مقایسه خواص پاداکسایشی زرشک تازه (*Berberis integerrima×Vulgaris*) در دو حلال آبی و الکلی

چکیده

گیاه زرشک (Barberry) متعلق به خانواده ی *Berberidaceae* می باشد که بدلیل اثرات کاهش قند و فشار خون در طب سنتی استفاده می شود. هدف از این تحقیق بررسی مقایسه ای مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوییدی، ظرفیت آنتی اکسیدانی، سنجش قدرت احیای آهن، سنجش MDA، توان پاک کنندگی رادیکال نیتریک اکساید درعصاره های الکلی وآبی زرشک(*Berberis integerrima×Vulgaris*)بود. بعد از جمع آوری میوه زرشک در آبان ۱۳۹۱ از منطقه قمچقای واقع در٤٥ کیلومتری شهرستان بیجار استان کردستان تا زمان سنجش در فریزر نگهداری شد. سپس عصاره اتانولی، متانولی و آبی آن تهیه گردید. سنجش میزان فنل و فلاونوئید تام به روش اسپکتروفتومتری ، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با استفاده از رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیای آهن به روش FRAP اندازه گیری شد. نتایج بدست آمده نشان داد که عصاره آبی دارای بیشترین میزان فنل (٤٨/٩٨ ± ٠/٤٩ میلی گرم در گرم وزن تر)، بیشترین میزان فلاونوئید متعلق به عصاره متانولی (١/٩٣±٠/٠٣٣، میلی گرم در گرم وزن تر)، بالاترین ظرفیت آنتی اکسیدانی در عصاره متانولی (٤٤/٦٢±٠/٩٩ درصد)، بیشترین قدرت سنجش احیا در عصاره متانولی (٥/٨٩±٠/٤٢ میلی مول در گرم وزن تر) ، بیشترین میزان مالون دی آلدئید در عصاره متانولی (٣٧/١٢±٠/٧٩ میلی مول بر گرم وزن تر) و بالاترین قدرت پاک کنندگی رادیکال نیتریک اکساید در عصاره آبی (٧٢٣/٦٠±٦٤/٥٦ درصد) دیده شد. نتایج نشان داد که عصاره های آبی و الکلی زرشک می تواند به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی عمل نموده و پس از آزمایش های تکمیلی در صنایع غذایی و دارویی به کار رود.

کلید واژه ها: زرشک (Barberry)، DPPH ، فلاونوئید ، FRAP

مقدمه

واکنش های بیوشیمیایی متعددی در بدن، اکسیژن فعال تولید نموده که توانایی تخریب بیومولکول ها را دارا می باشند. این اثر زیان بخش رادیکال های آزاد می تواند توسط مواد آنتی اکسیدان بلوکه شود. آنتی اکسیدان ها مولکول ها یا ترکیباتی هستند که به عنوان از بین برنده رادیکال های آزاد عمل می کنند که این رادیکال ها باعث می شوند تا مولکول ها آسیب ببینند یا عملکرد خود را از دست بدهند، که دفاع اولیه در برابر این تخریب های اکسیداتیو بر عهده ی آنتی اکسیدان هاست (Valko *et al*., 2006). نقش رادیکال های آزاد در ایجاد بسیاری از بیماری ها به خوبی، به اثبات رسیده است (Kumaran and Karunakaran, 2006). خسارت های ناشی از واکنش های اکسیداتیو به DNA، پروتئین ها و سایر مولکول ها می تواند باعث پیشرفت و تشدید بیماریهایی مثل سرطان، پیری، آترواسکلروز و کاتاراکت شود (Valko *et al*., 2004; Valko *et al*., 2007). گیاهانی که غنی از ترکیبات آنتی اکسیدان هستند می توانند سلول ها را از استرس های اکسیداتیو محافظت نمایند (Ielpo *et al*. 2000). یکی از بهترین منابع آنتی اکسیدان های طبیعی ترکیبات فنلی گیاهان می باشند (Shahidi, 2000). ترکیبات فنلی به فنل های ساده، اسیدهای فنولیک، مشتقات هیدروکسی سینامیک و فلاونوئیدها طبقه بندی می شوند. عملکرد بسیاری از ترکیبات فنلی به عنوان ترکیبات آنتی اکسیدان قوی توسط محققین گزارش شده است (Serrano *et al*., 2006). خاصیت آنتی اکسیدانی گیاهان، به میزان هر یک از ترکیبات پلی فنلی بستگی دارد (Wisman and Halliwell, 1996). آنتی اکسیدان های شیمیایی که بیشترین استفاده را در صنعت غذایی دارند، شامل: بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT)، بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)، ترشیری بوتیل هیدروکینون (TBHQ) و پروپیل گالات بوده که سرطان زایی و اثرات منفی این مواد بر سلامت انسان مشخص شده است (Kahl and Kappus, 1993; Namiki,1990). بنابراین امروزه استفاده از گروه وسیعی از گیاهان دارویی و ترکیبات فنلی آن ها به عنوان منابع طبیعی که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند مورد

توجه محققین قرار گرفته است (Kulisic *et al*., 2004). ایران از نظر پوشش و تنوع گیاهی دارای منابع بی نظیری است و طب سنتی ایران نیز یکی از غنی ترین و پرسابقه ترین طب های سنتی دنیا به شمار می رود. مطالعه بر روی گیاهان دارویی که در مناطق مختلف ایران، برای درمان استفاده می شود و بررسی های آزمایشگاهی و بالینی خصوصیات درمانی آنها یکی از کارهای مهمی است که در این راستا می توان انجام داد (Ghasemi, 2002; Azimzadeh, 2009). خانواده *Berberidaceae* گروهی از گیاهان می باشند که از میان آنها چند نمونه مثل *Berberis Integerrima, Berberis Aristata* و *Berberis Vulgaris* دارای مصارف قابل توجهی در پزشکی و صنعتی می باشند. در این تحقیق بر روی زرشک هیبرید بین گونه ای *Berberis integerrima×Vulgaris* مطالعه شد.

Berberis Integerrima که با نام محلی زرشک زرافشانی شناخته می شود (Majd *et al*., 2008) یکی از مهم ترین گیاهان دارویی است با ارتفاع حدود ٤ متر و برگ های ضخیم چرمی و گل آذین خوشه ای به طول ۵cm-۲ و میوه هایی با طول mm ۸-۷. این گیاه در اغلب نواحی ایران به خصوص در نواحی شمالی و شمال شرقی کشور می روید و به صورت های مختلفی مورد استفاده مردم قرار می گیرد (Zargari,1993; Fatehi-Hassanabad *et al*., 2005). آبان زمان برداشت میوه این گیاه است. به واسطه دارا بودن متابولیت های ثانویه از قبیل اکسی کانتین، بربرین، بربامین، پالماتین، کلومبامین، ژاتروریزین و بربروبین این گیاه دارای خواص دارویی زیادی است (Arayne, 2007) و تاریخچه ی طولانی در طب سنتی ایران دارد. گیاه *Berberis Vulgaris* درختچه ای خاردار با ارتفاع ۳- ۱ متر، با چوب زرد رنگ و برگ های بیضی شکل و گل های زایای زرد رنگ که منجر به تولید میوه های قرمز دوکی شکل می شوند، است. برای قسمت های مختلف گیاه زرشک خواص گوناگونی ذکر شده است؛ علاوه بر اثرات آنتی اکسیدانی میوه زرشک (Sabir *et al* ., 1978) از ریشه و پوست ساقه آن، آلکالوئیدهای گوناگونی به دست آمده که مهم ترین آنها بربرین است (Ivanivska and Phlipov, 1999).

بر اساس مطالعاتی که بر روی عصاره ریشه زرشک و عمده ترین آلکالوئید آن یعنی بربرین انجام گرفته خواص زیر برای آن ذکر شده است: آنتی اکسیدان (Sabir *et al*., 1978)، ضدالتهاب (Ivanovska and Phlipov, 1999)، کاهنده فشار خون (Fatehi *et al*., 2005)، هیپوگلیسمی (Yin *et al*., 2002) و پایین آورنده چربی (Doggrell, 2005). خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی گیاه زرشک زرافشانی توسط مجد و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شده است. ترکیبات موجود در زرشک دارای فعالیت های بیولوژیکی هستند و به طور گسترده ای در صنایع غذایی و پزشکی کاربرد دارند (Martynov *et al*., 1984). هدف از این مطالعه بررسی میزان فنل تام، فلاونوئید، مالون دی آلدئید، سنجش قدرت احیاء به روشFRAP، توان پاک کنندگی رادیکال NO، سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی با استفاده از رادیکال DPPH در گیاه زرشک جمع آوری شده از منطقه قمچقای شهرستان بیجار در استان کردستان بود.

مواد و روش ها

جمع آوری گیاه: هیبرید *Berberis integerrima×Vulgaris* در آبان ماه سال۱۳۹۱ از منطقه قمچقای شهرستان بیجار جمع آوری گردید و تا زمان سنجش در فریزر نگهداری شد.

استخراج عصاره

عصاره های مختلف گیاه مورد مطالعه به روش خیساندن (maceration) تهیه شد. به این منظور، برای تهیه هر یک از عصاره ها، مقدار ۲ گرم زرشک تازه در داخل ارلن ریخته شد و مقدار ml 10حلال مورد نظر به آن اضافه گردید. نمونه ها به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر قرار گرفتند و پس از آن با عبور مخلوط از کاغذ صافی عصاره اولیه حاصل گردید. این عمل با افزودن ml ۱۵ حلال به مواد باقی مانده تکرار شد.

تعیین مقدار ترکیبات فنلی تام

جهت اندازه گیری ترکیبات فنلی تام از معرف Folin-Ciocalteo استفاده شد (McDonald *et al.*, 2001). ۱ میلی لیتراز این معرف به ۱ میلی لیتر عصاره به دست آمده گیاهی اضافه و سپس به مخلوط حاصل ۱ میلی لیتر سدیم کربنات اضافه شد پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط جذب نمونه ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل APPEL خوانده شد. نتایج، با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید به صورت میلی گرم هم ارزگالیگ اسید بر گرم وزن تر گزارش شد (Pandjaitan *et* ; Shui and Leong, 2002 .(*al.*, 2005

تعیین مقدار ترکیبات فلاونوییدی

مقدار ترکیبات فلاونوییدی با روش نورسنجی کلرید آلومینیوم تعیین شد (Chang *et al.*, 2002). به ۱ میلی لیتر عصاره گیاهی تر ۱ میلی لیتر محلول کلرید آلومینییوم در محلول متانول ۵% اسید استیک در متانول اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه واکنش جذب نمونه ها در طول موج ٤۳۰ نانومتر در برابر نمونه شاهد خوانده شد. نتایج به صورت میلی گرم هم ارز کوئرستین بر گرم وزن تر گزارش شد.

سنجش ظرفیت مهار پراکسیداسیون چربی به روش تیو باربیتوریک اسید (TBA)

از روش تیو باربیتوریک اسید (TBA) برای محاسبه میزان پراکسیداسیون لیپید استفاده گردید. در pH پایین و دمای بالای $100^{\circ}C$ مالون دی آلدئید به TBA باند شده و تشکیل یک کمپلکس قرمز رنگ می دهد که می توان آن را در ۴۳۲ نانومتر تشخیص داد. به این منظور ۲ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید۲۰% و ۲ میلی لیتر از محلول TBA ۰/۶۷% به ۰/۵ میلی لیتر از عصاره ی نمونه های گیاهی اضافه شد. این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری

$^{\circ C}$ ۱۰۰ قرار گرفت و پس از سرد شدن تا دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه، در سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ شد. فعالیت ضداکسایشی بر اساس جذب محلول رویی در ۵۳۲ نانومتر اندازه گیری شد.

تعیین فعالیت آنتی رادیکالی به روش DPPH

در این روش ویژگی الکترون دهندگی آنتی اکسیدان ها در اسیدیته پایین، باعث احیای کاتیون فریک به فرو (Fe^{+3} به Fe^{+2}) می شود. بنابراین آنتی اکسیدان ها قادر هستند کمپلکس بی رنگ فریک - تری پیریدیل- تریازین را به کمپلکس آبی رنگ فرو- تری پیریدیل- تریازین تبدیل نمایند که در طول موج ٦۰۰ نانومتر جذب دارد. میزان جاروب کنندگی رادیکال های پایدار DPPH با استفاده از روش Cuendent و همکاران (۱۹۹۷) تعیین شد. ۲ میلی لیتر از هر یک از عصاره های تهیه شده با ۲ میلی لیتر محلول ۰/۰۰٤ % DPPH مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در دمای اتاق به دور از نور نگهداری و سپس جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (APPEL) در برابر سل حاوی متانول خوانده شد، درصد جاروب کنندگی عصاره ها طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$IC\ \% = (A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}) \times 100 \qquad (۱)$$

در این فرمول Ablank جذب کنترل و Asample جذب نمونه می باشد و IC فعالیت حذف کنندگی رادیکال بوده و بیانگر فعالیت آنتی اکسیدانی و درصد مهارکنندگی است.

فعالیت به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید

سدیم نیترو پروساید در محلول های آبی در pH فیزیولوژیک به آهستگی نیتریک اکساید تولید نموده که با اکسیژن محیط وارد عمل شده و یون نیتریت تولید می نماید. یون نیتریت تولید شده در حضور واکنشگر گریس

مورد سنجش قرار می گیرد. به دام اندازی نیتریک اکساید با رقابت نمودن با اکسیژن موجب کاهش تولید یون نیتریت می شود. به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید نیز موجب توقف واکنش های زنجیری می گردد که با تولید بیش از حد نیتریک اکساید آغاز می شود. میزان مهار رادیکال های نیتریت با استفاده از واکنش Griss Illosvoy (Garrat, 1964) به دست آمد. مخلوط واکنش (۲/۵۰۲ میلی لیتر) حاوی سدیم نیترو پروسید (۲ میلی لیتر) و بافر فسفات سالین (۰/۵ میلی لیتر) به همراه عصاره (۲۰ میکرولیتر) در دمای اتاق به مدت ۱۵۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون ۰/۱ میلی لیتر از مخلوط فوق با ۱ میلی لیتر سولفانیلیک اسید (۰/۳۳% در گلاسیال استیک اسید ۲۰ %) مخلوط شد و اجازه داده شد به مدت ۵ دقیقه جهت تکمیل واکنش باقی بماند. سپس ۱ میلی لیتر نفتیلن اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید ۰/۱ % به آن اضافه شد. بعد از ۳۰ دقیقه جذب مخلوط در طول موج ٥٤٠ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. درصد جمع آوری رادیکال های نیتریت از فرمول زیر به دست می آید.

درصد جمع آوری رادیکال های نیتریت = $(A_{blank} - A_{sample}) \; 100/A_{sample}$ (۲)

A_{sample}: جذب همراه با نمونه A_{blank}: جذب بدون نمونه

قدرت احیای آهن با استفاده از سنجش FRAP

قدرت احیای آهن با استفاده از سنجش FRAP با روش Benzie و Strain (1996) با اندکی تغییر تعیین شد. معرف FRAP حاوی ۲/۵ میلی لیتر از TPTZ ۱۰ میلی مولار در HCL ۴۰ میلی مولار و۲/۵ میلی لیتر $FeCl_3$ ۲۰ میلی مولار و ۲۵ میلی لیتراز بافر استات ۰/۳ مولار (pH=۳/۶) به طور تازه، تهیه شد.۳ میکرولیتر از هر عصاره با ۳ میلی لیتر از معرف FRAP مخلوط و جذب واکنش در طول موج ٦٠٠ نانومتر اندازه گیری شد.

آنالیز آماری

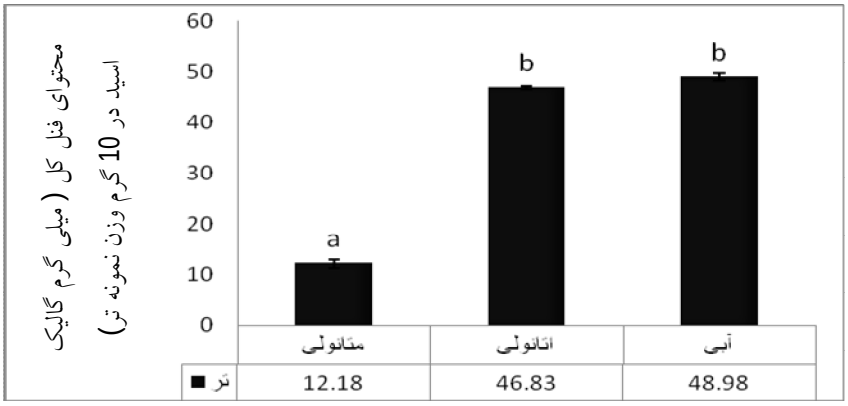
سنجش ها همه در سه تکرار انجام شدند و نتایج به صورت مقادیر میانگین و خطای استاندارد (SE) میانگین بیان شده اند. ارتباط داده ها با استفاده از واریانس تک سویه در سطح احتمال ۵% ($p<0/05$) آنالیز شدند. رسم جدول ها و نمودارها با استفاده از نرم افزارهای SPSS و EXCEL انجام شد.

نتایج و بحث

محتوای فنل و فلاوونوئید

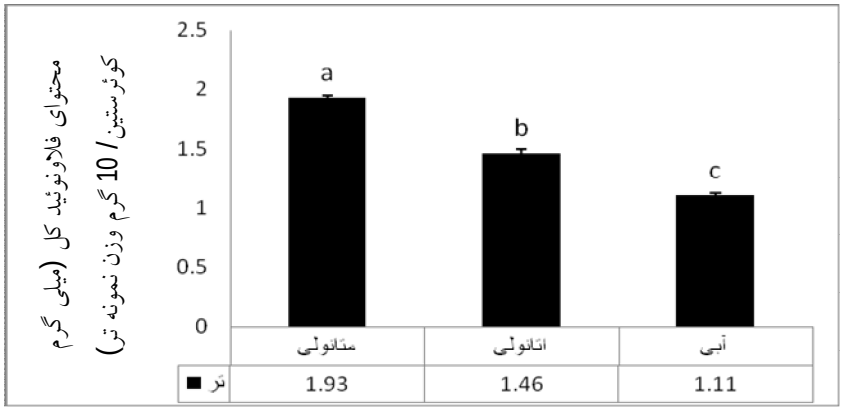
ترکیبات فنلی به دلیل خواص آنتی اکسیدانی از جمله ترکیبات مهم گیاهان محسوب می شوند که نقش مهمی درحذف رادیکال های آزاد و جلوگیری از تبدیل هیدروپراکسیدها به رادیکالهای آزاد را دارند (Naik *et al.*, 2003; Jimoh *et al.*, 2008). نتایج نشان می دهد که میوه های ارغوانی تیره ی زرشک یکی از منابع غنی آنتوسیانین و ترکیب های فنلی در بین میوه های کوچک هستند و ظرفیت آنتی اکسیدانی بالایی دارند (Moyer *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2002). میزان فنل تام و فلاونووئید در این تحقیق می تواند فعالیت آنتی اکسیدانی موجود در عصاره های تهیه شده از گیاه را توجیه نماید. از آنجا که در تحقیقات صورت گرفته بین اثر آنتی اکسیدانی و مقدار ترکیبات فنلی رابطه مستقیم ذکر شده (Kaur and Kapoor, 2002; George *et al.*,2005)، لازم است مقدار ترکیبات فنلی کل و فلاونوییدی در عصاره های مختلف زرشک تعیین شود. در واقع با توجه به اثرات درمانی و خواص دارویی گیاه زرشک شناسایی و بررسی میزان ترکیبات موثره این گیاه، امری ضروری محسوب می شود. نظر به اینکه میزان ترکیبات موجود در شرایط مختلف آب و هوایی و در بخش های مختلف گیاه متفاوت است لازم است طی آزمایش های متعدد میزان این ترکیبات در مناطق مختلف بررسی شود.

در این تحقیق، محتوای فنلی کل در عصاره های آبی، اتانولی و متانولی زرشک هیبرید *Berberis integerrima×Vulgaris* مطالعه شد. محتوای تام فنلی با متد فولین سیوکالتیو به صورت معادل گالیک اسید در گرم عصاره بر اساس معادله خط منحنی استاندارد محاسبه شد. نمودار شماره ۱ مقدار ترکیبات فنلی تام را بر حسب میلی گرم هم ارز گالیگ اسید بر گرم نشان می دهد. محتوای تام فنلی برای عصاره های آبی، اتانولی و متانولی به ترتیب ٤٨/٩٨±٠/٤٩، ٤٦/٨٣±٠، ١٢/١٨±١/٥٦میلی گرم گالیک اسید در ۱۰ گرم وزن تر زرشک به دست آمد. بیشترین میزان فنل تام مربوط به عصاره آبی به مقدار ٤٨/٩٨±٠/٤٩ بود. نمودار شماره ۲، مقدار ترکیبات فلاونوئیدی را بر حسب میلی گرم کوئرستین نشان می دهد. محتوای فلاونووئید نیز، برای همین مجموعه به ترتیب ١/١١±٠/٠٢٧، ١/٤٦±٠/٠٥٦، ١/٩٣±٠/٠٣٣ میلی گرم کوئرستین در ۱۰ گرم زرشک تر به دست آمد. بالاترین مقدار فلاونوئید نیز با میزان ١/٩٣±٠/٠٣ در عصاره متانولی مشاهده شد. نقش دفاعی برخی از فلانووئیدها در گیاهان اثبات شده است (Witzell *et al.*, 2003) بسیاری به این نتیجه رسیده اند که میوه ها و سبزیجاتی که پر رنگ تر هستند منابع غنی از ترکیبات فنلی شامل فلاونوئیدها هستند (Sas-Kiss *et al.*, 2005).



نمودار۱- محتوای فنل کل(برحسب میلی گرم گالیک اسید در ۱۰ گرم نمونه تر) در میوه تر زرشک *B.integerrima×vulgaris* در عصاره گیری های مختلف متانولی، اتانولی و آبی(سه تکرار±SE، p<0/05)

محتوای فنلی کل در میوه زرشک تازه *Berberis Vulgaris* در ترکیه ۷۸۹/۳۲±۸۸/۵۰mg/100g گزارش شده است (Akbulut *et al.*,2009). میزان کل فنل بدست آمده در این تحقیق کمتراست و این ممکن است به دلیل مراحل رسیدن میوه ها و یا برخی از عوامل محیطی باشد(Özgen *et al.*, 2008 ; Özgen *et al.*, 2012).

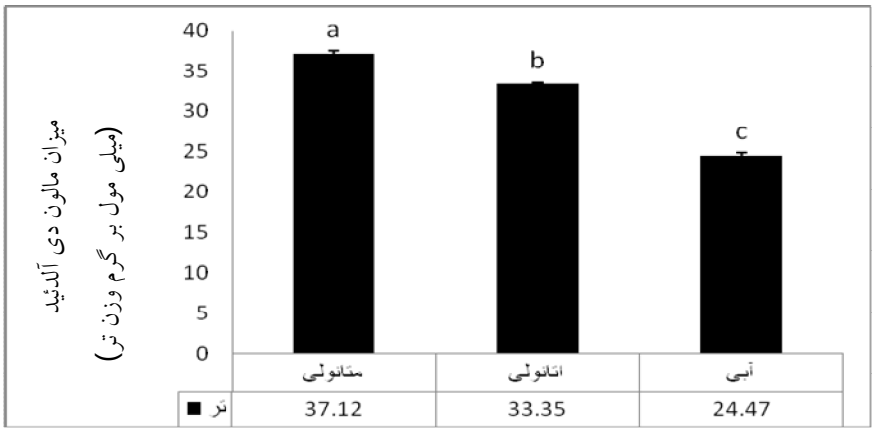


نمودار۲- محتوای فلاونوئید کل (برحسب میلی گرم کوئرستین در ۱۰ گرم تر) در میوه تر زرشک *B. integerrima×vulgaris* در عصاره گیری های مختلف متانولی، اتانولی و آبی (سه تکرار±SE، p<0/05)

سنجش میزان مالون دی آلدئید

پراکسیداسیون لیپیدها به عنوان تولید میزان مالون دی آلدئید (MDA) اندازه گیری شد. تجمع رادیکال های آزاد اکسیژن باعث اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع دارای چندین پیوند دوگانه در غشای پلاسمایی و ایجاد مالون دی آلدئید (MDA) می شود. میزان MDA به ترتیب در عصاره های آبی، اتانولی و متانولی ۲۴/۴۷±۲/۸۹، ۳۳/۳۵±۱۷/۰۰۶ و ۳۷/۱۲±۰/۷۹ به دست آمد. طبق نمودار شماره ۳ در بین عصاره های مذکور بیشترین میزان MDA در عصاره ی متانولی مشاهده شد. پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء را می توان به عنوان نشانه ای از آسیب اکسیداتیو در نظر گرفت و اغلب از آن به عنوان شاخصی برای تعیین میزان آسیب وارده به غشاء تحت تنش استفاده می شود (Khan and Panda, 2008).

پراکسیداسیون چربي تولید شده با رادیکال هاي آزاد بالا، یک نشانه از حضور ماده سمی در محیط است، که محصول نهایي آن مالون دی آلدئید است. MDA افزایش یافته شاخصی برای تنش فیزیولوژیکی است (Pourakbar *et al.*, 2007).



نمودار۳- مقدار مالون دی آلدئید اندازه گیری شده در میوه تر زرشک *B. integerrima× vulgaris* در عصاره گیری های مختلف متانولی، اتانولی و آبی (سه تکرار±SE، p<0/05)

فعالیت به دام اندازی رادیکال DPPH

DPPH یک رادیکال آزاد پایدار با اتم مرکزی نیتروژن بوده که با احیاء توسط فرایندهای گرفتن هیدروژن یا الکترون رنگ آن از ارغوانی به زرد تبدیل می شود. ترکیب هایی که قابلیت انجام این عمل را دارند به عنوان یک آنتی اکسیدان مطرح می شوند (Brand-William *et al.*, 1995).

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها به روش رادیکال DPPH در نمودار شماره ٤ نشان داده شده است. در این بررسی، درصد به دام اندازی رادیکال DPPH به ترتیب در عصاره های آبی، اتانولی و متانولی ٠/٦٦± ٣٤/٨٨، ٠/٦٠±٤١/٦٠ و ٠/٩٩±٤٤/٦٢ مشخص شد. در روش DPPH عصاره متانولی نسبت به سایر عصاره ها فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی نشان داد.

در مطالعه Pogačnik و Poklarulrih نیز که در سال ۲۰۱۱ بر روی گیاه *Berberis Vulgaris* صورت گرفت نشان داده شد که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی گیاه نسبت به عصاره آبی آن بیشتر است. یکی از روش های ارزیابی اثرات آنتی اکسیدانی گیاهان استفاده از رادیکال های آزاد DPPH است و با حذف این رادیکال می توان به روشی آسان، سریع و دقیق توانایی آنتی اکسیدانی را ارزیابی نمود (Yu *et al.*, 2002).

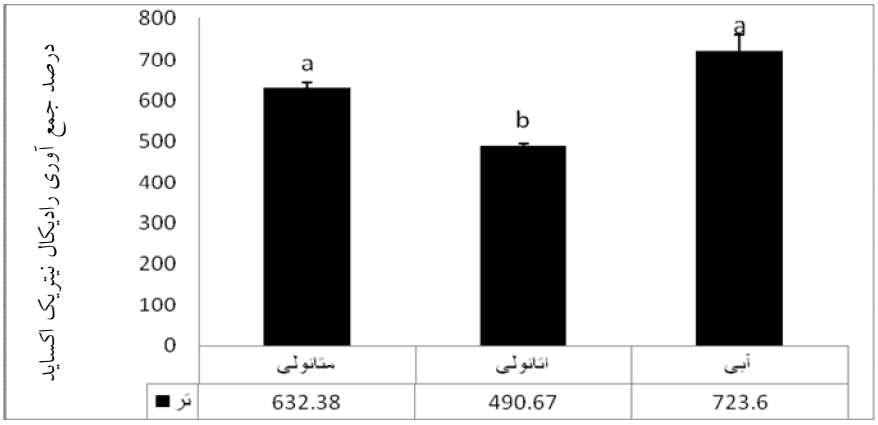
از آنجا که ترکیبات آنتی اکسیدانی متفاوت در شرایط در شیشه از طریق ساز وکارهای مختلفی عمل می کنند، واضح است که تنها یک روش نمی تواند پیش بینی جامعی از تاثیر همه ی شاخص های درگیر در ویژگی آنتی اکسیدانی ارایه دهد (Aruoma, 2003). لذا در این تحقیق از دو روش سنجش FRAP و DPPH برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها استفاده شد. این روش های سنجش در ویژگی هایی مانند سوبسترا، شرایط واکنش، روش های کمی کردن داده ها و... با یکدیگر متفاوتند (Conforti *et al.*, 2007). در هر دو روش استفاده شده عصاره های مختلف زرشک توانایی آنتی اکسیدانی مشابهی را نشان دادند. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها به روش رادیکال DPPH در نمودار شماره ٤ نشان داده شده است.

نمودار٤- درصد جمع آوری رادیکال DPPH**، در میوه تر زرشک** *B. integerrima×vulgaris* **در عصاره گیری های مختلف متانولی، اتانولی و آبی (سه تکرار**±SE، p<0/05**)**

سنجش به دام اندازی نیتریک اکساید

علاوه بر اکسیژن نوزاد، NO در حالات پاتولوژیک دیگر مانند التهاب و سرطان نیز نقش دارد (Lee *et al.*, 2003) گیاه یا محصولات گیاهی که بتوانند با تشکیل نیتریک اکساید مقابله کنند می توانند به عنوان یک جایگاه در مهار بیماری مورد توجه قرار می گیرند.

علاوه بر آن، فعالیت به دام اندازی این ترکیب می تواند برای توقف در واکنش های زنجیره ای ناشی از تولید بیش از حد نیتریک اکساید در سیستم سلامت انسان به کار گرفته شود. درصد به دام اندازی رادیکال های نیتریک اکساید برای عصاره های آبی، اتانولی و متانولی به ترتیب ٦٤/٥٦±٧٢٣/٦٠، ١٨/٥٩±٦٣٢/٣٨، ٥/٣٩±٤٩٠/٦٧ به دست آمد (نمودار شماره ٥). به عبارتی در بین عصاره های مختلف عصاره آبی توانایی بالاتری برای به دام انداختن رادیکال نیتریک اکساید داشت.

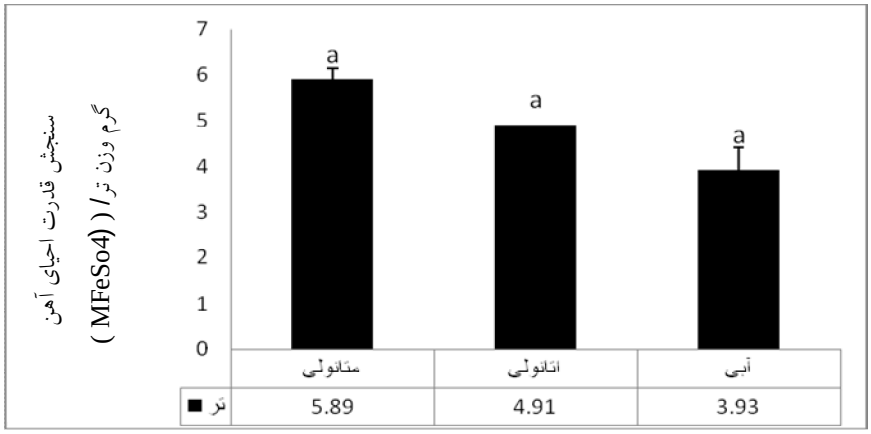


نمودار٥- درصد جمع آوری رادیکال نیتریت در میوه تر زرشک *B. integerrima×vulgaris* در عصاره گیری های مختلف متانولی، اتانولی و آبی (سه تکرار ± SE، p<0/05)

قدرت احیای آهن با استفاده از سنجش FRAP

نتایج فعالیت جمع آوری رادیکال های آزاد در عصاره های گیاه زرشک با روش DPPH و نیز روش

FRAP همبستگی منفی معنی داری را با محتوای فنلی تام و همبستگی مثبت معنی داری با محتوای فلاونوئیدی را نشان داد . روشFRAP که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها را بر اساس توانایی احیا کنندگی آهن می سنجد در حقیقت تخمین خاصیت آنتی اکسیدانی ترکیبات قابل حل در آب را نشان می دهد (Deepa *et al.*, 2007). نمودار شماره ٦ قدرت سنجش احیای آهن به روش FRAP در عصاره های آبی، اتانولی و متانولی زرشک را نشان می دهد. میزان قدرت احیای آهن در عصاره های آبی، اتانولی و متانولی به ترتیب ٤٠/٢±٣/٩٣، ٠±٤/٩١ و٤٢/٠±٥/٨٩ به دست آمد. میزان قدرت احیای آهن در عصاره متانولی نسبت به سایر عصاره ها بالاتر بود.



نمودار ٦- قدرت احیای آهن با استفاده از سنجش FRAP **در میوه تر زرشک** *B. integerrima× vulgaris* **در عصاره گیری های مختلف متانولی، اتانولی و آبی (سه تکرار** ±SE، p<0/05**)**

در روش FRAP نیز نتیجه مشابه روش DPPH به دست آمد. بدین معنا که عصاره متانولی نسبت به سایر عصاره ها، فعالیت آنتی کسیدانی بالاتری از خود نشان داد.

جمع بندی

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره (در هر دو روش DPPH و FRAP) رابطه مستقیم با مقدار فلاونوئید و رابطه

عکس با مقدار فنل تام دارد. میزان مالون دی آلدئید با میزان فنل تام رابطه عکس دارد. در نهایت می توان بیان کرد که زرشک، دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است و این خاصیت به دلیل وجود ترکیبات فنولی و سایر ترکیبات آنتی اکسیدانی آن است. بنابراین، می تواند به عنوان منبعی از آنتی اکسیدان های طبیعی مورد پژوهش بیشتر قرار گیرد.

قدردانی

بدین وسیله از راهنمایی ارزشمند جناب آقای مهندس معروفی (عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی استان کردستان جهت شناسایی گونه گیاه مذبور و جناب آقای علی شهنواز (عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان) جهت انجام آنالیزهای آماری سپاسگزاری می نماییم.

منابع

1. Akbulut, M., Calisir, S., arakoglu, T. & Coklar, H., 2009, Some physicomechanical and nutritional properties of *Berberis vulgaris* L. fruits. Journal of Food Process Engineering, 32: 479-511.

2. Arayne, M S., Sultana, N. & SherBahadur, S., 2007, The *berberis* story: *Berberis vulgaris* in therapeutics. Pakistan Journal of Sciences , 20: 83- 92.

3. Aruoma, O., 2003, Methodological consideration for characterization potential antioxidant action of bioactive components in plant foods. Mutation Research/Fundemental and Molecula Mechanisms of Mutagenesis ,524: 9-20.

4. Azimzadeh, M., 2009, Genetic assessment of Iranian *Bunium Persicum* Boiss using ITS. [MSc thesis].Tehran: University of Tehran, Abourayhan campus 81.

5. Benzie, IF. & Strain, JJ., 1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power" the FRAP assay. Anal. Biochemistry, 239: 70-76.

6. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. & Berset, C., 1995, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie , 28: 25-30.

7. 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 Food Drug Anal, 10:178-182.

8. Conforti, F., Statti, G. A. & Menichini, F., 2007, Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturitystage. Food Chemistry, 102: 1096-1104.

9. Cuendent, M., Hostettmann, K. & Potterat, o., 1997, Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from Fagreae blumei. Helvetica Chimica Acta ,80:1144-1152.

10. Deepa, N., Kaura, Ch., Georgea, B., Singhb, B. & Kapoor, H.C., 2007, Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotyps during maturity. LWT Food Science and Technology, 40: 121-129.

11. Doggrell, S.A., 2005, Berberine-a novel approach to cholesterol lowering. Expert Opinion Investing Drugs ,14(5):683-685.

12. Fatehi, M., Saleh, T.M. & Fatehi-Hassanabad, Z., 2005, A pharmacological study on *Berberis Vulgaris* fruit extract. Journal of Ethnopharmacology, 102(10):46-52.

13. Fatehi-Hassanabad, Z., Jafarzadeh, M., Tarhini, A. & Fatehi, M., 2005, The anti Hypertensive and vasodilator effects of aqueous extract from *Berberis vulgaris* fruit on hypertensive Phytother Res, 19:222-225

.

14. Garrat, D.C., 1964, The quantitative analysis of drugs, vol.3. Chapman and Hall 1th. Japan,456-458.

15. George, S., Brat, P., Alter, P.& Amiot, M.J., 2005, Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. Journal. Agricultural and Food Chemistry, 53: 1370 -1373.

16. Ghasemi, N., 2002, Iranian herbal pharmacopée. Ministry of health and medical education.Isfahan, Iran.

17. Ielpo, M.T.L., Basile, A., Miranda, R., Moscatiello, V., Nappo, C., Sorbo, S., Laghi, E., Ricciardi., M.M., Ricciardi, L. & Vuotto, M..L., 2000, Immunopharmacological properties of flavonoids Fitoterapia, 71: 101-109.

18. Ivanovska, N.& Phlipov, S., 1999, Study on the anti-inflammatory action of *berberis vulgaris* root extract, alkaloid fractions and pure alkaloid. International Journal Ethnopharmacology, 64 (2):161-166.

19. Jimoh, F.O., Adedapo, A.A., Aliero, A.A. & Afolayan, J., 2008, Polyphenolic Contents and Biological Activities of *Rumex ecklonianus*. Pharmaceutical Biology ,46: 333-340.

20. Kahl, R. & Kappus, H., 1993, Toxicity of synthetic antioxidants BHT and BHA in comparison with natural antioxidants vitamin E. Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchungund Forschung , 196: 329–338.

21. Kaur, C. & Kapoor, H.C., 2002, Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. International Journal of Food Science &Technology, 37: 153-161.

22. Khan, M. H. & Panda, S. K., 2008, Alternations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivarsunder NaCl-salinity stress. ActaPhysiologia Plantarum, 30: 81-89.

23. Kulisic, T., Radonic, A. & Katalinic, V., 2004, Use of different methods for testing antioxidative of oregano essntial oil. Journal of Food Chemistry, 85: 633-640.

24. Kumaran, A. & Karunakaran, R.J. , 2006, Antioxidant and free radical scavenging activity an Aqueous extract of *Coleus aromaticus*. Food Chemistry , 97: 109-114.

25. Lee, S.E., Hwang, H.J., Ha, J.S., Jeong, H.S. & Kim, J.H., 2003, Screening of medicinal plant Extract for antioxidant activity. Life sciences ,73: 167-179.

26. Majd, A., Mehrabian, S., Mostafai, H. & Rahmani, H., 2008, Antioxidant and anticancer effect of aqueous extract of *berberis integerrima*. Journal of biological sciences, 1: 31-38. [Article in Persian]

27. Martynov, E.G., Stroev, E.A. & Peskov, D.D., 1984, Polysaccharides of *Berberis vulgaris.* Chemistry of Natural Compounds, 20(1): 99-100.

28. McDonald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M., Robards, K . & Stadtman, E.R., 2001, Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chemistry, 73: 73-84.

29. Moyer, R.A., Hummer, K.E., Finn, C.E., Frei, B. & Wrolstad, R.E., 2002, Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. Journal Agricultural and Food Chemistry , 50: 519-525.

30. Naik, G.H., Priyadarsini, K.I., Satav, J.G., Banavalikar, M.M., Sohoni, D.P., Biyani, M.K. & Mohan, H., 2003, Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. Phytochemistry ,63: 97–104.

31. Namiki, M., 1990, Antioxidants, antimutagens in food. Critical Rev. Food Science & Nutrition, 6: 273-300.

32. Özgen, M., Wyzgoski, F.J., Tulio, A.Z., Gazula, A., Miller, A.R., Scheerens, J.C., Reese, R.N. & Wright, S.R. , 2008, Antioxidant capacity and phenolic antioxidants of Midwestern black raspberries grown for direct markets are influenced by production site. Hortscience , 43:2039-2047.

33. Özgen, S., Sekerci, Korkut, S.R. & Karabiyik. T., 2012, The tomoato debate: Postharvest-ripened or vine ripe has more antioxidant? Hort. Environ. Biotechnoloogy , 53: 271-276.

34. Pandjaitan, N., Howard, L.R., Morelock, T& Gil, M.I., 2005, Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by Genetics and maturation. Journal Agricultural and Food Chemistry, 53: 8618-8623.

35. Pogačnik, L. & Poklarulrih, N., 2011, Determination of antioxidants in medicinal harbs. Bulletin of the Transilvania University of Brasov Series VI: Medical Sciences ,4 (53): 95-102.

36. Pourakbar, L., Khayami, M., Khara J. & Farbodnia, T., 2007, Copper-Induse change in antioxidative system in maize (*Zea mays*L.). Pakistan Journal of Biological Sciences, 10:3662-3667.

37. Sabir, M., Akhter, M.H. & Bhide, N.K., 1978, further studies on pharmacology of berberin . Indian Journal of Physiology and Pharmacology , 22 (1): 9-13.

38. Sas-Kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M.M. & Toth-Markus, M., 2005, Differences In anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetable. Food Research International, 38: 1023-1029.

39. Serrano, J., Goñi, I. & Saura-Calixto, F., 2006, Food antioxidant capacity determined by Chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. Food Research International ,40: 15–21.

40. Shahidi, F., 2000, Antioxidants in food and food antioxidants.Molecular Nutrition & Food Reserch , 44: 158-163.

41. Shui, G. & Leong, L.P., 2002, Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography, 977: 89–96.

42. Sun, J., Chu,Y.F., Wu, X. & Liu, R.H., 2002, Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. Journal Agricultural and Food Chemistry, 50: 7449-7454.

43. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J. & Telser, J., 2004, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Molecular and Cellular Biochemistry, 266: 37-56.

44. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. & Telser, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39: 44-84.

45. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M.& Mazur, M., 2006, Free radicals, metals. and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions, 160:1–40.

46. Wiseman, H. & Halliwell, B., 1996, Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role of inflammatory disease and progression to cancer. Biochemical Journal, 313: 17–29.

47. Witzell, G., Gref, R. & Nasholm, T., 2003, Plant-Part specific and temporal variation in phenolic compounds of boreal bilberry (*Vaccinium myrtills*) plants. Biochemistry and Ecology, 31: 115-127.

48. Yin, I., Hu, R., Chen, M., Tang, J., Li, F.& Yang, Y., 2002, Effects of berberine on glucose metabolism in vitro. Metabolism, 51(11): 1439-1443.

.

49. Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M.,Wilson, J. & Qian, M., 2002, Free radical scavenging properties of wheat extracts. Journal Agricultural and Food Chemistry, 50: 1619–1624.

50. Zargari, A., ed., 1993, Medicinal Plants. 7th ed. Tehran: Tehran University Press, p.72-79.

Comparing the antioxidant properties of fresh (*Berberis integeerrima×vulgaris*) in water and alcohol solvents

Abstract:

Barberry is belonging to *Berberidacease* family. Barberries are used a lot in Iranian traditional medecine because of their effective role in reducing suger and blood pressure. The aim of this study was to compare the contect of Phenolic, Flavonoid, antioxidant activity, iron power reducing MDA, scavenging power of Nitric Oxide radical in ethanol, methanol and water extracts of hybrid *Berberis Integerrima×Vulgaris*. For this study, Barberries were collected from Qamchoqai zone located in Bijar, Kurdistan, Iran. They had been maintained in freezer till we started to examine them. Then, we prepared the ethanol, methanol and water extracts of these frozen Berberis. The total Phenol and Flavonoid contents of extracts were determined according to the method of UV-VIS. Total antioxidant activity content of extracts were determined by using free DDPH radical and we measured iron power reducing content based on FRAP method. The results of research are shown as following, that water extract has the most phenol content (48/98±0/49 mg/g (wet weight)), the most flavonoid content belong of methanol extract (1/93±0/033 mg/g(wet weight)), the most antioxidant activity in the methanol extract (44/62±0/99), the most iron power reducing activity in the methanol extract (5/89±0/42 mmol/g(wet weight)), the most Malon Di Aldeid content in the methanol extract (37/12±0/79 mmol/g(wet weight)), the most scavenging power of Nitric Oxide radical activity in water extract (723/60±64/56) was seen. Results showed that water and alcohol extracts of *Berberis Integerrima×Vulgaris* can act as a natural antioxidant and after complimentary expriments, it can be used in food and medecine industry.

Keywords : *Berberis Integrrima×Vulgaris*, DPPH, Flavonoid, FRAP