن‌ها، آسیب کبدی و سرطان است [۳]. بنابراین، وجود آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی قوی با اثربخشی بیشتر یک ضرورت جدی است. از این رو، امروزه بسیاری از متخصصان تغذیه برای تأمین آنتی‌اکسیدان‌های مورد نیاز بدن، این مواد را از گیاهان و پوست درختان استخراج می‌کنند که عوارض جانبی کمتر و اثربخشی بیشتری دارند [٤].

پوست درخت راش اثر قابض و تب‌بر دارد و در گذشته به‌عنوان اشتهاآور مصرف می‌شده و در سال‌های اخیر در درمان روماتیسم، نقرس، و بیماری‌های پوستی مصرف شده است [۵]. پوست درخت ممرز به‌علت داشتن تانن اثر قابض دارد و به‌صورت غرغره برای رفع گلودرد استفاده می‌شود و نیز اثر مقوی و تب‌بر دارد [۵].

محققان با استخراج ترکیبات فنولی از پوست اوکالیپتوس و ارزیابی تأثیرات آنتی‌اکسیدانی آن، توانستند تأثیر درجهٔ حرارت و غلظت حلال‌ها را روی بازده استخراج، مقدار فنول تام، و قدرت آنتی‌اکسیدانی

بررسی کنند [٦]. محققان دیگری مواد استخراجی پوست صنوبر را با آب داغ استخراج و سپس با چهار حلال گوناگون، چهار نمونه عصاره جداسازی کردند و در نهایت اثر آنتی‌اکسیدانی این نمونه‌ها را با سه روش DPPH، فسفومولیبدنم، و کانولااویل ترموکیدان بررسی کردند [۷]. تحقیقات نشان داد که ترکیبات پوست و برگ درختان بلوط بسیار مشابه‌اند. مقدار تانن پوست درخت بلوط ۱۳ تا ١٤ درصد و مقدار گالیک اسید ١/٦ درصد گزارش شده است [۸]. محققان از سه حلال متانول، آب، و استون برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی برگ‌های شاه توت استفاده کردند و دریافتند که حلال متانول بیشترین میزان ترکیبات فنولی (۹/۳۲ گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم عصارهٔ خشک) را استخراج می‌کند [۹]. ولیوگلو و مازا فلاونوئیدهای گلبرگ گل‌محمدی را با HPLC جداسازی و اندازه‌گیری و ترکیباتی مانند کامفرول، کوئرستین، و گالاکتوز را شناسایی کردند [۱۰]. هاسلر ۳۳ نوع فلاونوئید را در گیاه ژنکیوبیلوبا با روش HPLC با فاز معکوس شناسایی کرد و نتیجه گرفت که ترکیبات فنولی استخراج‌شده به شرایط رویشگاه بستگی دارد [۱۱]. در پژوهشی، آب، متانول، و اتیل استات را برای استخراج ترکیبات فنولی پوست و دانهٔ انار استفاده کردند و نتایج این تحقیق نشان داد که حلال متانول بیشترین بازده استخراج را دارد [۱۲].۱۰ ترکیب مونو و دی گلیکوزید فلاونول در فلاونوئیدهای برگ ممرز شناسایی شده و پیشنهاد شده است که برای افزایش کارایی عمل استخراج، باید عوامل مؤثر در این مسیر را شناسایی کرد و بهبود بخشید [۱۳]. ولیوگلو و مازا توزیع فنول تام در راش با چوب درون قرمز و بدون چوب درون قرمز را بررسی کردند. نتایج نشان داد که در نمونهٔ فاقد چوب درون قرمز مقدار فنول از پوست به سمت مغز افزایش می‌یابد، ولی در نمونهٔ دارای چوب درون قرمز، مقدار فنول فقط تا مرز چوب درون زیاد می‌شود. از این رو، دریافت شد که در این بافت‌ها شکل‌گیری و تجمع فنول شدیدتر است یا فنول‌های خاصی تجمع یافته‌اند. به‌علاوه، تبدیل فنول‌ها در بافت بدون چوب درون قرمز تا مرز چوب درون سریع‌تر رخ می‌دهد [١٤]. هاسلر و همکاران با روش HPLC پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدهای متنوعی را در عصارهٔ پوست درخت کاج شناسایی کردند و با بررسی اثر دما و زمان بر کارایی استخراج با اتانول دریافتند که در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد و زمان ۹۰ دقیقه بازده اسید گالیک حداکثر است [۱۵]. در یک بررسی مقدار ترکیبات فنولی تام عصارهٔ متانولی میوهٔ بلوط گونهٔ کوئرکوس‌روبور و کوئرکوس‌کریس به‌ترتیب ۰/۲۲۳ و ۰/۲۲۹ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در میلی‌گرم عصاره گزارش شد. [١٦]

میزان متابولیت‌های ثانویهٔ گیاهی مانند فنول و فلاونوئید تام و ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به عوامل متعددی از قبیل آب و هوا، گونه، روش استخراج، و روش اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان بستگی دارد [۱۷]. از آنجا که اثر آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های پوست درختان راش، ممرز، و صنوبر تاکنون گزارش نشده است، هدف این تحقیق اندازه‌گیری فلاونوئیدها، محتوای تام فنولی، و خصلت آنتی‌اکسیدان این ترکیبات در محیط آزمایشگاهی بوده است تا امکان به‌کارگیری پوست این درختان برای تولید دارو فراهم شود.

روش‌شناسی

تهیهٔ عصاره: نمونه‌های پوست از کارخانهٔ صنایع چوب و کاغذ مازندران تهیه شد و پس از انتقال به آزمایشگاه در هوای آزاد خشک شدند. سپس بدون جداکردن پوست درونی و بیرونی با آسیاب آزمایشگاهی به پودر تبدیل شدند. عصاره‌گیری با استفاده از استن و با روش سوکسوله انجام شد. حلال در خلأ تبخیر و با فریزدرایر خشک شد.

اندازه‌گیری محتوای تام فنولی و فلاونوئیدها

مقادیر فنول تام با روش فولین سیو-کالتیو اندازه‌گیری شد [۱۸]. عصاره با غلظت mg/ml ۱۰ تهیه شد. ۰/۵میلی‌لیتر از هر عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر ۰/۲ نرمال فولین سیو-کالتیو مخلوط و به‌مدت ۵ دقیقه هم زده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم

۲۰ درصد با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت قراردادن نمونه‌ها در دمای اتاق با دستگاه اسپکتروفوتومتر ماورای بنفش در ۷٦۰ نانومتردر مقابل بلانک (متانول) اندازه‌گیری شد. مقادیر فنول تام عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره اندازه‌گیری شد.

میزان محتوای فلاونوئید عصاره با روش رنگ‌سنجی ارزیابی شد [۱۹]. عصاره با غلظت ۱۰ mg/ml تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل و ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر محلول پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به این مخلوط اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد. جذب مخلوط حاصل در طول موج ٤۱۵ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر دوگانهٔ مرئی-ماورای بنفش اندازه‌گیری شد. میزان فلاونوئید با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش شد.

برای بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی از دو روش استاندارد شامل رادیکال DPPH و قدرت احیا استفاده شد. اساس روش نخست به‌دام‌اندازی رادیکال‌های DPPH (دی فنیل پیکریل هیدرازیل) بر مبنای توانایی هیدروژن‌دهی است [۲۰]. این روش به‌منظور ارزیابی فعالیت رادیکال آزاد به‌کار می‌رود و از مزایای آن عدم وابستگی به قطبیت نمونه است [۲۱].

در روش دوم، قدرت احیاکنندگی مواد موجود در نمونه با احیای آهن ۳ به آهن ۲ با توانایی در دادن الکترون سنجیده می‌شود [۲۰]. احیای آهن اغلب به‌عنوان شاخص فعالیت الکترون‌دهی به‌کار می‌رود که مکانیسم مهمی در عمل آنتی‌اکسیدانی مواد فنولی است [۲۲].

ارزیابی میزان توانایی به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH

رادیکال پایدار دی فنیل پیکریل هیدرازیل برای تعیین فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد به‌کار رفت [۲۳، ۲٤]. ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH به ۱ میلی‌لیتر از عصاره اضافه شد و مخلوط حاصل به‌خوبی تکان داده شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد. سپس جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV در ۵۱۷ نانومتر با بلانک متانول قرائت شد. آسکوربیک اسید به‌عنوان استاندارد استفاده شد. درنهایت، مقدار به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH با فرمول زیر محاسبه شد:

$$\left(\frac{A_B - A_S}{A_B}\right)\times 100$$

A_B= جذب بلانک

A_S= جذب نمونه یا استاندارد

تعیین قدرت احیاکنندگی

احیای آهن به‌عنوان معیاری برای قابلیت الکترون‌دهی به‌کار می‌رود که مکانیسم مهمی در اکسایش ترکیبات فنولی است [۲۵]. میزان قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها از طریق روش ین و چن در مطالعات قبلی ارزیابی شد [۲٦]. از این رو، عصاره با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰، ۸۰۰ و ۱٦۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفاتهٔ ۰/۲ مولار با pH= ٦/۵ و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد پتاسیم فری سیانید [$K_3Fe(CN_6)$] مخلوط شد. مخلوط مذکور در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه نگه‌داری شد؛ سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول تری‌کلرواستیک اسید به نمونه‌ها اضافه شد تا واکنش متوقف شود. نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از قسمت بالای محلول با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد فریک کلراید ($FeCl_3$) به آن اضافه شد و بلافاصله جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. آسکوربیک اسید با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰، ۸۰۰ و ۱٦۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان استاندارد استفاده شد. افزایش جذب در مخلوط واکنش به مفهوم افزایش قدرت احیاکنندگی است.

آنالیز آماری

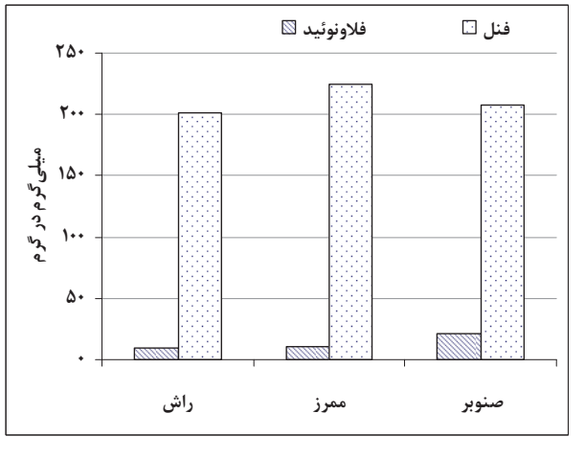
داده‌ها پس از جمع‌آوری با نرم‌افزار SPSS بررسی و تحلیل شدند. برای بررسی نتایج و مقایسهٔ میانگین عصاره‌های استنی از آزمون تجزیهٔ واریانس یک‌طرفه استفاده شد. تمام اندازه‌گیری‌ها برای هر گونه سه بار تکرار و مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد.

نتایج و بحث

بررسی‌ها نشان داده است که عصاره‌های گیاهان غنی از فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی، با کاهش استرس اکسیداتیو باعث آثار محافظتی سلول‌ها می‌شوند. فنل‌ها و پلی‌فنل‌ها به‌طور گسترده در بسیاری از مواد غذایی با منشأ گیاهی یافت می‌شوند و تأثیرات آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی دارند. محتوای تام فنولی با روش فولین‌سیو-کالتیو به‌صورت میلی‌گرم اسیدگالیک در گرم عصاره بر اساس معادلهٔ خط منحنی استاندارد (R^2=۰,۹۸۹۸, Y=۰,۰۰۵۸X) محاسبه شد. محتوای تام فنولی برای عصارهٔ استنی پوست راش، ممرز، و صنوبر ۲۰۱/۲، ۲۲٤/۲، و ۲۰۸ میلی‌گرم اسیدگالیک در گرم عصاره به‌دست آمد. مقدار فنول تام نمونه‌ها به‌ترتیب بیشترین به کمترین مقدار ممرز، صنوبر، و راش بود. محتوی فلاونوئید تام نمونه‌ها نیز به روش رنگ‌سنجی ارزیابی شد و بر مبنای معادلهٔ خط (R^2=۰,۸٦۸, Y=۰,۳٥۸X-۰,٤٦٤) برای راش، ممرز، و صنوبر به‌ترتیب ۹/٦، ۱۰/۸، و ۲۰/۹ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره بود (جدول ۱).

جدول ۱. میزان فنول و فلاونوئید تام و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در عصارهٔ استنی پوست راش، ممرز، و صنوبر

آزمایش‌ها	راش	ممرز	صنوبر
فنول تام	۲۰۱/۲ ± ۰/۲۵	۲۲۴/۲ ± ۰/۲۵	۲۰۸ ± ۰/۳۱
فلاونوئید تام	۹/۶ ± ۰/۱۲	۱۰/۸ ± ۰/۱	۲۰/۹ ± ۰/۲۱
دی فنیل پیکریل هیدرازیل	۶۳/۰۷ ± ۰/۱۵	۳۳/۱۷ ± ۰/۱۲	۸۶/۳ ± ۰/۰۶
توان احیاکنندگی	۲/۴۲ ± ۰/۰۰۲	۲/۱۳۹ ± ۰/۰۰۳	۲/۲۹۲ ± ۰/۰۰۴



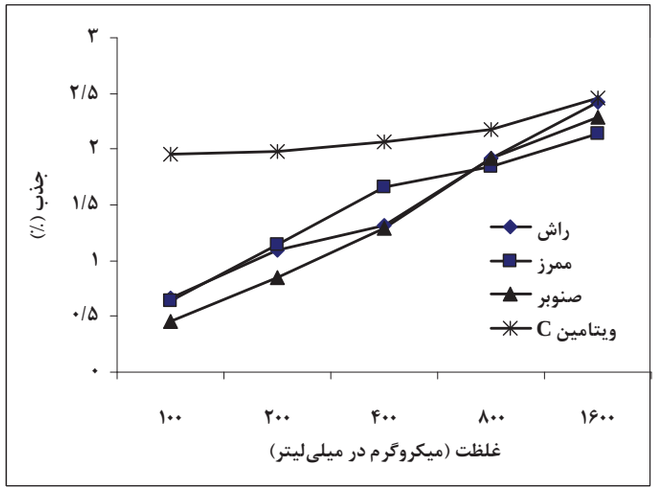
شکل ۲. میزان فنول و فلاونوئید تام عصاره‌های استنی راش، ممرز، و صنوبر (میلی‌گرم در گرم عصاره)

فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH

رادیکال DPPH یک رادیکال آزاد پایدار با اتم مرکزی نیتروژن است که با احیاشدن و تولید مولکول پایدار DPPH-H[1] از ارغوانی به زرد تغییر رنگ می‌دهد. غلظت مهار ۵۰ درصد IC_{50} در عصارهٔ استنی راش، ممرز، و صنوبر به ترتیب ۶۳/۰۷، ۳۳/۱۷، و ۸۶/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل در عصارهٔ صنوبر بیشترین و در عصارهٔ ممرز کمترین مقدار را دارد. تجزیهٔ واریانس داده‌ها نیز نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین آزمون DPPH نمونه‌ها دیده شد ($p<0/001$).

قدرت احیاکنندگی عصاره

قدرت احیاکنندگی، توانایی الکترون‌دهندگی آنتی‌اکسیدان را نشان می‌دهد. اگر ترکیبی این ویژگی را داشته باشد، باعث کاهش ترکیبات حدواسط اکسیدشده می‌شود. به این ترتیب، باعث شکستن زنجیر این واکنش می‌شود و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان اولیه و ثانویه عمل می‌کند. در روش قدرت احیاکنندگی، جذب نور با قدرت احیاکنندگی رابطهٔ مستقیم دارد. شکل ۲ منحنی غلظت‌ـجذب را در عصارهٔ استنی سه گونه نشان می‌دهد. شکل نشان می‌دهد که قدرت احیاکنندگی تمام عصاره‌ها با افزایش غلظت زیاد می‌شود. همچنین قدرت احیاکنندگی ممرز در غلظت‌های پایین بیشتر از گونه‌های دیگر است؛ در حالی که در غلظت‌های بالا قدرت احیاکنندگی راش بیشتر از همه است. بر طبق آنالیز واریانس داده‌ها، مقادیر در آزمون قدرت احیاکنندگی تا سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار است.



شکل ۳. بررسی قدرت احیاکنندگی عصارهٔ استنی پوست درختان راش، ممرز، و صنوبر در غلظت ۱۰۰ـ۱۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر

(ویتامین C به‌عنوان نمونهٔ شاهد به‌کار گرفته شد)

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، عصارهٔ استنی ممرز دارای مقادیر بالاتری از فنول تام، و عصارهٔ استنی صنوبر دارای مقادیر بیشتری از فلاونوئید تام در مقایسه با سایر گونه‌ها بود و شاید بتوان گفت که خاصیت آنتی‌اکسیدانی این درختان مربوط به ترکیبات فنولی موجود در آن بوده است. فنول‌ها و ترکیبات پلی‌فنولی مانند فلاونوئیدها به‌طور گسترده در محصولات غذایی و دارویی یافت شده و نشان داده شده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی چشمگیری دارند [۲۷].

1. 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl

افزایش سطح فلاونوئیدها در رژیم غذایی، به کاهش برخی بیماری‌ها در انسان منجر می‌شود [۲۸]. میزان فنول و فلاونوئید تام در این بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره‌های تهیه‌شده از پوست درختان مورد نظر را توجیه می‌کند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده بر طبق جدول ۲ طی آزمون آنالیز واریانس دریافتیم که در دو تست آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی، مقادیر تا سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار است ($p<۰/۰۰۱$).

جدول ۲. آنالیز واریانس ویژگی‌های مورد بررسی

آزمایش‌ها	مجموع مربعات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	معنی‌داری
DPPH صنوبر	۵۰۸۵ /۶۳۳	۴	۱۲۷۱/۴۰۸	۴۶/۳۷۵	۰/۰۰۰
صنوبر-قدرت احیا	۶/ ۷۴۸	۴	۱/۶۸۷	۵۳/۰۱۳	۰/۰۰۰
DPPH راش	۷۰۹۸/۹۳۰	۴	۱۷۷۴/۷۳۲	۵۱/۲۲۲	۰/۰۰۰
راش-قدرت احیا	۵/۷۷۱	۴	۱/۴۴۳	۵۶/۱۸۳	۰/۰۰۰
DPPH ممرز	۹۸۲/۰۳۳	۴	۲۴۵/۵۰۸	۳۷/۵۱۶	۰/۰۰۰
ممرز-قدرت احیا	۴/۲۳۵	۴	۱/۰۵۹	۵۱/۶۲۰	۰/۰۰۰

ترکیباتی که رنگ رادیکال آزاد DPPH را با گرفتن هیدروژن یا الکترون از رنگ ارغوانی به زرد تبدیل کنند، ترکیبات با قابلیت آنتی‌اکسیدانی‌اند [۲۹] بر این اساس، مدل به‌دام‌اندازی رادیکال پایدار DPPH برای ارزیابی توانایی به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد در نمونه‌های گوناگون استفاده می‌شود [۳۰]. اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH از روش‌های معتبر، دقیق، آسان، و مقرون به صرفه با قابلیت تکرارپذیری بالاست که در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی به‌کار می‌رود [۳۱]. بر پایهٔ درصد مهار به‌دست‌آمده مشخص شد که عصارهٔ استنی پوست صنوبر فعالیت بیشتری از عصارهٔ پوست دو گونهٔ دیگر از خود نشان می‌دهد. نتایج آزمون DPPH نشان داد که توانایی عصاره‌های گونه‌های راش، ممرز، و صنوبر در مهار رادیکال‌های آزاد به غلظت عصاره‌ها بستگی دارد و با افزایش غلظت فعالیت ضدرادیکالی آن‌ها افزایش می‌یابد. در غلظت‌های بیشتر، ترکیبات فنولی به‌سبب افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال انتقال هیدروژن به رادیکال‌های آزاد، و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد [۳۲]. دو گونهٔ بلوط کوئرکوس‌کریس و کوئرکوس‌روبور از نظر میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در غلظت‌های گوناگون ارزیابی و مشخص شد که با افزایش غلظت عصارهٔ متانلی از ۱۲/۵ـ ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر درصد مهار رادیکال‌های آزاد به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد [۱۶].

سنجش قدرت احیاکنندگی در عصاره‌ها ناشی از احیای آهن ۲ به آهن ۳ با انتقال الکترون است. میزان کمپلکس آهن با اندازه‌گیری میزان تشکیل رنگ آبی پروس در ۷۰۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است [۳۳]. حضور عوامل احیاکننده (آنتی‌اکسیدان‌ها) منجر به احیای کمپلکس‌های فری‌سیانید و تبدیل آن‌ها به فرم فروس می‌شود که بسته به ظرفیت احیاکنندگی عصاره‌های مورد بررسی با تغییر رنگ محلول از زرد

به درجات گوناگونی از رنگ‌های سبز و آبی همراه است [۳٤]. افزایش جذب در این طول موج حاکی از افزایش قابلیت احیاکنندگی است و رنگ آبی ایجادشده با قدرت الکترون‌دهی آنتی‌اکسیدان‌های مورد آزمایش رابطهٔ خطی دارد [۳۵]. در عصاره‌های گوناگون از نظر قدرت احیاکنندگی با افزایش غلظت میزان جذب به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد. طی فرایند استخراج، اسید اسکوربیک، که حلالیت بالایی در آب و حلال‌های الکلی دارد، همراه با ترکیبات فنولی وارد عصاره می‌شود که خود اهداکنندهٔ الکترون بوده و بنابراین درصد بیشتری از یون‌های آهن سه‌ظرفیتی با جذب الکترون احیا می‌شود و شدت جذب محلول افزایش می‌یابد [۳٦]. همچنین در مقایسه با نمونهٔ شاهد، یعنی ویتامین ث، می‌بینیم که هرچند در غلظت‌های پایین قدرت مهارکنندگی هر سه نمونه کمتر است، ولی در غلظت زیاد، به‌خصوص در گونهٔ راش، قدرت مهارکنندگی تقریباً برابری با نمونهٔ شاهد داشته است. به بیان دیگر، عصارهٔ پوست راش قدرت احیاکنندگی بهتری در مقایسه با سایر گونه‌ها دارد. اثر این عصاره مانند تأثیر اسید آسکوربیک است. این نتیجه حاکی از آن است که برای رسیدن به قدرت احیاکنندگی، غلظت مورد نیاز از عصارهٔ استنی راش معادل همان غلظت از ویتامین ث می‌باشد. چون قابلیت احیاکنندگی عصارهٔ راش بالاست، می‌توان نتیجه گرفت که این عصاره‌ها با کمک انتقال الکترون باعث پایان‌یافتن واکنش‌های زنجیره‌ای می‌شود. عصارهٔ استنی راش، ممرز، و صنوبر در دو مدل مورد مطالعه، سطوح گوناگونی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان دادند و منابع مفیدی برای تأمین منابع طبیعی آنتی‌اکسیدانی‌اند. نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیبات فنولی حاصل از پوست درختان راش، ممرز، و صنوبر در صنعت داروسازی هم به‌کار می‌رود.

سپاس‌گزاری

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

References

[1]. Kumaran, A., and Karunakaran, R.J. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of Coleus aromaticus. Food Chemistry, 97: 109-114.

[2]. Yen, G.C., and Duh, P.D. (1995). Antioxidant activity of methanolic extracts of Peanut huls from various cultivars. Journal of the American Oil Chemist Society, 72: 1065-1067.

[3]. Ito, N., Fukushima, S., Hagiwara, A., Shibata, M., and Ogiso, T. (1983). Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. Journal of the National Cancer Institute, 70: 343-7.

[4]. Rice Evans, C. (2004). Flavonoids and isoflavones (absorption, metabolism and bioactivity). Free Radical Biology and Medicine, 36: 827-8.

[5]. Torkaman, J., and Seyam, S.H. (2009). Measurment of tannin in tree barks of Oak, Beech, Alder, Hornbeam and Black walnut. Journal of Medicinal Plant, 8(29): 58-63.

[6]. Vazquez, G., Santos, J., Freire, M.S., Antorrena, G., and Gonzalez, J. (2012). Extraction of antioxidants from eucalyptus bark. Wood Science Technology, 46: 443-457.

[7]. Niokhor Diouf, P., and Stevanovic, Tatjana. (2009) Antioxidant properties and polyphenol contents of trembling aspen bark extracts. Cloutier Alain, 43: 457-470.

[8]. Motavaslian, M. (1998). Measurement of Oak seed as medicine and nutrient. PhD thesis, Faculty of pharmacy, University of Tehran, 112 pp.

[9]. Arabshahi, D.S., and Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry leaves. Food Chemistry, 102: 1233-1240.

[10]. Velioglu, Y.S., and Mazza, G. (1991). Characterization of flavonoids in petals of rosa damascene by HPLC and spectral analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39: 463-467.

[11]. Hasler, A. (1992). Botanical, analytical and pharmacological aspect of Ginkgo biloba. Schweiz Apoth, 128(12): 341-347.

[12]. Singh, S., Shimada, K., and Singh, R.b. (2002). In vitro methods of assay of antioxidants (an overview). Food Reviews International, 24: 392-415.

[13]. Jeong, J., Chang, C., Chen, Z., and Park, T. (2007). Systematic aspects of foliar flavonoids in Subsect-Carpinus (Carpinus, Betulaceae). Biochemical Systematics and Ecology, 35 (9): 606-613.

[14]. Albert, L., Hofmann, T., I.Nemeth, Zs., Retfalvi, T.J., Koloszar, Sz., and Csepregi, I. (2005). Radial Variation of total phenol content in beech (Fagus Sylvatica L.) wood with and without red heartwood. European Journal of wood and wood products, 61(3): 227-230.

[15]. Jerez, M., Pinelo, M., Sineiro, J., and Jose, M. (2006). Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark (assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis). Food chemistry, 94 (3): 406-414.

[16]. Rakic, S., Petrovic, S., Kukic, J., Jadranin, M., Tesevic, V., Povrenovic, D., and Siler Marinkovic, S. (2007). Influence of thermal treatment on phenolic compouds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. Food Chemistry, 104: 830-834.

[17]. 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.
[18]. Ordone, A.A.L., Gomez, J.D., Vattuone, M.A. (2008). Antioxidant activities of Sechium edule swartz extracts. Food Chemistry, 97: 452-458.
[19]. Chang, Y.L., Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y. (2002). Vitamin C equivalent anti oxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. Journal of Agricultural and food chemistry, 50(13):3713-3717.
[20]. Chung, Y.C., Chien, C.T., Teng, K.Y., and Chou, S.T. (2006). Antioxidative and mutagenic properties of Zanthoxylum ailanthoides Sieb & zucc. Food Chemistry, 97: 418-425.
[21]. Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., and Sokmen, A. (2007). Investigation of the antioxidant properties of Ferula orientalis L. using a suitable extraction procedure. Food Chemistry, 100(2): 584-589.
[22]. Hinneburg, I., Damien Dorman, H.J., and Hiltunen, R. (2006). Antioxidant activities of selected culinary herbs and spices. Food Chemistry, 97: 122-129.
[23]. Ebrahimzadeh, M.A., Hosseinimehr, S.J., Hamidinia, A., and Jafari, M. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of Feijoa sallowiana fruits peel and leaves. Pharmacologyonline, 1: 7-14.
[24]. Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., and Hafezi, S. (2008). Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turkish Journal of Biology, 32: 43-49.
[25]. Nabavi, S.M., Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., Hamidinia, A., and Bekhradnia, A.R. (2008). Determination of antioxidant activity, phenol and flavonoids content of parrotia persica Mey. Pharmacologyonline, 2: 560-567.
[26]. Yen, G.C. and Chen, H.Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43(1):27–32.
[27]. Van Acker, S.A.B.E., Van Den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P., and Van der Vijgh, W.J.F. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavanoids. Free Radical Biology and Medicine, 20(3): 331-342.
[28]. Hertog, M.L.G., Feskens, E.J.M., Hollman, P.H.C., Katan, M.B., and Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidants flavonoids and the risk of coronary heart disease (the zutphen elderly study). Lancet, 342: 1007–1011.
[29]. Brand Williams, W., Cuvelier, M., and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 28: 25-30.
[30]. Lee, S.E., Hwang, H.J., Ha, J.S., Jeong, H.S. and Kim, J.H. (2003). Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. Life Sciences, 73: 167–179.
[31]. Singh, S., and Singh, R.P. (2008(. In Vitro Methods of Assay of Antioxidants (an overview). Food Reviews International, 24: 392-415.
[32]. Sanchez Moreno, C., Larrauri, J.A., and Saura Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Research International, 32:407–412.
[33]. Benzie, I.F.F., Wai, Y., and Strain, J.J. (1999). Antioxidant (reducing) efficiency of ascorbate in

plasma is not affected by concentration. Journal of Nutritional Biochemistry, 10: 146–50.

[34]. Soares, A.A., Souza, C.G.M, Daniel, F.M., Ferrari, G.P., Costa, S.M.G., and Peralta, R.M. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of Agaricus brasiliensis in two stages of maturity. Food Chemistry, 112: 775-781.

[35]. Huang, D., Ou, B., and Prior, R.L. (200). The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultur and Food Chemistry, 53: 1841.

[36]. Arabshahi, D.S. (2006). Studies on selected plant extracts with reference to their nutritional and pharmacological characteristics. PhD thesis, University of Mysore, Department of studies in Food Science and Nutrition, 121pp.