

Antioxidant Activity and Free Radical Scavenging of the Extract Obtained from *Alchemilla persica* by Percolation, Polyphenol Fraction, and Ultrasonic Methods

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Seyedalipour B.* PhD,
Dadoei Z.¹ MSc,
Ebrahimzadeh M.A.² PhD

How to cite this article

Seyedalipour B, Dadoei Z, Ebrahimzadeh M A. Antioxidant Activity and Free Radical Scavenging of the Extract Obtained from *Alchemilla persica* by Percolation, Polyphenol Fraction, and Ultrasonic Methods. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(2):219-226.

*Cellular & Molecular Biology Department, Basic Sciences Faculty, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

¹Biochemistry Department, Biology Faculty, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

²"Pharmaceutical Sciences Research Center" and "Medicinal Chemistry Department, Pharmacy Faculty", Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Correspondence

Address: Cellular & Molecular Biology Department, Basic Sciences Faculty, University of Mazandaran Pardis, Babolsar, Iran. Postal code: 4741695447
Phone: +98 (11) 35302405
Fax: +98 (11) 35302450
b.alipour81@gmail.com

Article History

Received: September 4, 2016
Accepted: December 6, 2017
ePublished: June 21, 2018

ABSTRACT

Aims *Alchemilla* L. genus (Rosaceae) has various biological activities such as anti-inflammatory, anticarcinogenic, antioxidant and antimicrobial. The aim of the present study was to investigate antioxidant activity and free radical scavenging of the extract obtained from *Alchemilla persica* by percolation, polyphenol fraction, and ultrasonic methods.

Materials & Methods In the present experimental research, *Alchemilla persica* was used and percolation, polyphenol, and ultrasonics methods were used for extraction and the antioxidant activities of the extracts were determined by different tests, including 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), nitric oxide scavenging activity, Iron chelating activity, and reducing power. Total phenolic and flavonoid content were measured by the Folin Ciocalteu and AlCl₃ methods, respectively. The data were analyzed by SPSS 22 software, using one-way ANOVA and tukey test.

Findings In DPPH radical scavenging activity, the polyphenol extract had a significant different with other extracts (p=0.001). Polyphenolic extract showed higher reducing power than other extracts and Vitamin C (p=0.001). Percolation extract had higher amounts of total phenolic and flavonoid content than other extracts.

Conclusion Polyphenolic extracts have the highest DPPH, nitric oxide scavenging activity, Iron chelating activity, and reducing power compared to ultrasonic and percolation methods. Aerial parts of *Alchemilla persica* extracts have high levels of antioxidant activity including phenols and flavonoids.

Keywords *Alchemilla persica*; Ultrasonic; Antioxidant Activity; Flavonoids

CITATION LINKS

[1] Oxidative stress promotes the development of transformation: Involvement ... [2] Effects of free radicals and antioxidants ... [3] Radical-scavenging polyphenols: New strategies for their ... [4] Antioxidant activities of ... [5] Molecular Techniques to assess microbial community structure, function and dynamics in the ... [6] Bioactive compounds in foods ... [7] Biochemical and therapeutic effects of antioxidants ... [8] Recent advances in extraction methods ... [9] Optimisation of ultrasound-assisted ... [10] Effect of ultrasonic treatment on the recovery ... [11] Leaf and petiole anatomical characters ... [12] Flavonoid compounds identified in *Alchemilla* L. species ... [13] Esculetin in *Alchemilla speciosa*: Identification ... [14] Apoptotic and necrotic effects of plant extracts belonging ... [15] Amino acid composition of the *Alchemilla* L. genus ... [16] Effects of *Alchemilla vulgaris* and ... [17] Flavonoid constituents and free ... [18] Anti-influenza activity of *Alchemilla mollis* ... [19] Screening of plant extracts for antioxidant ... [20] Antioxidant activity of polyphenol and ultrasonic extracts ... [21] Antioxidant activity of polyphenol and anthocyanin extracts from fruits ... [22] Phenolic content and antioxidant activity ... [23] Estimation of total flavonoid content in propolis ... [24] Antioxidant activities of Iranian corn ... [25] Antioxidant activity of various tea extracts ... [26] Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate ... [27] Nitric oxide scavenging by ... [28] Polyphenols and prevention of cardiovascular ... [29] Comparing the impact of different extraction ... [30] Evaluation of three methods for the extraction of ... [31] Antioxidant properties and phenolic composition ... [32] Flavonoids extracted from *Ribes nigrum* L. and *Alchemilla* ... [33] In vitro methods of assay of antioxidants ... [34] Synthesis and evaluation of new ... [35] Diterpenoids and flavonoids from the fruits of *Vitex agnus-castus* ... [36] Antioxidant activity and phenolic compounds of ... [37] Antioxidant activity of alcoholic extract ... [38] Free radical scavenging ability of methanolic extract of *Hyoscyamus squarrosus* ... [39] Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from ...

فعالیت آنتی اکسیدانی و به دام اندازی رادیکال آزاد عصاره /کمبلا پرسیکا با روش های پرکولاسیون، پلی فنولیک و اولتراسونیک

باقر سیدعلی پور * PhD

گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

زهره دادویی MSc

گروه بیوشیمی، دانشکده زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، سنجند، ایران

محمدعلی ابراهیم زاده PhD

"مرکز تحقیقات علوم دارویی" و "گروه شیمی دارویی، دانشکده دارو شناسی"، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

چکیده

اهداف: جنس الکمبلا از تیره گل سرخ، فعالیت بیولوژیک مختلفی از جمله ضد التهاب، ضد سرطان، آنتی میکروب و آنتی اکسیدانی دارد. هدف پژوهش حاضر، بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و به دام اندازی رادیکال آزاد عصاره /کمبلا پرسیکا با روش های پرکولاسیون، پلی فنولیک و اولتراسونیک بود.

مواد و روش ها: در مطالعه تجربی حاضر از گیاه /کمبلا پرسیکا و برای عصاره گیری از سه روش پرکولاسیون، پلی فنولیک و اولتراسونیک، استفاده و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها به وسیله آزمون های به دام اندازی رادیکال آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل، نیتریک اکساید، قدرت احیا کنندگی و شلاته کنندگی یون آهن تعیین شد. محتوی فنولی و فلاونوئیدی تام به وسیله روش فولین سیو-کالتیو و آومینوم کلراید سنجیده شد. نتایج با نرم افزار SPSS 22 از طریق آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی تحلیل شدند.

یافته ها: در روش به دام اندازی رادیکال DPPH، عصاره حاصل از روش پلی فنولیک اختلاف معنی داری با عصاره حاصل از دو روش دیگر داشت ($p=0/001$). عصاره پلی فنولیک فعالیت به دام اندازی نیتریک اکساید و شلاته کنندگی یون آهن بیشتری در مقایسه با روش های دیگر نشان داد ($p<0/001$). عصاره پلی فنولیک قدرت احیا کنندگی بیشتری در مقایسه با سایر عصاره ها و ویتامین C نشان داد ($p=0/001$). محتوای فنولی و فلاونوئیدی تام عصاره پرکولاسیون بیشتر از بقیه عصاره ها بود.

نتیجه گیری: عصاره های پلی فنولیک، بیشترین فعالیت را در به دام اندازی رادیکال DPPH، به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید، قدرت احیایی و توانایی شلاته کنندگی آهن در مقایسه با روش اولتراسونیک و پرکولاسیون دارند. بخش های هوایی گیاه /کمبلا پرسیکا دارای مقادیر بالایی از ترکیبات طبیعی آنتی اکسیدانی از جمله فنول و فلاونوئید است.

کلیدواژه ها: /کمبلا پرسیکا، اولتراسونیک، فعالیت آنتی اکسیدان، فلاونوئید

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۱۵

* نویسنده مسئول: b.alipour81@gmail.com

مقدمه

رادیکال های آزاد مولکول هایی فعال از نظر شیمیایی هستند و تولید این رادیکال ها یک فرآیند طبیعی واکنش های متابولیزی بدن است. استرس اکسیداتیو ناشی از تولید بیش از اندازه رادیکال های آزاد و گونه های فعال اکسیژن به علت تولید کم آنتی اکسیدان های اندوژن یا افزایش استفاده از آنها است [1]. آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که مانع فعالیت رادیکال های آزاد می شوند، از اکسایش آنها جلوگیری می کنند و با غیرفعال کردن آنها سلول های بدن را از اثرات مخرب این ترکیبات مصون نگه می دارند [2].

میان آنتی اکسیدان ها، ترکیبات فنولی که به طور گسترده در سراسر گیاه پخش شده اند از همه موثرتر هستند. ساختار شیمیایی این ترکیبات شامل گروه های آروماتیک و هیدروکسیل فراوان است و از طریق الکترون های جفت نشده موجود در اطراف حلقه آروماتیک، در

به دام اندازی رادیکال های آزاد نقش دارند [3]. بنابراین فعالیت آنتی اکسیدانی این ترکیبات در گیاهان عمدتاً به دلیل ویژگی های اکسایش-کاهش، وجود پیوندهای هیدروژنی در حلقه آروماتیک و ساختار شیمیایی آنها است که می توانند نقش های مهمی را در خنثی کردن رادیکال های آزاد بازی کنند [4]. اهمیت رادیکال های آزاد در ایجاد بسیاری از بیماری ها کاملاً به اثبات رسیده است [5]. غذاهای غنی از آنتی اکسیدان ها نقش مهمی در پیشگیری از بیماری های قلبی-عروقی، سرطان [6] و بیماری های دژنراتیو (پارکینسون و آلزایمر) بازی می کنند [7].

در سال های اخیر مطالعات بسیاری به منظور بررسی و استخراج آنتی اکسیدان های طبیعی از گیاهان مختلف صورت گرفته است [8]. روش های کلاسیک عصاره گیری بر پایه قرارگرفتن گیاه در حلال مناسب است. از جمله روش های کلاسیک می توان سوکسیله، تقطیر، ماسیراسیون و پرکولاسیون را نام برد. اما هر یک از این روش ها دارای مزایا و معایب مخصوص به خود هستند. از مزایای روش ماسیراسیون این است که بدون به کاربردن دستگاه ها و ابزارهای پیچیده و عدم استفاده از حرارت می توان عصاره هایی با میزان مواد موثره یکنواخت به دست آورد. از معایب این روش، زمان طولانی انجام عصاره گیری است. کوتاهی مدت کار، صرفه جویی در مقدار مایع مصرفی و به دست آوردن محلول های نسبتاً کامل بدون نیاز به حرارت از جمله مزایای روش پرکولاسیون است. استخراج به کمک اولتراسوند یک روش ساده و ارزان بوده و جایگزین مناسبی برای روش های سنتی استخراج است. افزایش بازده عصاره گیری، افزایش سرعت واکنش و استفاده از هر نوع حلال از مهم ترین محاسن آن به شمار می رود. اما فیلتراسیون و جداسازی عصاره حاصله از ماده گیاهی از معایب این روش هستند [9, 10].

گیاهان جنس الکمبلا متعلق به خانواده گل سرخ هستند و حدود ۳۰۰ گونه دارند. /کمبلا پرسیکا (*Alchemilla persica*)، گیاهی نسبتاً بزرگ به ارتفاع ۲۵ تا ۱۰۰ سانتی متر، برگ های قاعده ای طوقه ای تا حدودی دایره ای، پهنک ۵ تا ۱۵ سانتی متر، لبادار، دارای گوشوارک گوشه ای، گل آذین خوشه ای، دم گل طویل، کاسبرگ های تخم مرغی-مثلثی، دارای رگبرگ های برجسته، گلبرگ های زرد مایل به سبز یا زرد به طول ۲ تا ۳ میلی متر و قطر ۳ تا ۵ میلی متر، فصل گل دهی اواخر بهار، متعلق به مناطق خزری و ایران-توران است. پراکندگی جغرافیایی /کمبلا پرسیکا در قفقاز و عراق، اروپا و بیشتر در مناطق آلپی، خنک و با ارتفاع زیاد بوده و پراکندگی آن در ایران مناطق شمال و شمال غرب، غرب و مرکز است (شکل ۱) [11].



شکل (۱) گیاه /کمبلا پرسیکا

اندازه گیری محتوای تام فنولی و فلاونوئیدها: محتوای تام فنولی از طریق روش فولین سیو- کالتیو انجام شد [22]. بدین منظور غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از هر عصاره (در متانول) تهیه و ۰/۵ میلی لیتر از هر عصاره با ۲/۵ میلی لیتر واکنشگر ۲/۲ نرمال فولین سیو-کالتیو، مخلوط و پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی لیتر محلول کربنات سدیم با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه شد. جذب نمونه ها پس از ۲ ساعت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر در مقابل بلانک، اندازه گیری شده و سپس محتوای تام فنولی عصاره با استفاده از منحنی استاندارد براساس میلی گرم گالیک اسید در هر یک گرم عصاره مورد سنجش قرار گرفت. میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره از طریق روش های رنگ سنجی ارزیابی شد [23]. غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از هر عصاره تهیه و به ۰/۵ میلی لیتر از نمونه (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۱/۰ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪، ۱/۰ میلی لیتر از محلول پتاسیم استات یک مولار و در نهایت ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر هم اضافه شد. جذب مخلوط بعد از ۳۰ دقیقه در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. کوثرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون، استفاده و میزان فلاونوئید براساس میزان معادل میلی گرم کوثرستین در گرم عصاره (ماده خشک) گزارش شد.

فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد: رادیکال پایدار دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) برای تعیین فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد به کار رفت. به یک میلی لیتر از عصاره (۴۰ میلی گرم در ۲۵ میلی لیتر)، یک میلی لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه و مخلوط حاصل به خوبی تکان داده و به مدت ۵ دقیقه در اتاق تاریک انکوبه شد. جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد [24]. در این روش ویتامین C (آسکوربیک اسید) به عنوان استاندارد، استفاده و آزمایشات سه بار تکرار و میانگین آنها گزارش شد. میزان IC_{50} به معنی غلظتی از هر عصاره که لازم است تا ۵۰٪ رادیکال ها پاکسازی شوند، برای عصاره ها تعیین شد. در نهایت درصد به دام اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$DPPH = \left[\frac{A_0 - A_s}{A_s} \right] \times 100 = \text{درصد به دام اندازی رادیکال DPPH}$$

A_0 : جذب کنترل و A_s : جذب عصاره یا استاندارد است.

بررسی قدرت احیا کنندگی: قدرت احیا کنندگی عصاره ها از طریق روش *ین و چن* ارزیابی شد [25]. مقادیر مختلفی از هر عصاره (۸۰۰-۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) در آب با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH برابر با ۶/۶) و ۲/۵ میلی لیتر محلول ۱٪ پتاسیم فری سیانید $[K_3Fe(CN)_6]$ ، مخلوط و در دمای ۵۰°C به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. پس از افزودن ۲/۵ میلی لیتر از محلول ۱۰٪ تری کلرواستیک اسید به عنوان متوقف کننده واکنش، مجموعه به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. فاز فوقانی با آب مقطر و محلول ۰/۱٪ فریک کلراید $(FeCl_3)$ ، مخلوط و بلافاصله جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. آزمایش ها سه بار تکرار و میانگین آنها گزارش شد. افزایش جذب در مخلوط واکنش به مفهوم افزایش قدرت احیا کنندگی (آنتی اکسیدانی) بود و آسکوربیک اسید به عنوان شاهد مثبت برای مقایسه استفاده شد.

ارزیابی میزان شلاته کنندگی آهن II: برای اندازه گیری میزان شلاته کنندگی آهن از روش *دنیز و همکاران* استفاده شد [26]. به ۵ میلی لیتر از هر عصاره (۸۰۰-۵ میکروگرم در میلی لیتر)،

براساس مطالعات فیتوشیمیایی تانن، کومارین و ترکیبات فلاونوئیدی شامل اورینتین، کوثرستین، ایزوکوثرستین، روتین و ویتکسین در گونه های الکمیلا گزارش شده است [12, 13]. مطالعات انجام شده روی گونه های مختلف خانواده رزاسه (Rosaceae) از جمله گونه های مختلف جنس الکمیلا دلالت بر نقش نزدیک به ۱۰۰ گونه در سراسر جهان در طب سنتی از لحاظ خواص دارویی و درمانی نظیر بهبود دیابت، بهبود زخم، درمان تصلب شرایین، آرام بخش، حفظ آب و آماس ناشی از التهاب، اسپاسم عضله، بهبود مشکلات معده ای و اسهال خفیف دارد. همچنین فعالیت بیولوژیک مختلفی مانند فعالیت ضدسرطانی، ضد آنفلوآنزا، ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی برای گونه های مختلف الکمیلا گزارش شده است [14-18]. لذا با توجه به پیشینه مطالعات موجود در این خانواده و نقش تعیین کننده دارویی آنها، در این تحقیق تصمیم گرفته شد تا گونه خاصی از این گروه به نام /الکمیلا پرسیکا که بومی ایران و منطقه گلستانک نور- مازندران است، مورد ارزیابی قرار گیرد. پژوهش حاضر با هدف بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و به دام اندازی رادیکال آزاد عصاره /الکمیلا پرسیکا با روش های پرکولاسیون، پلی فنولیک و اولتراسونیک انجام شد.

مواد و روش ها

در مطالعه تجربی حاضر، گیاه /الکمیلا پرسیکا از منطقه حفاظت شده گلستانک واقع در شهر بلده نور استان مازندران در ارتفاع ۲۷۰۰ متری جمع آوری و توسط متخصص گیاه شناسی شناسایی شد. برای عصاره گیری از سه روش پرکولاسیون، پلی فنولیک و اولتراسونیک، استفاده و برای تهیه عصاره از روش پرکولاسیون، بخش های هوایی گیاه (گل، برگ و ساقه) در سایه و در مجاورت هوا، خشک و سپس پودر شدند. ۴۰ گرم از نمونه پودر شده با متانول ۸۰٪ مخلوط و بعد از یک روز انکوبه شدن، فاز آلی با کاغذ صافی واتمن شماره ۱، جدا و این عمل سه بار تکرار شد. در نهایت، کل عصاره، جمع آوری و از دستگاه تبخیر کننده چرخان برای حلال پراکنی استفاده شد. برای حذف کامل آب و تهیه پودر از فریز درایر MPS-55 Freeze Operon co) کره جنوبی) استفاده شد [19].

در روش عصاره گیری همراه با امواج فراصوت از امواج غیرمستقیم اولتراسونیک با فرکانس ۱۰۰ کیلوهرتز در دمای ۲۵°C به مدت یک ساعت استفاده شد. برای این منظور ۲۵ گرم از نمونه پودر شده با ۲۰۰ میلی لیتر متانول ۸۰٪ به مدت یک ساعت در حمام اولتراسونیک قرار گرفت. هر ۲۰ دقیقه حلال، عوض و این عمل سه بار تکرار شد. در نهایت کل عصاره، جمع آوری شده و از دستگاه تبخیر کننده چرخان برای حلال پراکنی و برای حذف کامل آب و تهیه پودر از فریز درایر استفاده شد [20].

در روش استخراج پلی فنولیک، ابتدا مقدار ۴۰ گرم از نمونه پودر شده با ۲۵۰ میلی لیتر حلال (متانول، استن و آب) به ترتیب با نسبت های ۳/۵، ۳/۵ و ۳ حاوی فرمیک اسید ۱٪ مخلوط شد. نمونه به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت و سپس صاف شد. حلال پراکنی با استفاده از دستگاه تبخیر کننده چرخان و با تنظیم دمای ۳۵ تا ۴۰°C انجام شد. در این صورت با توجه به دمای تنظیم شده، استن و متانول حذف می شوند. سپس ماده از دستگاه، جدا و محتویات آن داخل یک قیف جدا کننده، ریخته و طی دو مرحله و در هر مرحله ۵۰ میلی لیتر پترولیوم اتر اضافه شد. این عمل برای جدا کردن پیگمان ها، استفاده شد و پس از آن فاز اتری رویی جدا و به فاز آبی باقیمانده طی سه مرحله اتیل استات (۱:۱)، اضافه شده و در پایان اتیل استات، حلال پراکنی و در نهایت فریز و خشک شد [21].

۰/۱ میلی لیتر محلول ۲ میلی مولار کلرید آهن II و یک میلی لیتر محلول ۵ میلی مولار فروزین، اضافه و پس از ۱۰ دقیقه انکوبه شدن در دمای محیط جذب محلول در طول موج ۵۶۲ نانومتر قرائت شد. اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) به عنوان کنترل مثبت به کار رفت و فعالیت شلاته کنندگی آهن بر حسب اکی والان دی سدیم اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (Na₂EDTA) در گرم عصاره، بیان و درصد مهار تشکیل کمپلکس آهن- فروزین با کمک فرمول ذکر شده در محاسبه فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد تعیین شد.

ارزیابی میزان به دام اندازی نیتریک اکساید: این روش بر این مبنا استوار بوده است که سدیم نیتروپروساید در محلول های آبی در pH فیزیولوژیک به آهستگی نیتریک اکساید تولید می کند که با اکسیژن محیط وارد عمل می شود و یون نیتريت را تولید می نماید. یون نیتريت تولید شده در حضور واکنشگر گریس مورد سنجش قرار می گیرد. به دام اندازی نیتریک اکساید در رقابت با اکسیژن موجب کاهش تولید یون نیتريت خواهد شد. به این منظور سدیم نیتروپروساید (۱۰ میلی مولار) در بافر فسفات با غلظت های مختلفی از عصاره که جدا گانه در آب حل شده بودند، مخلوط شد. مجموعه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق، انکوبه و همان مخلوط واکنش بدون عصاره //کمپلا پرسیکا (اما مقادیر هم حجم آب مقطر) به عنوان کنترل به کار گرفته شد. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، ۰/۵ میلی لیتر واکنشگر گریس (شامل سولفانیل آمید ۱٪، نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید ۰/۱٪ در اسید فسفریک ۲٪) اضافه شد [27]. جذب مخلوط در ۵۴۶ نانومتر در مقابل کنترل، قرائت و کوئرتستین به عنوان استاندارد برای مقایسه به کار گرفته شد. میانگین درصد به دام اندازی هم طبق فرمول محاسبه فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد، تعیین و براساس آن IC₅₀ برای تمامی عصاره ها بیان شد.

داده ها با نرم افزار SPSS 22 از طریق آزمون تحلیل واریانس یک طرفه برای مقایسه کلی، آزمون تعقیبی توکی برای بررسی تفاوت بین گروه ها و تفاوت قدرت احیا کنندگی بین گروه ها و آزمون تحلیل واریانس با اندازه گیری تکراری برای بررسی قدرت احیا کنندگی تحلیل شدند. مقادیر IC₅₀ از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت های مربوطه به دست آمد.

یافته ها

درصد بازده عصاره های بخش هوایی گیاه //کمپلا پرسیکا با سه روش پرکولاسیون، پلی فنولیک و اولتراسونیک متفاوت بود، به طوری که از ۴۰ گرم وزن خشک گیاه //کمپلا پرسیکا پس از عصاره گیری به روش پرکولاسیون، مقدار ۸/۵ گرم عصاره با بازده ۲۱/۲۵٪ به دست آمد. در روش پلی فنولیک از ۴۰ گرم وزن خشک گیاه، مقدار ۰/۶۸ گرم عصاره با بازده ۱/۷٪ و در روش اولتراسونیک از ۲۵ گرم وزن خشک گیاه، مقدار ۴/۱۳ گرم عصاره با بازده ۱۶٪ به دست آمد.

محتوای فنول و فلاونوئید تام عصاره ها: محتوای تام فنولی با متد فولین سیوکالتیو براساس معادله خط منحنی استاندارد گالیک اسید به صورت $Y=0.0054X+0.0583$, $R^2=0.999$ محاسبه شد. محتوای تام فنولی برای عصاره متانولی حاصل از روش های پلی فنولیک، اولتراسونیک و پرکولاسیون تفاوت معنی داری داشت (p=۰/۰۱۹). بیشترین محتوای فنولی تام برای روش پرکولاسیون مشاهده شد که با روش پلی فنولیک اختلاف معنی داری نشان داد

(p=۰/۰۱۷). بین روش اولتراسونیک و پلی فنولیک اختلاف معنی داری مشاهده نشد (p=۰/۱۲۸؛ جدول ۱). محتوای فلاونوئید تام نمونه ها با معادله خط استاندارد کوئرتستین به صورت $Y=0.0064X-0.0076$, $R^2=0.999$ محاسبه شد. محتوای تام فلاونوئید موجود در عصاره متانولی حاصل از روش های پلی فنولیک، اولتراسونیک و پرکولاسیون تفاوت معنی داری داشتند (p=۰/۰۰۹). بیشترین محتوای فلاونوئید تام برای روش پرکولاسیون مشاهده شد که با روش پلی فنولیک اختلاف معنی داری نشان داد (p=۰/۰۱۸). بین روش اولتراسونیک و روش پرکولاسیون اختلاف معنی داری وجود داشت (p=۰/۰۱۰)، در صورتی که بین روش اولتراسونیک و روش پلی فنولیک اختلاف معنی داری مشاهده نشد (p=۰/۴۱۵؛ جدول ۱).

فعالیت به دام اندازی رادیکال DPPH: فعالیت به دام اندازی رادیکال DPPH در تمام عصاره ها با افزایش غلظت، افزایش یافت، به طوری که در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر درصد مهار برای عصاره های پرکولاسیون، اولتراسونیک و پلی فنولیک به ترتیب ۸۱/۹±۱/۰۲، ۷۹/۲۸±۱/۸۲ و ۸۷/۹۱±۱/۶۱ بود (نمودار ۱). فعالیت به دام اندازی رادیکال DPPH بین تمامی روش های استخراج و همچنین استاندارد تفاوت معنی داری داشت (p<۰/۰۰۱). عصاره به دست آمده از روش پرکولاسیون تفاوت معنی داری با روش پلی فنولیک نشان داد (p=۰/۰۰۱؛ جدول ۱)، اما با اولتراسونیک تفاوت معنی داری نداشت (p=۰/۲۹۹). عصاره حاصل از روش پلی فنولیک تفاوت معنی داری با روش پرکولاسیون و اولتراسونیک داشت (p=۰/۰۰۱). عصاره حاصل از روش های پلی فنولیک، فعالیت به دام اندازی رادیکال DPPH بیشتری از عصاره های حاصل از اولتراسونیک و پرکولاسیون داشت (نمودار ۱).

سنجش میزان شلاته کنندگی آهن II: عصاره متانولی بخش های هوایی گیاه //کمپلا پرسیکا دارای قابلیت اتصال به آهن بود. با افزایش غلظت عصاره، درصد مهار بیشتر شد، به طوری که در غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر درصد شلاته کنندگی عصاره های پرکولاسیون، اولتراسونیک و پلی فنولیک به ترتیب ۵۷/۸۵±۲/۵۰، ۶۴/۴۳±۱/۱۰ و ۷۰/۷۸±۱/۸۹ بود. میزان شلاته کنندگی بین تمامی روش ها و همچنین استاندارد تفاوت معنی داری داشت (p<۰/۰۰۱). میزان IC₅₀ عصاره روش پلی فنولیک نسبت به عصاره های اولتراسونیک و پرکولاسیون دارای قدرت شلاته کنندگی بیشتری بود و اختلاف معنی داری وجود داشت (p=۰/۰۰۱)، در حالی که با استاندارد EDTA اختلاف معنی داری نداشت (p=۰/۲۱۱). همچنین تفاوت معنی داری بین عصاره حاصل از استخراج روش های پرکولاسیون با اولتراسونیک مشاهده شد (p=۰/۰۰۱؛ جدول ۱).

فعالیت به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید: همه عصاره ها در مسیر وابسته به غلظت، فعالیت به دام اندازی نیتریک اکساید نشان دادند، به طوری که با افزایش غلظت عصاره ها، درصد مهار بیشتر شد. فعالیت به دام اندازی نیتریک اکساید بین تمامی روش ها و همچنین استاندارد تفاوت معنی داری داشت (p<۰/۰۰۱). میزان IC₅₀ عصاره روش اولتراسونیک نسبت به عصاره های پلی فنولیک و پرکولاسیون تفاوت معنی داری را نشان داد (p=۰/۰۰۱؛ جدول ۱). عصاره پرکولاسیون تفاوت معنی داری با عصاره پلی فنولیک (p=۰/۱۶۰) و استاندارد کوئرتستین (p=۰/۲۰۲) نشان نداد. عصاره متانولی بخش های هوایی گیاه //کمپلا پرسیکا حاصل از روش های پلی فنولیک، اولتراسونیک و پرکولاسیون فعالیت به دام اندازی و مهار رادیکال نیتریک اکساید داشتند. عصاره حاصل از روش

پرکولاسیون تفاوت معنی داری را نشان داد ($p=0/001$; جدول ۱). عصاره پرکولاسیون تفاوت معنی داری با عصاره پلی فنولیک ($p=0/160$) و استاندارد کوئرستین ($p=0/202$) نشان نداد. عصاره متانولی بخش های هوایی گیاه /کمبلا پرسیکا حاصل از روش های پلی فنولیک، اولتراسونیک و پرکولاسیون فعالیت بهدام اندازی و مهار رادیکال نیتریک اکساید داشتند. عصاره حاصل از روش پلی فنولیک فعالیت بهدام اندازی رادیکال نیتریک اکساید بیشتری از عصاره های حاصل از اولتراسونیک و پرکولاسیون نشان داد. در مجموع عصاره ها فعالیت ضعیفی در بهدام اندازی رادیکال نیتریک اکساید بین غلظت ۰/۱ تا ۱/۶ میلی گرم بر میلی لیتر نشان دادند (جدول ۱).

مقادیر IC_{50} آزمون DPPH برای ویتامین C برابر $5/12 \pm 0/5$ میکروگرم بر میلی لیتر، مقادیر IC_{50} آزمون شلاته کنندگی برای EDTA برابر $14/2 \pm 6/3$ میکروگرم بر میلی لیتر و مقادیر IC_{50} آزمون بهدام اندازی رادیکال نیتریک اکساید برای کوئرستین برابر $0/17 \pm 0/005$ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

قدرت احیا کنندگی عصاره ها: در بررسی قدرت احیا کنندگی، جذب نور با قدرت احیا کنندگی رابطه مستقیمی داشت. بین قدرت احیا کنندگی تمامی روش ها و همچنین استاندارد تفاوت معنی داری وجود داشت ($p<0/001$). قدرت احیا کنندگی تمام عصاره ها با افزایش غلظت زیاد شد، به طوری که عصاره پلی فنولیک نسبت به سایر عصاره ها جذب بیشتری داشت، یعنی با افزایش غلظت قدرت احیا کنندگی بیشتر شد و تفاوت معنی داری با بقیه روش ها نشان داد ($p=0/001$). همچنین تفاوت معنی داری بین عصاره حاصل از استخراج روش های پرکولاسیون با اولتراسونیک مشاهده نشد ($p=0/996$; نمودار ۲).

پلی فنولیک فعالیت بهدام اندازی رادیکال نیتریک اکساید بیشتری از عصاره های حاصل از اولتراسونیک و پرکولاسیون نشان داد. در مجموع عصاره ها فعالیت ضعیفی در بهدام اندازی رادیکال نیتریک اکساید بین غلظت ۰/۱ تا ۱/۶ میلی گرم بر میلی لیتر نشان دادند (جدول ۱).

مقادیر IC_{50} آزمون DPPH برای ویتامین C برابر $5/12 \pm 0/5$ میکروگرم بر میلی لیتر، مقادیر IC_{50} آزمون شلاته کنندگی برای EDTA برابر $14/2 \pm 6/3$ میکروگرم بر میلی لیتر و مقادیر IC_{50} آزمون بهدام اندازی رادیکال نیتریک اکساید برای کوئرستین برابر $0/17 \pm 0/005$ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

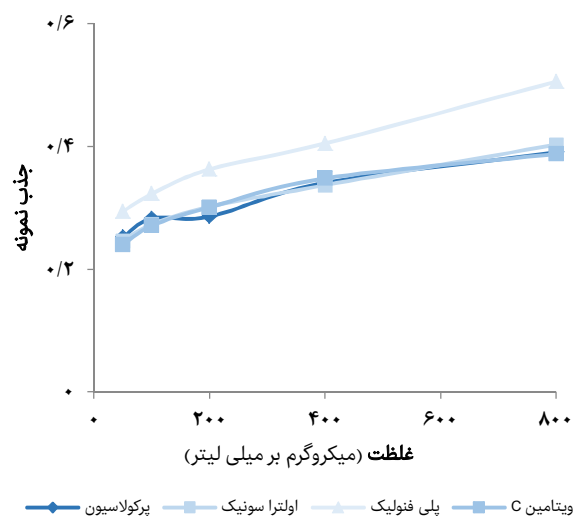
قدرت احیا کنندگی عصاره ها: در بررسی قدرت احیا کنندگی، جذب نور با قدرت احیا کنندگی رابطه مستقیمی داشت. بین قدرت احیا کنندگی تمامی روش ها و همچنین استاندارد تفاوت معنی داری وجود داشت ($p<0/001$). قدرت احیا کنندگی تمام عصاره ها با افزایش غلظت زیاد شد، به طوری که عصاره پلی فنولیک نسبت به سایر عصاره ها جذب بیشتری داشت، یعنی با افزایش غلظت قدرت احیا کنندگی بیشتر شد و تفاوت معنی داری با بقیه روش ها نشان داد ($p=0/001$). همچنین تفاوت معنی داری بین عصاره حاصل از استخراج روش های پرکولاسیون با اولتراسونیک مشاهده نشد ($p=0/996$; نمودار ۲).

فعالیت بهدام اندازی رادیکال نیتریک اکساید: همه عصاره ها در مسیر وابسته به غلظت، فعالیت بهدام اندازی نیتریک اکساید نشان دادند، به طوری که با افزایش غلظت عصاره ها، درصد مهار بیشتر شد. فعالیت بهدام اندازی نیتریک اکساید بین تمامی روش ها و همچنین استاندارد تفاوت معنی داری داشت ($p<0/001$). میزان IC_{50} عصاره روش اولتراسونیک نسبت به عصاره های پلی فنولیک و

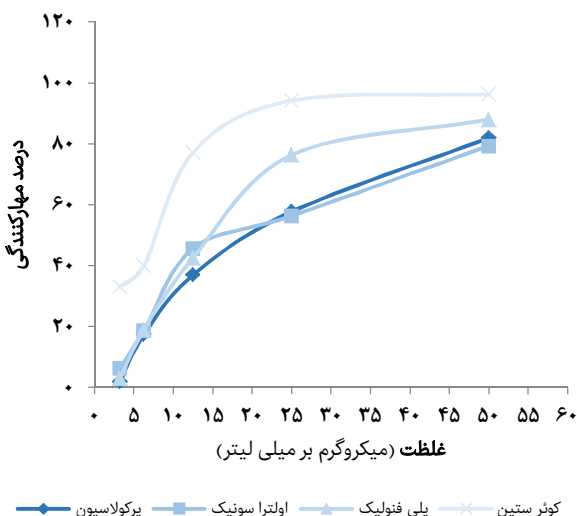
جدول ۱ بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی، محتوای فنولی و فلاونوئیدی تام عصاره های مختلف بخش هوایی گیاه /کمبلا پرسیکا با روش های پلی فنولیک، اولتراسونیک، پرکولاسیون و استاندارد

فعالیت	پلی فنولیک	اولتراسونیک	پرکولاسیون	استاندارد
فعالیت بهدام اندازی DPPH (IC_{50} : میکروگرم بر میلی لیتر)	$14/22 \pm 0/32^b$	$17/0 \pm 4/65^c$	$18/0 \pm 1/18^c$	$5/0 \pm 0/12^a$
میزان شلاته کنندگی آهن (IC_{50} : میکروگرم بر میلی لیتر)	$50/71 \pm 5/63^a$	$572/55 \pm 26/70^b$	$689/43 \pm 18/83^c$	$14/2 \pm 6/3^a$
فعالیت بهدام اندازی رادیکال NO (IC_{50} : میکروگرم بر میلی لیتر)	$0/02 \pm 0/001^a$	$3/19 \pm 0/32^b$	$0/51 \pm 0/03^a$	$0/017 \pm 0/0005^a$
فنل تام (میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره)	$286/26 \pm 2/06^a$	$310/68 \pm 8/33^{ab}$	$340/31 \pm 6/11^b$	-
فلاونوئید تام (میلی گرم کوئرستین اسید در گرم عصاره)	$12/48 \pm 0/32^a$	$11/0 \pm 8/9/08^a$	$15/0 \pm 25/47^b$	-

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار است



نمودار ۲ مقایسه قدرت احیا کنندگی عصاره های پرکولاسیون، اولتراسونیک و پلی فنولیک بخش های هوایی گیاه /کمبلا پرسیکا



نمودار ۱ مقایسه قدرت بهدام اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره های پرکولاسیون، اولتراسونیک و پلی فنولیک گیاه /کمبلا پرسیکا

هدف پژوهش حاضر، بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و به دام اندازی رادیکال آزاد عصاره *الکمیلا پرسیکا* با روش های پرکولاسیون، پلی فنولیک و اولتراسونیک بود. فنول ها و پلی فنول ها به طور گسترده در بسیاری از مواد غذایی با ریشه گیاهی یافت می شوند و خاصیت آنتی اکسیدانی این مواد به گروه های آروماتیک و هیدروکسیل فراوان موجود در ساختارشان نسبت داده می شود. مطالعات نشان داده که مصرف غذاها و نوشیدنی های غنی از محتوای فنولی با کاهش خطر ابتلا به تصلب شرایین و بیماری های قلبی- عروقی در ارتباط بوده است [28]. نتایج حاصل از تاثیر روش های مختلف استخراج بر میزان محتوای فنول تام در این تحقیق نشان داد که عصاره پرکولاسیون با میانگین $340/31 \pm 6/1$ و پلی فنولیک با میانگین $286/26 \pm 2/06$ میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره به ترتیب بیشترین و کمترین میزان محتوای فنول تام را داشتند. مطالعه *مزدستان* و همکاران نشان داده است که در عصاره برگ گیاه مورد (*Myrtus communis*) بالاترین میزان فنولی تام، مربوط به روش سوکسیله و کمترین آن مربوط به روش اولتراسونیک بود [29] که مطالعه حاضر با آن همخوانی نداشت.

فلاونوئیدها بزرگترین دسته پلی فنول ها هستند که به طور گسترده در رژیم غذایی انسان وجود دارند و ارتباط معکوسی بین جذب فلاونوئیدها و رژیم غذایی و خطر بیماری قلبی- عروقی وجود داشته است. بیشترین میزان محتوای فلاونوئید عصاره های متانولی اندام هوایی *الکمیلا پرسیکا* به ترتیب با روش پرکولاسیون، پلی فنول و اولتراسونیک به دست آمد. مطالعه عصاره برگ و گل گیاه خون فام (*Lythrum salicaria*) نشان داده که محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی عصاره پلی فنولیک بیشتر از عصاره اولتراسونیک و پرکولاسیون بوده است [30]، در صورتی که در مطالعه حاضر بیشترین و کمترین میزان فلاونوئید به ترتیب مربوط به پرکولاسیون و اولتراسونیک بود. با توجه به میزان فنول در عصاره گیاه *الکمیلا پرسیکا* به نظر می رسد که میزان فنول ارتباط بیشتری با فعالیت آنتی اکسیدانی در زمینه اهدای هیدروژن یا اهدای الکترون دارد. بنابراین میزان فنول تام در این تحقیق می تواند فعالیت آنتی اکسیدانی موجود در عصاره های اندام هوایی این گیاه را توجیه کند. وجود ترکیبات فنولیک همانند فلاونوئیدها، فنولیک اسید و تانن ها در عصاره اندام هوایی گیاهان جنس *الکمیلا* مانند *الکمیلا مولیس* (*Alchemilla mollis*) و برگ گوشته (*Alchemilla vulgaris*) و نقش آنتی اکسیدانی آنها تاییدکننده پتانسیل بالای این جنس در فعالیت آنتی اکسیدانی بوده است [31, 32]. مدل به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH یک روش سریع، آسان و دقیق برای تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های گیاهی بوده است [33]. DPPH یک رادیکال آزاد با اتم مرکزی نیتروژن است که با احیاء شدن و تولید مولکول پایدار از ارغوانی به زرد تغییر رنگ می دهد. DPPH در 517 نانومتر جذب دارد و به علت داشتن الکترون منفرد، دارای رنگ ارغوانی است و قدرت آنتی اکسیدانی آن به درصد کاهش رنگ ارغوانی به رنگ زرد بستگی دارد. هر چه تعداد گروه های هیدروکسیل حلقه فنیل آنتی اکسیدان بیشتر باشد، تعداد اتم هیدروژن بیشتری برای واکنش با رادیکال DPPH و پایدار کردن آن وجود دارد [34]. همان طور که در جدول ۱ مشاهده شد، همه عصاره ها فعالیت آنتی اکسیدانی خوبی در به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH نشان دادند. در مقایسه، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های متانولی و کنترل مثبت کوئرستین به ترتیب در کوئرستین، پلی فنول، اولتراسونیک و پرکولاسیون بیشتر

بود. در این تحقیق مشخص شد که فعالیت به دام اندازی رادیکال DPPH در استاندارد و عصاره ها با بیشتر شدن غلظت، افزایش و رنگ نمونه کاهش یافت. بر پایه نتایج، عصاره حاصل از پلی فنول فعالیت بیشتری از عصاره حاصل از اولتراسونیک و پرکولاسیون از خود نشان داد. بنابراین فعالیت به دام اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره ها ممکن است به توانایی دهندگی هیدروژن نسبت داده شود که نشان دهنده نقش فنول و فلاونوئید در عصاره ها است. مطالعه *ترنزا فیلووا* و همکاران روی فراکشن اتیل استات *الکمیلا مولیس* نشان داده است که توانایی به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH خوبی دارند. مقدار IC_{50} فراکشن اتیل استات *الکمیلا مولیس* برابر $9/8 \pm 1/8$ میکروگرم در میلی لیتر به دست آمده است [17] که نسبت به عصاره متانولی روش های پرکولاسیون، اولتراسونیک و پلی فنولیک این تحقیق کمتر بود.

در اندازه گیری قدرت شلاته کنندگی آهن II شناساگر موجود در این واکنش، فروزین با آهن II موجود در محیط، کمپلکس قرمز رنگی تشکیل می دهد. غلظت آهن محیط در حضور عوامل شلات دهنده کاهش می یابد و رنگ قرمز کمپلکس آهن- فروزین کم می شود. در این روش EDTA و عصاره ها دارای اثر شلاته کنندگی هستند و آهن را قبل از تشکیل کمپلکس رنگی با فروزین شلاته می کنند و جذب کمپلکس آهن- فروزین به صورت وابسته به دوز کاهش می یابد. در این پژوهش تمامی عصاره ها توانایی شلاته کنندگی نسبتاً ضعیفی در مقایسه با استاندارد از خود نشان دادند. فعالیت شلاته کنندگی استاندارد و عصاره ها با افزایش غلظت، افزایش و نیز رنگ نمونه کاهش یافت. توانایی شلاته کنندگی عصاره های متانولی و کنترل مثبت EDTA به ترتیب در EDTA، پلی فنول، اولتراسونیک و پرکولاسیون بود. بر پایه این نتایج، عصاره حاصل از پلی فنول فعالیت بیشتری از عصاره حاصل از اولتراسونیک و پرکولاسیون از خود نشان داد. در مجموع قدرت شلاته کنندگی قوی از این سه عصاره مشاهده نشد. علی رغم این که از میزان فنول و فلاونوئید مناسبی برخوردار بودند، نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید در استاندارد کوئرستین و عصاره ها با افزایش غلظت افزایش یافت، نیتريت کمتری تولید شد و رنگ نمونه کاهش یافت. درصد مهار رادیکال نیتریک اکساید بین تمامی روش های استخراج و همچنین استاندارد در غلظت $0/2$ میلی گرم بر میلی لیتر تفاوت معنی داری داشت، به طوری که در غلظت $0/2$ میلی گرم بر میلی لیتر استاندارد کوئرستین ($85/62 \pm 0/57$) تفاوت معنی داری نسبت به عصاره های پرکولاسیون، اولتراسونیک و پلی فنولیک به ترتیب $37/45 \pm 0/91$ ، $46/11 \pm 2/83$ و $25/08 \pm 2/41$ نشان داد. همچنین تفاوت معنی داری بین عصاره های پرکولاسیون و اولتراسونیک مشاهده نشد، در صورتی که عصاره پلی فنولیک تفاوت معنی داری با عصاره های پرکولاسیون و اولتراسونیک نشان داد. در مقایسه فعالیت به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید عصاره های متانولی و کنترل مثبت کوئرستین به ترتیب پلی فنولیک، پرکولاسیون و اولتراسونیک قرار داشتند. بر پایه نتایج، عصاره حاصل از پلی فنول، فعالیت به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید بیشتری از عصاره حاصل از اولتراسونیک و پرکولاسیون داشت. فعالیت به دام اندازی نیتریک اکساید به وسیله ترکیبات فلاونوئیدی و دی ترپن توسط *هاجو* و همکاران مورد تایید قرار گرفته است [35].

قدرت احیا کنندگی به عنوان شاخصی در تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاهان دارویی به کار می رود. در این پژوهش، قدرت احیا کنندگی تمامی عصاره ها تفاوت معنی داری در مقایسه با

در کنار حلال های قطبی است، به این علت که شاید ترکیبات دیگری در گیاه وجود دارد که در فاز قطبی جدا نشده باشد.

نتیجه گیری

عصاره های پلی فنولیک بیشترین فعالیت را در به دام اندازی رادیکال DPPH، به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید، قدرت احیایی و توانایی شلاته کنندگی آهن در مقایسه با اولتراسونیک و پرکولاسیون دارند. بخش های هوایی گیاه /کمپلا پرسیکا دارای مقادیر بالایی از ترکیبات طبیعی آنتی اکسیدانی از جمله فنول و فلاونوئید است.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از جناب آقای دکتر بهمن /اسلامی که در جمع آوری و شناسایی نمونه، دکتر طر/وتی که در تجزیه و تحلیل آماری و همچنین کارشناس آزمایشگاه، خانم عظیمی که در کارهای آزمایشگاهی ما را یاری نمودند، نهایت تشکر به عمل می آید.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشد است.

تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

سهم نویسندگان: باقر سیدعلی پور (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ زهرا دادویی (نویسنده دوم)، پژوهشگر اصلی (۳۰٪)؛ محمدعلی ابراهیم زاده (نویسنده سوم)، روش شناس/نگارنده بحث (۳۰٪)

منابع مالی: این پژوهش تحت حمایت مالی سازمان یا نهادی نبوده است.

منابع

- 1- Takabe W, Niki E, Uchida K, Yamada S, Satoh K, Noguchi N. Oxidative stress promotes the development of transformation: Involvement of a potent mutagenic lipid peroxidation product, acrolein. *Carcinogenesis*. 2001;22(6):935-41.
- 2- Lamina S, Ezema CI, Theresa AI, Anthonia EU. Effects of free radicals and antioxidants on exercise performance. *Oxid Antioxid Med Sci*. 2013;2(2):83-91.
- 3- Bovicelli P. Radical-scavenging polyphenols: New strategies for their synthesis. *J Pharm Pharmacol*. 2007;59(12):1703-10.
- 4- Ordoñez AAL, Gomez JD, Vattuone MA, Isla MI. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chem*. 2006;97(3):452-8.
- 5- Kumaran A, Joel karunakaran R. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem*. 2006;97(1):109-14.
- 6- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, et al. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med*. 2002;113(Suppl 9B):71S-88.
- 7- Di Matteo V, Esposito E. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2003;2(2):95-107.
- 8- Zolfaghari B, Yekdaneh A. Recent advances in extraction methods of medicinal plant components. *J Herb Drugs*. 2010;1(1):51-5. [Persian]
- 9- Wang J, Sun B, Cao Y, Tian Y, Li X. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem*. 2008;106(2):804-10.

استاندارد نشان داد. عصاره ها در غلظت ۸۰۰-۵۰ میکروگرم در میلی لیتر قدرت احیا کنندگی نسبتاً خوبی را نشان دادند، به طوری که میزان جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر و در بالاترین غلظت یعنی ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به ترتیب برای عصاره های پرکولاسیون، اولتراسونیک و پلی فنولیک ۰/۳۹۲±۰/۰۰۶، ۰/۴۰۳±۰/۰۰۸ و ۰/۵۰۶±۰/۰۱ به دست آمد. نتایج این تحقیق نشان داد قدرت احیا کنندگی استاندارد و تمامی عصاره ها با افزایش غلظت افزایش یافت. قدرت احیا کنندگی عصاره های متانولی و کنترل مثبت آسکوربیک اسید به ترتیب در پلی فنولیک، اولتراسونیک، پرکولاسیون و آسکوربیک اسید بود. از آنجایی که قابلیت احیا کنندگی عصاره پلی فنولیک نسبت به سایر عصاره ها قوی تر بود و حتی در مقایسه با آسکوربیک اسید میزان احیا کنندگی بیشتری را نشان داد، می توان نتیجه گرفت که عصاره پلی فنولیک با کمک اهدای الکترون موجب ختم واکنش های زنجیره ای می شود.

کای و همکاران ارتباط خطی بین فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای فنول تام را در بسیاری از گیاهان گزارش کرده اند، در حالی که این ارتباط خطی در مطالعه حاضر و برخی از مطالعات دیگر مشاهده نشد [36]. مطالعات ه و همکاران نشان داده است که روش استخراج اولتراسونیک باعث استخراج با کیفیت بهتر و زمان کوتاه تر در مقایسه با روش سنتی می شود [37]. مطالعات روی گیاه هیوسایاموس /اسکوروسوس (*Hyoscyamus squarrosus*) نشان داده است که عصاره اولتراسونیک در به دام اندازی رادیکال DPPH و به دام اندازی نیتریک اکساید بهتر از ماسیراسیون عمل می کند [38]. مطالعات جمشیدی و همکاران روی برگ و قسمت های هوایی گیاه لیتروم سالیکاریا (*Lythrum salicaria*) با سه روش مختلف نشان داده که به دام اندازی رادیکال DPPH و نیتریک اکساید عصاره پلی فنولیک بیشتر از عصاره اولتراسونیک و پرکولاسیون بوده و همچنین قدرت احیا کنندگی پلی فنولیک بیشتر از آسکوربیک اسید گزارش شده است [30] که نتایج پژوهش حاضر با آن همخوانی داشت. مطالعه ای دیگر با هدف بررسی تاثیر روش های مختلف استخراج در فعالیت آنتی اکسیدانی، روی برگ و میوه خربزه کوکومیس ملو (*Cucumis melo*) نشان داده است که عصاره سوکسیله بیشترین میزان فنول و فلاونوئید و همچنین فعالیت به دام اندازی رادیکال DPPH و نیتریک اکساید بیشتری از عصاره های دیگر دارد [39]. نتایج پژوهش نشان داد که عصاره های مختلف بخش هوایی این گیاه در تمامی مدل های مورد مطالعه، سطوح مختلفی از فعالیت آنتی اکسیدانی را از خود نشان دادند. مطالعات تکمیلی در مورد شناسایی، جداسازی و بررسی ترکیبات موثره این گیاه می تواند زمینه احتمالی استفاده از این گیاه را در مورد فعالیت های دارویی برای درمان بیماری ها فراهم کند.

از محدودیت های مطالعه حاضر می توان به این نکته اشاره کرد که به لحاظ تنوع جغرافیایی و اقلیمی گونه های گیاهی در فلور ایران و تاثیر فرآیندهای مختلف و حتی شرایط محیطی مختلف، محل رویش آزمایش های کمی و کیفی مواد موثره این گیاه ضروری است و اصلاح و جدا کردن این دسته از گیاهان، کاری پرهزینه و وقت گیر و تشخیص مواد موثره گیاهان دارویی کاری بسیار مشکل است. بنابراین از روی فرآیندهای متابولیک پیچیده درون گیاه نمی توان سریعاً در مورد ویژگی های مواد موثره نظرات جامع و کاملی ارائه نمود. از جمله پیشنهادات این تحقیق، شناسایی، جداسازی ترکیبات موثره و بررسی اثرات آنتی اکسیدانی ترکیبات موثره در شرایط "محیط زنده" (in vivo) و همچنین به کاربردن روش های پیشرفته دیگر استخراج و استفاده از حلال های غیرقطبی

- extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem.* 1995;43(1):27-32.
- 26- Dinis TC, Maderia VM, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys.* 1994;315(1):161-9.
- 27- Sreejayan, Rao MN. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol.* 1997;49(1):105-7.
- 28- Manach C, Mazur A, Scalbert A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16(1):77-84.
- 29- Mozdastan S, Ebrahimzadeh MA, Khalili M. Comparing the impact of different extraction methods on antioxidant activities of myrtle (*Myrtus communis* L.). *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2015;25(127):10-24. [Persian]
- 30- Jamshidi M, Shabani E, Hashemi Z, Ebrahimzadeh MA. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from leaf and aerial parts of *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae). *Int Food Res J.* 2014;21(2):783-8.
- 31- Ertürk S, Şeker Karatoprak G, Koşar M. Antioxidant properties and phenolic composition of *alchemilla mollis* from Turkey. *Planta Medica.* 2011;77(12):PL45.
- 32- Jonadet M, Meunier MT, Villie F, Bastide JP, Lamaison JL. Flavonoids extracted from *Ribes nigrum* L. and *Alchemilla vulgaris* L.: 1. In vitro inhibitory activities on elastase, trypsin and chymotrypsin. 2. Angioprotective activities compared in vivo. *J Pharmacol.* 1986;17(1):21-7. [French]
- 33- Singh S, Singh RP. In vitro methods of assay of antioxidants: An overview. *Food Rev Int.* 2008;24(4):392-415.
- 34- Torres De Pinedo A, Peñalver P, Morales JC. Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure-activity relationship. *Food Chem.* 2007;103(1):55-61.
- 35- Hajdú Z, Hohmann J, Forgo P, Martinek T, Dervarics M, Zupkó I, et al. Diterpenoids and flavonoids from the fruits of *Vitex agnus-castus* and antioxidant activity of the fruit extracts and their constituents. *Phytother Res.* 2007;21(4):391-4.
- 36- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 2004;74(17):2157-84.
- 37- He Ch, Ji X, Pan Y, Wang H, Wang K, Liang M, et al. Antioxidant activity of alcoholic extract of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Med Chem Res.* 2010;19(5):448-61.
- 38- Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B. Free radical scavenging ability of methanolic extract of *Hyoscyamus squarrosus* leaves. *Pharmacologyonline.* 2009;2:796-802.
- 39- Forouzani M, Askari M, Ebrahimzadeh MA. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from *Cucumis melo* L. fruit and leaves. *Int J For Soil Eros.* 2013;3(3):95-9.
- 10- Yang B, Zhao M, Shi J, Yang N, Jiang Y. Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp. *Food Chem.* 2008;106(2):685-90.
- 11- Beygom Faghir M, Mehrmanesh A, Attar F. Leaf and petiole anatomical characters of the genus *Alchemilla* (Rosaceae) in Iran and their use in Numerical analysis. *Taxon Biosyst.* 2016;8(28):1-20
- 12- Kaya B, Menemen Y, Saltan FZ. Flavonoid compounds identified in *Alchemilla* L. species collected in the North-eastern Black Sea region of Turkey. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2012;9(3):418-25.
- 13- Schimmer O, Eschelbach H. Esculetin in *Alchemilla speciosa*: Identification and antimutagenic properties. *Pharmazie.* 1997;52(6):476-8.
- 14- Türk M, Kaya B, Menemen Y, Oğuztüzün S. Apoptotic and necrotic effects of plant extracts belonging to the genus *Alchemilla* L. species on HeLa cells in vitro. *J Med Plants Res.* 2011;5(18):4566-71.
- 15- Grytsyk LM, Tuchak NI, Stasiv TG, Grytsyk AR. Amino acid composition of the *Alchemilla* L. genus plants and *Nepeta cataria* L. *Pharm Innov Int J.* 2013;2(4):50-3.
- 16- Shrivastava R, Cucuat N, John GW. Effects of *Alchemilla vulgaris* and glycerine on epithelial and myofibroblast cell growth and cutaneous lesion healing in rats. *Phytother Res.* 2007;21(4):369-73.
- 17- Trendafilova A, Todorova M, Nikolova M, Gavrilova A, Vitkova A. Flavonoid constituents and free radical scavenging activity of *Alchemilla mollis*. *Nat Prod Commun.* 2011;6(12):1851-4.
- 18- Makau JN, Watanabe K, Kobayashi N. Anti-influenza activity of *Alchemilla mollis* extract: Possible virucidal activity against influenza virus particles. *Drug Discov Ther.* 2013;7(5):189-95.
- 19- Koleva II, Van Beek TA, Linssen JP, De Groot A, Evstatieva LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal.* 2002;13(1):8-17.
- 20- Rabiei Kh, Bekhradnia S, Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity of polyphenol and ultrasonic extracts from fruits of *Crataegus pentagyna* subsp. *elburensis*. *Nat Prod Res.* 2012;26(24):2353-7.
- 21- Sun J, Yao J, Huang S, Long X, Wang J, García-García E. Antioxidant activity of polyphenol and anthocyanin extracts from fruits of *Kadsura coccinea* (Lem.) A.C. Smith. *Food Chem.* 2009;117(2):276-81.
- 22- McDonald S, Prenzler PD, Autolovich M, Robards K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chem.* 2001;73(1):73-84.
- 23- Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal.* 2002;10(3):178-82.
- 24- Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Hafezi S. Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turk J Biol.* 2008;32:43-9.
- 25- Yen G, Chen H. Antioxidant activity of various tea