نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، ص. ۱۸۹-۱۸۲

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 9, No. 2, Summer 2013, p. 182-189

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره‌های فنولی گل گیاه گل مغربی *(Oenothera biennis* L.*)*

ویدا مردانی قهفرخی[۱]- مهران اعلمی[۲*] - سعیده عربشاهی دلویی[۳]- رسول خدابخشی[٤]- مریم قادری قهفرخی[٥]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۶/۹
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۳/۳

چکیده

گل مغربی (*Oenothera biennis* L.) نوعی گیاه علفی دو ساله است که عمدتا به دلیل حضور درصد بالایی گامالینولنیک اسید در روغن حاصل از بذر این گیاه به منظور استفاده در ترکیبات دارویی کشت می‌شود. در این پژوهش، مقدار ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد-میکروبی عصاره‌های استونی (۷۰ درصد)، اتانولی (۷۰ درصد) و متانولی (۷۰ درصد) گل گیاه گل مغربی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد، عصاره استونی بیشترین مقدار ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و بازدهی استخراج را دارا می‌باشد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های فنولی با آزمون‌های مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و قدرت احیاءکنندگی یون‌های Fe^{+3} بررسی و با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT مقایسه گردید. در هر دو آزمون، بیشترین فعالیت به ترتیب مربوط به BHT، عصاره استونی، اتانولی و متانولی حاصل بود. عصاره‌های فنولی فعالیت ضدمیکروبی قابل ملاحظه‌ای در مقابل تمامی باکتری‌های مورد بررسی نشان دادند و تاثیر عصاره‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود. در میان باکتری‌های مورد مطالعه، *سالمونلا تیفی‌موریوم* بیشترین مقاومت را به عصاره‌های استونی و اتانولی نشان داد. مقدار MBC عصاره استونی و اتانولی در مورد این باکتری به ترتیب برابر با ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

واژه‌های کلیدی: گل مغربی، عصاره فنولی، فعالیت ضدمیکروبی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مقدمه

مطالعات اپیدمیولوژیکی حاکی از آن است که مصرف مواد غذایی حاوی ترکیبات فیتوشیمیایی نقش بسیار مهمی در حفظ سلامت بدن دارد. در میان ترکیبات فیتوشیمیایی، پلی‌فنول‌ها دارای اثرات سلامت-بخش قابل توجهی در بدن می‌باشند. این ترکیبات، به واسطه فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود می‌توانند در شرایط استرس اکسیداتیو شدت اکسیداسیون ماکرومولکول‌ها در سلول‌های بدن و در نتیجه خطر ابتلا به بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو از قبیل سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی و دیابت را کاهش دهند. ترکیبات فنولی علاوه بر نقش خود در سامانه‌های زیستی، ضمن جلوگیری از فرایند اکسیداسیون مانع از تغییر در طعم، رنگ و کاهش ارزش تغذیه‌ای و ایمنی روغن‌ها و چربی‌ها و همچنین فراورده‌های حاوی ترکیبات لیپیدی می‌گردند (Singh *et al.*, 2007). ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات به‌طور عمده ناشی از قدرت احیاءکنندگی و ساختار شیمیایی آن‌هاست که آن‌ها را قادر به خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی و غیرفعال کردن مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه گانه می‌کند (Ahmadi *et al.*, 2007). در سال‌های اخیر با افزایش آگاهی نسبت به فواید مصرف ترکیبات دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و تمایل تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان به محصولات طبیعی، پژوهش‌های فراوانی در زمینه یافتن منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی صورت گرفته است (Gülçin *et al.*, 2003). مطالعات حاکی از آن است که گیاهان به عنوان منابع غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، حاوی مقادیر قابل توجهی از انواع ترکیبات فنولی از قبیل اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، تانن‌ها و دی ترپن‌های فنولی می‌باشند (Shahidi, 1997). این ترکیبات همچنین دارای

۱ و ۲- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم و صنایع غذائی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(*- نویسنده مسئول: Email: mehranalami@yahoo.com)
۳- دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی آزادشهر
۴- مسئول فنی و مدیر بخش تحقیق و توسعه کارخانه آرد صنعتی هفشجان
۵- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

اثرات ضدمیکروبی قابل توجهی هستند. به همین دلیل، امروزه استفاده از گروه وسیعی از گیاهان به ویژه گیاهان دارویی مورد توجه محققین قرار گرفته است (Kulisic *et al.*, 2004).

گل مغربی با نام علمی *Oenothera biennis* نوعی گیاه دارویی متعلق به خانواده *Onagraceae*، گیاهی دو ساله و کوتاه عمر است که در سال اول رزت قاعده‌ای برگ‌ها را تشکیل داده و در سال دوم ساقه گل‌دهنده (تا ارتفاع ۱/۵ متر) پدیدار می‌شود. از آنجا که گل‌های زرد، بزرگ و لوله‌ای این گیاه به هنگام غروب آفتاب باز می‌شوند، به آن گل مغربی می‌گویند. منشاء اصلی این گیاه آمریکای جنوبی و آمریکای مرکزی می‌باشد. در این مناطق از دم‌کرده ریشه گل مغربی جهت مبارزه با چاقی و یا التیام درد روده استفاده می‌گردد (Kiss *et al.*, 2011). این گیاه در بسیاری از کشورها، جهت تولید روغن بذر گل مغربی در سطح وسیعی کشت می‌شود. روغن بذر گل مغربی، منبع غنی از اسیدهای چرب غیراشباع به‌ویژه گامالینولنیک اسید بوده که حدود ۳ ± ۱۱ درصد از اسیدهای چرب این روغن را تشکیل می‌دهد (Niklova *et al.*, 2001). روغن بذر گیاه گل مغربی در کاهش درد قاعدگی، درمان دیابت شیرین و همچنین کاهش کلسترول بسیار موثر است (Zahradniklova *et al.*, 2008). اثرات درمانی مفید در علائم روده تحریک‌پذیر و ناراحتی‌های گردش خون و رماتیسم این گیاه نیز قابل توجه می‌باشد (Kiss *et al.*, 2011). بذر چربی‌گیری شده این گیاه به عنوان منبع غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شناخته شده است و پژوهش‌های فراوانی در زمینه شناسایی و استخراج ترکیبات فنولی از بذر گیاه گل مغربی صورت گرفته است. با این حال تاکنون پژوهشی در زمینه استخراج ترکیبات فنولی و تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی گل این گیاه انجام نشده است. از این‌رو ما پژوهشی را در راستای یافتن منبع غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با هدف تعیین محتوی ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های فنولی حاصل از گل گیاه گل مغربی انجام داده‌ایم.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی ماده اولیه

گل گیاه گل مغربی در تیر ماه ۱۳۹۰ از مزرعه گیاهان دارویی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان جمع‌آوری شد. گل‌ها پس از شستشو و خشک کردن در آون (دمای ۴۵ °C به مدت ۳۶ ساعت) با استفاده از آسیاب آزمایشگاهی تا مش ۴۰ به صورت پودر در آمدند و تا زمان استفاده در فریزر با دمای ۱۸ °C- نگهداری شدند.

استخراج عصاره‌های فنولی

تهیه عصاره‌های فنولی با روش غوطه‌وری در سه حلال استون ۷۰ درصد ، اتانول ۷۰ درصد و متانول ۷۰ درصد (حجمی:حجمی) انجام گرفت. ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال به ۱۰ گرم پودر افزوده و مخلوط حاصل به مدت ۸ ساعت و در دمای ۴۵ °C با استفاده از همزن مکانیکی هم زده شد. پس از آن، هر یک از عصاره‌ها به وسیله کاغذ صافی معمولی از بخش جامد جدا شدند. عصاره‌های اتانولی و متانولی ابتدا به وسیله تبخیرکننده چرخان (IKA RV05، کره جنوبی) در دمای ۴۰°C و عصاره استونی توسط آون تحت خلا (Memert VO200، آلمان)، تغلیظ و در نهایت هر سه عصاره توسط خشک‌کن انجمادی (FDB5503، کره جنوبی) به پودر تبدیل شدند و تا زمان استفاده در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا در فریزر ۲۵ °C- قرار گرفتند. تمامی مواد مورد استفاده در این پژوهش با درجه خلوص بالا و از شرکت های مرک و سیگما تهیه شدند.

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی

مقدار کل ترکیبات فنولی هر عصاره به روش فولین سیوکالته با روش اسلینکارد و سینگلتون (۱۹۹۷) اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف گالیک اسید رسم گردید و مقدار کل ترکیبات فنولی بر اساس گرم در هر ۱۰۰ گرم عصاره پودر شده بیان شد. به منظور اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی نیز از روش اسپکتروفتومتری (Chang *et al.*, 2002) استفاده و مقدار ترکیبات فلاونوئیدی بر اساس گرم معادل کوئرستین در هر ۱۰۰ گرم عصاره پودر شده تعیین گردید.

قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH [۱]

در این آزمون، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۵۰۰- ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) از عصاره‌های پودر شده و نیز BHT در حلال متانول تهیه شد. ۳ میلی‌لیتر از محلول عصاره یا آنتی‌اکسیدان سنتزی با ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH ۱mM مخلوط گردید و پس از هم زدن در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار داده شدند. پس از گذشت مدت زمان ۳۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. جهت تهیه نمونه کنترل ۳ میلی لیتر متانول، جایگزین عصاره شد. درصد مهار رادیکال‌های DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Shimada et al., 1992):

$$\text{مهار رادیکال‌های DPPH } \% = \frac{\text{جذب کنترل} - \text{جذب عصاره}}{\text{جذب کنترل}}$$

قدرت احیاءکنندگی

برای بررسی توانایی عصاره‌ها در احیای آهن سه ظرفیتی، محلول‌هایی از عصاره‌های پودر شده در حلال مربوطه و نیز آنتی-

۱- ۲،۲-دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل

اکسیدان سنتزی BHT (غلظت ۵۰۰– ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) تهیه گردید. ۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره یا آنتی‌اکسیدان سنتزی با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۲ مولار، pH ۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر فری سیانید پتاسیم (۱۰ گرم در لیتر) مخلوط شد و به مدت نیم ساعت در حمام آب با دمای ۵۰ ℃ قرار گرفت. پس از افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ (وزنی : حجمی) نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۶۵۰ × سانتریفوژ شدند. پس از آن ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی برداشته و پس از افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن (III) (یک گرم در لیتر)، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید (Yildirim et al., 2001)

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها

تهیه سویه‌های میکروبی

میکروارگانیسم‌های مورد بررسی در این مطالعه شامل باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سرئوس[1] (PTCC 1023)، استافیلوکوکوس اورئوس[2] (PTCC 1113)، استافیلوکوکوس اپیدرمیس[3] (PTCC 1435) و باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکلی[4] (PTCC 1330)، سالمونلا تیفی‌موریوم[5] (PTCC 1639) شیگلا دیسانتری[6] (PTCC 1188) و لیستریا مونوسیتوژنز[7] (PTCC 1639) بودند. سویه‌های خالص این باکتری‌ها از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران خریداری شد. فعالسازی باکتری‌ها بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط این مرکز انجام شد. در این مرحله باکتری‌های خالص بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی[8] (MIC)

حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های فنولی با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک[9] تعیین گردید. برای این منظور، از میکرو پلیت-های استریل ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. محلول استوک عصاره‌ها در آب مقطر استریل تهیه گردید و غلظت‌های مختلف عصاره (۴۰ تا ۰/۱۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با رقیق‌سازی محلول استوک با محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد. باکتری‌ها به مدت یک شبانه روز قبل از انجام آزمایش، در دمای ۳۷℃ روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند. جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی 10^6 cfu/ml از رقت ۰/۵ مک فارلند استفاده شد. پس از پر کردن چاهک‌ها، میکروپلیت‌ها به مدت یک شبانه روز در انکوباتور ۳۷ ℃ قرار داده شد و پس از آن میزان کدورت توسط دستگاه الایزا ریدر (بیوتک اینسترمنت) در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شد. آزمایشات در ۳ تکرار و ۳ زمان مختلف انجام شد (NCCLS, 2000).

تعیین حداقل غلظت کشندگی[10] (MBC)

از خانه‌هایی که در آن کدورتی مشاهده نشد، ۵ میکرولیتر به محیط کشت جامد (مولر هینتون آگار) منتقل و یک شب در دمای ۳۷℃ نگهداری شد. اولین غلظتی که در آن هیچ رشدی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) در نظر گرفته شد (اوریجیالنت و همکاران، ۲۰۱۰) .

آنالیز آماری

در این پژوهش، آزمون‌های شیمیایی و میکروبی در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی و در سه تکرار انجام شد. نتایج به‌دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال (P< ۰/۰۵) صورت گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS.9.1 و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

مقدار کل ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و بازده استخراج

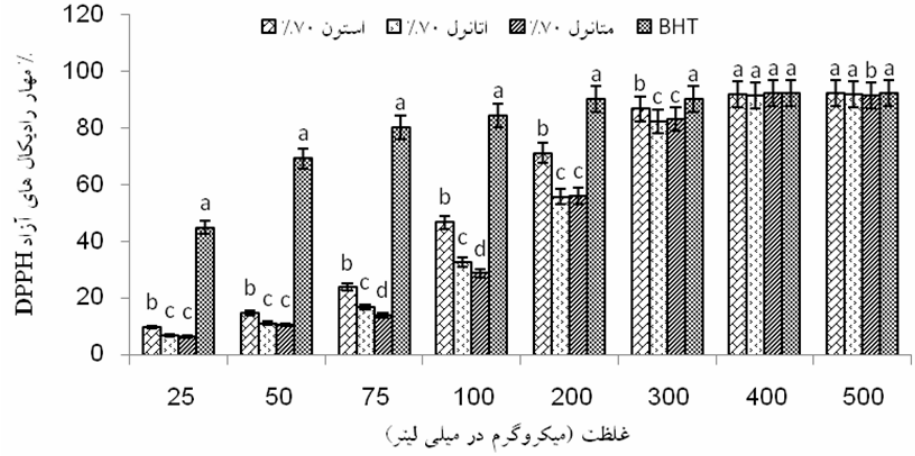
جدول ۱، مقدار کل ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و بازده استخراج عصاره‌های گل گیاه گل مغربی را نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده نشان داد که نوع حلال مورد استفاده تاثیر معنی‌داری (P< ۰/۰۵) بر مقدار کل ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و بازده استخراج هر یک از عصاره‌ها داشت. مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره‌های استخراج شده از گل گیاه گل مغربی توسط حلال‌های استون ۷۰٪، اتانول ۷۰٪ و متانول ۷۰٪ به ترتیب بین ۱۵/۳۲–۲۶/۸۱ (گرم معادل گالیک اسید/۱۰۰ گرم عصاره خشک) و ۱/۴۵–۵/۴۸ (گرم معادل کوئرستین/۱۰۰ گرم عصاره خشک) متغیر بود. استون ۷۰٪، بیشترین کارایی را در استخراج ترکیبات فنولی به خود اختصاص داد. بازده استخراج و مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در عصاره‌های استونی، اتانولی و متانولی به ترتیب کاهش یافت. به نظر می‌رسد که میزان استخراج ترکیبات فنولی از گل گیاه گل مغربی با افزایش

1 - *Bacillus cereu*
2 - *Staphylococcus aureus*
3 - *Staphylococcus epidermidis*
4 - *Escherichia coli*
5 - *Salmonella typhimurium*
6 - *Shigella dysenteriae*
7 - *Listeria monocytogenes*
8 - Minimum Inhibitory Concentration
9 - Micro Broth Dilution
10 - Minimum Bactericidal Concentration

قطبیت حلال مورد استفاده کاهش یافته است. تا کنون پژوهشی در زمینه استخراج ترکیبات فنولی از گل گیاه گل مغربی با استفاده از حلال‌های مختلف صورت نگرفته است. اما پژوهش‌های فراوانی در زمینه استخراج ترکیبات فنولی از گیاهان مختلف با استفاده از حلال‌های مختلف انجام شده است (Lapornik *et al.*, 2005؛ Negi and Jayaprakasha, 2003؛Chirinos *et al.*, 2007). در این پژوهش‌ها، تفاوت در قطبیت حلال‌های مورد استفاده جهت استخراج و حلالیت ترکیبات فنولی در این حلال‌ها دلیل اصلی تفاوت در مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌های استخراج شده با حلال‌های مختلف ذکر شده است. اوما و همکاران (۲۰۰۹) در استخراج ترکیبات فنولی از برگ حنا گزارش کردند که حلال استون ۶۰٪ در مقایسه با اتانول ۶۰٪ و متانول ۶۰٪ کارایی بیشتری در استخراج ترکیبات فنولی دارد. به‌طور کلی ویژگی‌های آبدوستی و آبگریزی ترکیبات فیتوشیمیایی تاثیر مهمی بر حلالیت آن‌ها در حلال مورد استفاده جهت استخراج دارد. از این‌رو قطبیت حلال می‌تواند نقش مهمی در کارایی استخراج این ترکیبات داشته باشد (Tsao and deng, 2004).

قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

DPPH نوعی رادیکال آزاد هیدروفیل و پایدار است که به عنوان سوبسترا در تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی یک ترکیب خاص و یا عصاره‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. محلول الکلی DPPH به‌دلیل وجود الکترون‌های منفرد دارای حداکثر جذب در طول موج ۵۱۷ – ۵۱۵ نانومتر می‌باشد. انتقال الکترون و یا اتم هیدروژن به رادیکال‌های DPPH از ترکیبات احیاءکننده نظیر فنول‌ها و تبدیل آن‌ها به فرم غیررادیکالی منجر به کاهش میزان جذب محلول DPPH در این طول موج می‌گردد. از اینرو در این آزمون، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها بر حسب درصد کاهش در میزان جذب محلول‌های DPPH در حضور عصاره فنولی نسبت به محلول فاقد عصاره بیان می‌گردد (Ferreres *et al.*, 2007). شکل ۱، میزان مهار رادیکال‌های آزاد توسط غلظت‌های مختلف (۵۰۰–۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره‌های حاصل از گل گیاه گل مغربی و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد، نوع و غلظت عصاره‌ها و آنتی‌اکسیدان سنتزی تاثیر معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد داشتند. هم‌چنین توانایی عصاره‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد همزمان با افزایش غلظت، افزایش یافت. در غلظت‌های ۳۰۰–۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، عصاره استونی بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به خود اختصاص داد. در غلظت‌های ۵۰۰–۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) میان عصاره‌های فنولی و BHT مشاهده نشد. مقادیر EC_{50} هر یک از عصاره‌ها و آنتی‌اکسیدان سنتزی به منظور مقایسه دقیق‌تر آن‌ها از نظر توانایی مهار رادیکال‌های آزاد تعیین گردید (جدول ۲). EC_{50}، عبارت است از غلظتی از عصاره که قادر به مهار کردن ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH در محیط واکنش می‌باشد. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، با کاهش مقدار کل ترکیبات فنولی در هر یک از عصاره‌ها مقدار EC_{50} افزایش می‌یابد. جونگ و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های فنولی استخراج شده از برگ گیاه جینسنگ گزارش کردند که عصاره اتانولی برگ جینسنگ با دارا بودن مقادیر بیشتری از ترکیبات فنولی در مقایسه با عصاره‌های متانولی و آبی، توانایی بیشتری در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH داشته است. این محققین، تفاوت در محتوی و ساختار ترکیبات فنولی از جمله تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل در حلقه بنزن را از دلایل اصلی تفاوت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی دانستند.



شکل ۱- مقایسه میانگین میزان مهار رادیکال‌های آزاد توسط غلظت‌های مختلف عصاره ها و آنتی اکسیدان سنتزی BHT

حروف غیرمشابه در هر غلظت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ است.

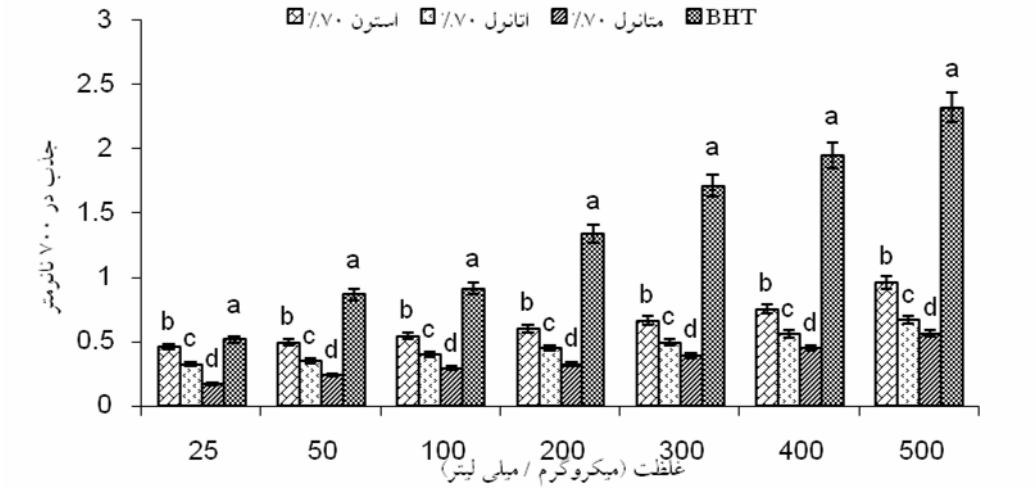
جدول ۱- مقایسه میانگین مقادیر بازده استخراج، مقدار کل ترکیبات فنولی و ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌های حاصل از گل گیاه گل مغربی

نوع عصاره	مقدار کل ترکیبات فنولی (میلی‌گرم گالیک اسید/۱۰۰گرم نمونه خشک)	مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی (میلی‌گرم کوئرستین/ ۱۰۰گرم نمونه خشک)	بازده استخراج
استون ۷۰٪	۲۶/۸۱ ± ۰/۳۲ [a]	۵/۴۹ ± ۰/۵ [a]	۲۸ ± ۰/۱۷ [a]
اتانول ۷۰٪	۱۹/۵۶ ± ۰/۱۷ [b]	۳/۶۱ ± ۰/۲۹ [b]	۱۷ ± ۰/۴۱ [b]
متانول ۷۰٪	۱۵/۳۲ ± ۰/۴ [c]	۱/۳۵ ± ۰/۲۴ [c]	۱۳ ± ۰/۷۹ [c]

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

قدرت احیاءکنندگی

در این آزمون، قدرت احیاءکنندگی مقادیر مختلفی از عصاره‌های حاصل از گل گیاه گل مغربی (۵۰۰- ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) به عنوان شاخصی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. پژوهشگران حضور مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در عصاره‌ها را عامل اصلی در بالا بودن قدرت احیاء-کنندگی عصاره‌ها دانستند. این ترکیبات قادرند از طریق اهدای الکترون و یا اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد، تبدیل آن‌ها به فرم-های غیر رادیکالی پایدار و در نهایت پایان دادن به واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکالی به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کنند (Barreira *et al.*, 2008). در آزمون تعیین قدرت احیاءکنندگی ضمن احیای یون-های Fe^{+3} و تبدیل کمپلکس فری سیانید/ Fe^{+3} به فرم فروس توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدانی (ردوکتان‌ها)، رنگ زرد محلول متناسب با قدرت احیاءکنندگی هر یک از عصاره‌های مورد بررسی به درجاتی از رنگ سبز – آبی تبدیل می‌شود. غلظت یون‌های Fe^{+2} تشکیل شده در محلول، از طریق اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر تعیین می‌گردد. مقادیر جذب بالاتر، نشان‌دهنده قدرت احیاء-کنندگی بالاتر می‌باشند (Zou *et al.*, 2004). نتایج آنالیز واریانس نشان داد، اختلاف معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) میان قدرت احیاءکنندگی عصاره‌های مختلف و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT وجود دارد و متناسب با افزایش غلظت ترکیبات فنولی در هر یک از عصاره‌ها قدرت احیاءکنندگی عصاره افزایش می‌یابد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، در تمامی غلظت‌های مورد مطالعه عصاره استونی با دارا بودن بیشترین مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به خود اختصاص داد. عصاره‌های اتانولی و متانولی به ترتیب در رده‌های بعدی قرار گرفتند. در این آزمون، عصاره‌های فنولی در هیچ غلظتی نتوانستند با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT رقابت کنند. عربشاهی و اوروج (۲۰۰۷)، در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج شده از برگ گیاه شاتوت توسط حلال‌های آب، متانول و استون گزارش کردند که قدرت احیاءکنندگی عصاره‌های فنولی متناسب با افزایش محتوی ترکیبات فنولی در عصاره‌های آبی، استونی و متانولی به ترتیب افزایش یافت. پژوهشگران مختلفی وجود ارتباط مستقیمی را میان محتوی ترکیبات فنولی و قدرت احیاءکنندگی عصاره‌های گیاهی گزارش کرده‌اند (Gao *et al.*, 2000 ؛ Zhu *et al.*, 2002) در حالیکه در برخی پژوهش‌های دیگر ارتباط مستقیمی میان محتوی ترکیبات فنولی و قدرت احیاء-کنندگی عصاره‌های گیاهی گزارش نشده است (Gülçin *et al.*, 2003).



شکل ۲- مقایسه میانگین قدرت احیاءکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌های فنولی و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT .

حروف غیرمشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

جدول ۲- مقادیر EC_{50} عصاره‌های فنولب و BHT در آزمون‌های مهار رادیکال‌های آزاد و قدرت احیاءکنندگی

آنتی اکسیدان	EC_{50} (قدرت احیاء کنندگی)	EC_{50} (به دام اندازی رادیکال‌های آزاد)
عصاره استونی	۳۶/۰۶۹ [d]	۲۹/۶۱۷ [e]
عصاره اتانولی	۴۵/۰۵۵ [c]	۳۳/۹۹۵ [b]
عصاره متانولی	۶۸/۵۴۲ [b]	۳۱/۳۰۳ [c]
BHT	۲۱/۷۰۴ [e]	۳۰/۲۸۳ [d]

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها

فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های فنولی استخراج شده از گل گیاه گل مغربی توسط استون ۷۰٪، اتانول ۷۰٪ و متانول ۷۰٪ بر روی تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای موجود در مواد غذایی به روش رقت‌سازی در چاهک (میکروبراث دایلوشن) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دو شکل MIC و MBC به ترتیب در جداول ۳ و ۴ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، عصاره‌های فنولی فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد مطالعه در این تحقیق داشتند. اثر ضدمیکروبی هر عصاره بسته به نوع باکتری متفاوت بود. باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری نسبت به عصاره‌های فنولی داشتند. محققین وجود یک غشای خارجی هیدروفیل متشکل از لیپوپروتئین‌ها و لیپوپلی‌ساکاریدها با خاصیت نفوذپذیری انتخابی را در باکتری‌های گرم منفی از عوامل مهم در مقاومت آن‌ها نسبت به ترکیبات ضدمیکروبی می‌دانند. ترکیبات فنولی به‌ویژه ترکیباتی با ماهیت هیدروفوب قادرند به راحتی از دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت عبور کنند (Burt, 2004). همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، کم‌ترین غلظت بازدارندگی (۶۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) در مورد عصاره استونی و بر روی سه باکتری گرم مثبت (باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیس) اعمال گردید. عصاره متانولی در این غلظت تنها توانست مانع از رشد باکتری باسیلوس سرئوس گردد. عصاره اتانولی در غلظت‌های بالاتر توانست مانع از رشد باکتری‌های گرم مثبت شود. به طور کلی، عصاره استونی تاثیر بیشتری در ممانعت از رشد باکتری‌ها داشت. این امر می‌تواند مربوط به حضور مقادیر بیشتری از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در عصاره استونی نسبت به عصاره‌های اتانولی و متانولی باشد. در این تحقیق مشخص شد که غلظت‌های بالاتری از عصاره‌های فنولی گل گیاه گل مغربی جهت اعمال اثر کشندگی بر باکتری‌های مورد مطالعه مورد نیاز می‌باشد. در میان باکتری‌های مورد مطالعه، *سالمونلا تیفی‌موریوم* بیشترین مقاومت را به عصاره‌های استونی و اتانولی نشان داد. مقدار MBC عصاره استونی و اتانولی در مورد این باکتری به ترتیب برابر با ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین حساسیت را نسبت به این دو عصاره نشان دادند. اشرشیا کلی و شیگلا دیسانتری مقاوم‌ترین باکتری‌ها نسبت به عصاره متانولی شناخته شدند (MBC = ۲۰). کم‌ترین مقدار MBC برای عصاره متانولی ۱/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و در مورد باکتری *باسیلوس سرئوس* مشاهده شد. مکانیسم‌های مختلفی برای توجیه رفتار ضدمیکروبی ترکیبات فنولی بیان شده است. ترکیبات فنولی ضمن تداخل با غشای فسفولیپیدی دو لایه‌ای، نفوذپذیری غشای سلول‌های میکروبی را تحت تاثیر قرار داده و موجب خروج ترکیبات درون سلولی می‌گردند .علاوه‌بر این، این ترکیبات منجر به تغییر در عملکرد غشا جهت انتقال الکترون و یا دریافت نوترینت‌ها و اختلال در سنتز پروتئین و فعالیت آنزیم‌ها می‌شوند (Kotzekidou *et al.*, 2008). مشخص شده که ترکیبات فلاونوئیدی می‌توانند روی سنتز پروتئین‌ها و لیپیدها و به خصوص اسیدهای نوکلئیک تاثیر بگذارد. برقراری پیوند هیدروژنی میان گروه‌های هیدروکسیل در ترکیبات فنولی و اسیدهای نوکلئیک در سلول‌های میکروبی می‌تواند در غیرفعال شدن مولکول‌های DNA موثر باشد (Tim Cushnie, and Lamb, 2005). تا کنون تحقیقی در زمینه بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های فنولی استخراج شده از گل گیاه گل مغربی صورت نگرفته‌است. با این حال محققین فعالیت ضدمیکروبی گیاهان مختلفی را مورد بررسی قرار داده‌اند. برومند و همکاران در سال ۱۳۸۷، اثر ضدمیکروبی اسانس بذرهای شوید و گشنیز را بر روی باکتری‌های اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی‌موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی کردند. در این پژوهش، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی‌موریوم به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری‌ها نسبت به هر دو اسانس شناخته شدند. این محققین، تفاوت در ساختار غشای سلولی، سرعت و میزان حل شدن مواد ضدمیکروبی در بخش لیپیدی غشای سلولی را از دلایل تفاوت در مقاومت باکتری‌ها نسبت به ترکیبات ضدمیکروبی دانسته‌اند. *Galla chinesis*، نوعی گیاه دارویی بومی کشور چین است. در بررسی اثرات ضدباکتریایی این گیاه، عصاره‌های استخراج شده توسط حلال‌های اتیل‌استات، اتانول و آب به‌ترتیب بیشترین اثر ضد باکتریایی را نشان دادند. در این مطالعه، باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سرئوس)

حساسیت بیشتری را نسبت به باکتری‌های گرم منفی (اشرشیا کـلای، سالمونلا تایفی موریـوم و شـیگلا دیـسنتریا) در مقابـل عـصاره‌هـای گیاهی نشان دادند. این محققین گزارش کردند که عـصاره‌هـای ایـن گیاه فعالیت ضد قارچی نداشتند (Tian *et al.*, 2009).

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان داد، گل گیاه گل مغربی با داشتن مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنولی دارای پتانـسیل آنتـی- اکسیدانی و ضدمیکروبی بالایی می‌باشد. با توجه به اثـرات نـامطلوب مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها و نگهدارنده‌های مصنوعی گل گیاه گل مغربی می‌تواند به عنوان منبع غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضـدمیکروبی طبیعی در صنعت غذا و داروسازی بـه عنـوان جـایگزینی بـرای انـواع سنتزی مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۳- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) (میلی‌گرم / میلی‌لیتر) عصاره‌های حاصل از گل گیاه گل مغربی

باکتری	نوع باکتری (گرم+/-)	عصاره		
		استون ۷۰٪	اتانول ۷۰٪	متانول ۷۰٪
باسیلوس سرئوس	+	۰/۶۲۵	۱/۲۵	۰/۶۲۵
استافیلوکوکوس اورئوس	+	۰/۶۲۵	۱/۲۵	۱/۲۵
استافیلوکوکوس اپیدرمیس	+	۰/۶۲۵	۱/۲۵	۱/۲۵
اشرشیا کلی	-	۱/۲۵	۲/۵	۵
سالمونلا تیفی‌موریوم	-	۲/۵	۵	۵
شیگلا دیسانتری	-	۱/۲۵	۲/۵	۵
لیستریا مونوسیتوژنز	-	۱/۲۵	۱/۲۵	۲/۵

جدول ٤- حداقل غلظت کشندگی (MBC) (میلی‌گرم / میلی‌لیتر) عصاره‌های حاصل از گل گیاه گل مغربی

باکتری	نوع باکتری (گرم+/-)	عصاره		
		استون ۷۰٪	اتانول ۷۰٪	متانول ۷۰٪
باسیلوس سرئوس	+	۱/۲۵	۲/۵	۱/۲۵
استافیلوکوکوس اورئوس	+	۱/۲۵	۲/۵	۲/۵
استافیلوکوکوس اپیدرمیس	+	۲/۵	۵	۲/۵
اشرشیا کلی	-	۵	۱۰	۲۰
سالمونلا تیفی‌موریوم	-	۱۰	۲۰	۱۰
شیگلا دیسانتری	-	۲/۵	۵	۲۰
لیستریا مونوسیتوژنز	-	۲/۵	۲/۵	۵

منابع

برومند، ع.، حامدی، م.، امام جمعه، ز.، رضوی، س. ه.، گلمکانی، م. ت.، ۱۳۸۷، بررسی خاصیت ضدمیکروبی اسانس بذرهای شوید (*Anethum gravelones*) و گشنیز (*Coriangrum stivum*) بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی O157:H7، سالمونلا تیفی‌موریـوم بـا اسـتفاده از آزمایش حساسیت رقت در محیط مایع. مجله پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران. ۴ (۱(نیمسال اول))، ص ۶۸-۵۹.

Ahmadi, F, Kadivar, M., and Shahedi, M., 2007, Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima Mozaff* in model and food systems, Food Chemistry, 105, 57-64.

Arabshahi, D. S., and Urooj, A., 2006, Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica L.*) leaves, Food Chemistry, 102, 1233-1240.

Barreira, G. C. M., Ferreira, I. C. F. R., Oliveira, M. B. P. P., and Pereira, J. A., 2008, Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower,leaf, skins and fruit, Food Chemistry, 107, 1106-1113.

Burt, S., 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review, International Journal of Food Microbiology, 94, 223-253.

Chang, C., Yang, M., Wen, H., and Chern., J., 2002, Estimation of total flavonoid content in propolis by two

complementary colorimetric methods, Journal of Food & Drug Analaysis, 10, 178-182.

Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., and Larondelle, Y., 2007, Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz and Pavon) tubers, Separation and Purification Technology, 55, 217-225.

Ferreres, F., Sousa, C., Valento, P., Seabra, R. M., Pereira, J. A., and Andrade, P. B., 2007, Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata DC*) seeds: phytochemical characterization and antioxidant potential, Food Chemistry, 101, 549-558.

Gao, X., Björk, L., Trajkovski, V., and Uggla, M., 2000, Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test sysyem. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 80, 2021-2027.

Gülçin, İ., Oktay, M., Kıreçcr, E., and Küfrevıoğlu, İ. Ö., 2003, Screening of antioxidant and antimicrobial activites of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts, Food Chemistry, 83, 371-382.

Jung, C. H., Seog, H. M., Choi, I. W., Park, M. W., and Cho, H. Y., 2006, Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves, LWT, 39, 266-274.

Kiss, A. K., Derwinska, M., and Granica, S., 2011, Quantitative analyss of biologically active polyphenols in evening primrose (*Oenothera paradoxa*) seeds aqueous extracts. Journal of Food and Nutrition Sciences, 61(2), 109 - 113.

Kotzekidou, P., Giannakidis, P., and Boulamatsis, A., 2008, Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate, LWT, 41, 119-127.

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

Lapornik, B., Prošek, M., and Wondra, A. G., 2005, Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time, Journal of Food Engineering, 71, 214-222.

Natonal committee for clinical laboratory standards, 2000, Methods for dilution antimicrobial suspectibility tests for bacteria that grow aerobically (5^{th} ed.). Approved standard, M7-A5. Pennsylvania: Wayne.

Negi, P.S., and Jayaprakasha, 2003, Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts, Journal of food science, 68(4), 1473-1477.

Niklova, I., Schmidt, S., Habalova, K., and Sekretar, S., 2001, Effect of evening primrose extracts on oxidative stability of sunflower and rapeseed oils, European Journal of Lipid Science and Technology, 103, 299 - 306.

Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, Azizi, M., and Bassami, M. R., 2010, Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens, Food Chemistry, 120, 756-770.

Shahidi, F., 1997, Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications, AOCS Press, Champaign, Illinois, Pp: 1.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., and Nakamura, T., 1992, Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 945-948.

Singh, G., Maurya, S., Delampasona, M. P., 2007, Acomparison of chemical antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents, Food and Chemical Toxicology, 45, 1650-1661.

Slinkard, K., and Singleton, V. L., 1977, Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods, American Journal of Enology and Viticulture, 28, 49-55.

Tian, F., Li, B., Ji, B, Yang, J., Zhang, G., Chen, Y., Luo, Y., 2009, Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinesis*: The polarity affects the bioactivities, Food Chemistry, 113(1), 173-179.

Tim Cushnie, T. P., Lamb, A. J., 2005, Antimicrobial activity of flavonoids, International journal of antimicrobial agents, 26, 343-356.

Tsao, R., and Deng, Z., 2004, Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals, Journal of Chromatography, 812, 85-99.

Uma, D. B., Ho, C. W., and Aida, W. M. W., 2010. Optimization of Extraction parameters of total phenolic compounds from henna (*Lawwsonia inermis*) Leaves. Sains Malaysiana. 39(1): 119-128.

Yildirim, A., Mavi, A., and Kara, A. A., 2001, Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4083-4089.

Zahradniklova, L., Schmidtz, S., Sekelyova, Z., and Sekretar, S., 2008, Fractionation and identification of some phenolics extracted from evening primrose seed meal, Czech Journal of Food Science, 26(1), 58 – 64.

Zhu, Q. Y., Hackman, R. M., Ensunsa, J. L., Holt, R. R., and Keen, C. L., 2002, Antioxidant activities of oolong tea, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 6929-6934.

Zou, Y. P., Lu, Y. H., Wei, D. Z., 2004, Antioxidant activity of flavonoid rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 52, 5032-5039.