

خاصیت آنتی‌اکسیدانی، فنول کل و ترکیبات پلی فنولی عصاره متانولی دو اکوتیپ مختلف آویشن شیرازی

زینب میرزاده آبگرمی^{۱*}، مهدی احمدیوسفی^۲

۱- کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، کارشناس حفظ نباتات مدیریت جهاد کشاورزی شهرستان ارزوئیه

۲- دکتری فیزیولوژی گیاهان زراعی، پژوهشگاه جهرم

Z.mirzadehabgarmi@gmail.com

چکیده

آویشن شیرازی گیاهی دارویی، بومی ایران و متعلق به تیره نعنائیان است، که از میزان ترکیبات فنولی بالایی برخوردار است. ارزیابی اکوتیپ‌های مختلف این گیاه به منظور شناسایی برترین اکوتیپ از لحاظ محتوای فنولی کل، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات پلی‌فنولی عصاره متانولی حائز اهمیت است. در تحقیق حاضر، دو اکوتیپ گیاه دارویی آویشن شیرازی (فیروزآباد و قیرو کارزین)، از لحاظ محتوای فنولی کل، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات پلی‌فنولی عصاره متانولی بررسی شد. فنول کل و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی به ترتیب، با استفاده از روش رنگ سنجی فولین سیوکالتو و مهار رادیکال آزاد ۲،۲-دی‌فنیل، ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) تعیین شد. ترکیبات پلی‌فنولی عصاره متانولی اکوتیپ‌ها، با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مشخص گردید. فنل کل ۳۹۷/۲۸ و ۳۰۶/۲۳ میلی‌گرم گالیک اسید در وزن خشک اعلام شد. مقادیر خاصیت آنتی‌اکسیدانی ۳۱۸/۶۳ و ۴۲۳/۷۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. ترکیبات پلی‌فنولی غالب در عصاره هر دو اکوتیپ شامل: تیمول، کارواکرول، کوئرستین و رزماریک اسید بود. نتایج نشان داد بالاترین میزان فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در اکوتیپ فیروزآباد مشاهده شد. ترکیب پلی‌فنولی غالب تیمول و مربوط به اکوتیپ فیروزآباد بود.

مقدمه

تیره نعنائیان جزء راسته‌ی لامیال است. این تیره دارای ۲۵۰ جنس و ۶۸۰۰ گونه در سراسر جهان بوده که مرکز پراکندگی آن در ناحیه مدیترانه است (Mabberley, 1997). آویشن شیرازی یکی از شناخته شده‌ترین گیاهان دارویی این تیره است، که پراکندگی محدودی در جهان دارد، رویشگاه‌ها و پراکندگی جغرافیایی آویشن شیرازی در ایران، افغانستان و پاکستان می‌باشد (Hosseinzadeh et al., 2000). در استان فارس در یک کیلومتری شیراز، به طرف سروستان، جنوب غربی دریاچه مهارلو، شیراز، پارک بمو، ۲۵ کیلومتری جنوب شرقی فسا، دهسالو، کوه راز، شرق استهبان، کوه باش، خشت و کمارج، ۱۰ کیلومتری سروستان در جاده به طرف پشت چنار، ۸ کیلومتری جنوب لار، فیروزآباد و دشت لار یافت می‌شود (Jamzad, 2009). این گیاه بومی، چند ساله و بوته‌ای بوده که در مناطق مرکزی و جنوبی ایران به طور گسترده‌ای پراکنده شده است، به علت وسعت رویشگاه‌های آن مصارف متعددی در طب سنتی در نقاط مختلف کشور دارد که علاوه بر مصرف خوراکی به عنوان عطر و طعم دهنده، در درمان اختلالات گوارشی، زخم‌های موضعی و همچنین به دلیل اثرات ضد احتقان و خلط‌آور در اختلالات تنفسی و سرما خوردگی نیز استفاده می‌شود (Fazeli et al., 2007). محل رویش این گیاه دارویی، در استان فارس، در شهرستان‌های: شیراز، سروستان، فسا، استهبان، لار و فیروزآباد می‌باشد (Jamzad, 2009).

برخی از گیاهان تیره نعنائیان سرشار از ترکیبات فنولی مانند فلاونوئیدها، اسیدهای فنولی و دی‌ترین‌های فنولی بوده که این ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند (Rice-Evans, 1997). مهم‌ترین ترکیبات زیستی گیاهان آنتی‌اکسیدان‌ها هستند و عموماً در گیاهان حاوی ترکیبات فنولی وجود دارند. فنول‌ها ترکیبات هیدرواکسیل آروماتیک هستند این ترکیبات از تعداد زیادی زیر گروه شامل فلاونوئیدها، فنولیک‌اسید و تانن‌ها تشکیل شده‌اند (Kukic et al., 2008). تیمول و کارواکرول از ترکیبات شاخص آویشن شیرازی هستند که دارای اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی خوبی هستند (Saei-Dehkordi, 2010). (Shariffar et al., 2007)؛ با توجه به اهمیت فراوان گیاه دارویی آویشن شیرازی، در تحقیق حاضر دو اکوتیپ مختلف این گیاه از لحاظ خاصیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنولی کل و ترکیبات پلی‌فنولی عصاره متانولی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

۱-۲ مواد گیاهی

دو اکوتیپ آویشن شیرازی از مناطق فیروزآباد و قیرو کارزین، در اردیبهشت سال ۱۳۹۹ از رویشگاه‌های طبیعی این گیاه، جمع-آوری گردید. گیاهان جمع‌آوری شده با استفاده از فلور منطقه‌ای و منابع معتبر طبقه‌بندی گیاهان، شناسایی شدند (Rechinger, 1982).

۲-۲ تهیه عصاره متانولی

عصاره متانولی دو اکوتیپ آویشن شیرازی با روش خیساندن تهیه شد. بدین منظور ۵ گرم پودر از برگ هر گیاه درون ارن ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و مقدار ۵۰ میلی‌لیتر متانول خالص به آن اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر با دور ۱۳۰ قرار گرفتند. پس از آن با عبور مخلوط از کاغذ صافی شماره ۴۰ عصاره متانولی حاصل شد. در نهایت عصاره حاصل با استفاده از دستگاه تقطیر در خلاء در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شدند. عصاره‌های تغلیظ شده از نظر خاصیت آنتی-اکسیدانی، محتوای فنول کل و پلی‌فنولی مورد بررسی قرار گرفتند.

۳-۲ تعیین فنول کل

میزان فنول کل با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسیدگالیک در گرم عصاره بیان شد (Singleton, & Rossi, 1965).

۳-۲ تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی

اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک ۲،۲-دی‌فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل مطابق با روش Brand-Williams, 1995 و Wang, 1998، مورد ارزیابی قرار گرفت.

۴-۲ شناسایی و تعیین مقدار اجزاء ترکیبات پلی فنولی

تعیین مقدار و نوع ترکیبات پلی‌فنولی در دو اکوتیپ مختلف آویشن شیرازی بر اساس استاندارد ملی ایران (۲۰۱۳)، به شماره ۱۶۳۲۳ (روش اندازه‌گیری بیوفنول‌ها به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC انجام شد).

۵-۲ تجزیه آماری داده‌ها

در این تحقیق تمامی آزمون‌ها ۳ بار تکرار شد و داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند. نتایج حاصل با استفاده از روش آنالیز آماری واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan, 1995) در سطح احتمال ۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام و برای ثبت داده‌ها از نرم افزار اکسل استفاده شد.

نتایج و تحلیل

۱-۳ محتوای فنول کل

محتوای فنول کل با روش فولین سیوکالتو معادل گالیک اسید بیان شد (معادله منحنی استاندارد: $0.9974 = R^2$ و $0.06 - x = 0.057 \cdot y$). طبق نتایج بدست آمده در جدول ۱، تفاوت معناداری در سطح احتمال ۵ درصد در دو اکوتیپ آویشن شیرازی مشاهده شده، محتوای فنول کل در اکوتیپ فیروزآباد، با ۳۹۷/۲۸ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک عصاره و محتوای فنول کل در اکوتیپ قیرو کارزین، با ۳۰۶/۲۳ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک عصاره اعلام شد که تفاوت در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود. مطالعات اخیر در مورد آویشن شیرازی نشان داده است این گیاه منبع غنی از ترکیبات فنولی می‌باشد. کمیت و کیفیت ترکیبات فنولیک، به طور قابل توجهی به عوامل مختلف، مانند ژنتیک گیاهی، خاک، شرایط رشد، زمان برداشت و روش‌های استخراج بستگی دارد (Jaffery et al., 2003).

۲-۳ خاصیت آنتی‌اکسیدانی

بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی دو اکوتیپ آویشن شیرازی به لحاظ آماری در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معناداری مشاهده گردید. بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مانند ویتامین C (۲۳/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) و بوتیل هیدراکسی تولون (۲۵/۴۳ میکروگرم در میلی‌لیتر) و کوئرستین (۳۷/۸۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) اعلام شد. سپس بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در اکوتیپ فیروزآباد (۳۱۸/۳۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) مشاهده شد. کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در اکوتیپ قیرو کارزین (۴۲۳/۷۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) گزارش گردید. ارتباط مستقیمی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات پلی فنولی گیاه وجود دارد که بالا بودن ترکیبات فنولی دلیل عمده‌ی بالا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی در بعضی از عصاره‌های گیاهی می‌باشد (Jamshidi et al., 2010).

۳-۳ ترکیبات پلی فنولی عصاره

از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC جهت شناسایی ترکیبات پلی‌فنولی عصاره متانولی اکوتیپ‌های آویشن شیرازی استفاده شد. ترکیبات پلی‌فنولی شناسایی شده در جدول ۲ آورده شده است. تفاوت معنی‌داری در نتایج حاصل از اندازه‌گیری ترکیبات پلی‌فنولی موجود در اکوتیپ‌ها مشاهده شد ($P \leq 0.05$). به طور کلی از ۱۷ ترکیب پلی‌فنولی به عنوان شاخص در دو اکوتیپ آویشن شیرازی استفاده گردید. از بین ترکیبات پلی‌فنولی شاخص در عصاره اکوتیپ‌های آویشن شیرازی، ترکیبات گالیک اسید، کاتچین، کلروژنیک اسید و وانیلین، سنیاپیک اسید، کومارین شناسایی نشد. پنج ترکیب پلی‌فنولی پی‌کوماریک اسید، رزماریک اسید، کوئرستین، کارواکرول و تیمول در هر دو اکوتیپ شناسایی شد. ترکیب کافنیک اسید با ۲/۲۹ میلی‌گرم در لیتر تنها در اکوتیپ فیروزآباد اعلام شد. میزان ترکیب کوئرستین و کارواکرول به ترتیب با ۲۵۶/۸۶ و ۹۳۲/۳۳ میلی‌گرم در لیتر، در اکوتیپ قیرو کارزین بیشتر از اکوتیپ فیروزآباد اعلام شد. بالاترین میزان ترکیبات پلی‌فنولی در ترکیب تیمول با ۱۳۲۵/۲۳ میلی‌گرم در لیتر در اکوتیپ فیروزآباد اعلام شد. عوامل متعددی می‌تواند بر میزان ترکیبات فنولی تأثیر گذار باشد از جمله: مراحل آماده‌سازی گیاه، نمونه گیاهی (نوع گونه، جمعیت، اندام مورد استفاده، مرحله نمو)، شرایط محیطی ساختار خاک، شرایط اقلیمی، تنش‌ها و روش‌های سنجش ترکیبات فنولی (Morales de souza et al., 2008).

نتیجه گیری

طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق، عصاره متانولی هر دو اکوتیپ فیروزآباد و قیرو کارزین دارای محتوای فنول کل بالا و خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی بود. ترکیب پلی‌فنولی غالب در هر دو عصاره تیمول، کارواکرول، کوئرستین و رزماریک اسید بود. بیشترین میزان تیمول در عصاره متانولی اکوتیپ فیروزآباد و بالاترین میزان کارواکرول در عصاره متانولی اکوتیپ قیرو کارزین اعلام شد. با توجه به بالا بودن ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی در اکوتیپ‌های مورد بررسی و همچنین خوراکی بودن این گیاه، می‌توان از این گیاه به عنوان جایگزینی برای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی در صنایع غذایی و دارویی استفاده نمود.

منابع

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebenson Wiss Tech*. 28:25-30.
- Duncan, D.B. (1955). Multiple range and Multiple F-tests. *Biometrics*, (2-4): 1-42.
- Fazeli, MR., Amin, G., Ahmadian Attari, M.M., Ashtiani, H., Jamalifar, H., & Samadi, N. (2007). Antimicrobial activities of Iranian sumac and Avishan-e-Shirazi (*Zataria multiflora*) against some food borne bacteria. *Food Control*. 18: 646-649.
- Hosseinzadeh, H., Ramezani, M., & Salmani, G. (2000). Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zataria multiflora* Boiss extracts in mice and rats. *J. Ethnopharm*. 73(3):379-385.
- Jaffery, E.H., Brown, A.F., Kurilich, A.C., Keck, A.S., Matusheski, N., Klein B.P., & Juvik, J.A. (2003). Jamshidi, M., Ahmadi Ashtiani, HR., Rezazadeh, Sh. A., Azad, F, Mazandarani, M., & A. Khaki. (2010). Jamzad, Z. (2009). Thyme and Savory of Iran. Institute of Forest and Rangelands. Tehran, 172p.
- Kukic, J., V. Popovic, S. Petrovic, P. Mucaji, A. Ciric, D. Stojkovic, & M. Sokovi. (2008). Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts *Food Chemistry*, 107: 861 – 868.
- Mabberley, DJ. (1997). The plant -Book 2nd ed. 400 Cambridge, Cambridge university press. 384 p.
- Morales de souza, R. A., Oldoni, TLC., Regitano, D., Arce, MAB, & Alencar, SM. (2008). Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Ciencia Tecnololgia de Alimentos*. 6(1): 41-7.
- Rechinger, K.H. (1982). *Flora Iranica*. No.150, Graz: Akademisch Druck-u. Verlagsanstalt; pp. 403-476.
- Rice-Evans, C.A., J. Miller, N., & Paganga, G.(1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*. 2:152-159.
- Saei-Dehkordi, S.S., Tajik, H., Moradi, M., & Khalighi-Sigaroodi., F. (2010). Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. From different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food Chem. Toxicol*. 48: 1562-1567.
- Sharafati Chaleshtori, R., Rafieian-Kopaei, M., Rokni, N., Mortazaei, S. & Sharafati Chaleshtori., A. (2013). Antioxidant activity of *Zataria multiflora* hydroalcoholic extract and its antibacterial effect on *Staphylococcus aureus*. *J. Mazandaran Uni. Med Sci*. 22:87-94.
- Singleton, V.L., & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic phosphotungsticacid reagents, *Amer. J. Enol. Vitic*. 16: 144-158.
- Wang, M., Li., J. Rangarajan., M. Shao., Y. La Voie., E.J. Huang., C.T. & Ho., CT. (1998). Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J. Agri. Food Chem*. 46: 4869-4873.