دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر
فصلنامه‌ی کاربرد شیمی در محیط زیست

سال هفتم شماره‌ی ۲۵
زمستان ۱۳۹۴، صفحات ۳۰-۲۳

تعیین محتوای فلاونوییدی عصارۀ گیاه Artemisia absinthium جمع‌آوری شده از استان اردبیل

فاطمه قدمی
دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه آموزشی فیتوشیمی و شیمی فناوری اسانس، دانشکده شیمی دارویی، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

محبوبه طاهرخانی
استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تاکستان، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی، تاکستان، ایران
Email: mahtaherkhani@yahoo.com, mah.taherkhani@tiau.ac.ir

نوشین اصول دینی
استادیار، دانشکده شیمی دارویی، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده
گیاه Artemisia absinthium متعلق به خانواده کمپوزیته و از تیره کاسنی می‌باشد. وجود ترکیبات سزکوئی ترپنی و فلاونوییدی در گونه A. absinthium گزارش شده است. مهم‌ترین اثر این گیاه، کاربرد آن در درمان بیماری ناشی از برای دفع کرم روده می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات فلاونوییدی عصاره این گیاه می‌باشد. محتوای تام فلاونوییدی با حلال‌های اتیل استات، متانول و هیدروالکلی به روش اسپکتروفوتومتری و توسط کاتچین به‌عنوان استاندارد انجام شد. محتوای فلاونوئیدی عصارۀ اتیل استاتی بیش‌تر از عصارۀ هیدروالکلی و عصارۀ هیدروالکلی بیش‌تر از متانولی به‌دست آمد. نتایج نشان داد که عصارۀ گیاه افسنطین از محتوی فلاونوئیدی بالایی برخوردار بوده و مستلزم تحقیقات بیش‌تر و جامع‌تری می‌باشد.

کلید واژه‌ها: Artemisia absinthium، خانواده کاسنی، محتوای فلاونویید، ایران.

مقدمه

دیرینه آشنایی انسان با گیاهان دارویی و استفاده از آن‌ها با سرآغاز آفرینش او همزمان است و شواهد باستانی، این زمان را حداقل تا پنج هزار سال پیش از میلاد مسیح تخمین می‌زنند. در آثار افتخارآمیز دانشمندان ایرانی نیز متون با ارزشی در این مورد به ثبت رسیده و مورد توجه سراسر جهان قرار گرفته است. تأثیر درمانی گیاهان دارویی از زمان‌های پیش برای انسان شناخته شده و بروز اثرات درمانی مناسب و عدم عوارض جانبی از عوامل افزایش مصرف فرآورده‌های دارویی حاصل از آن‌ها در دهه‌های اخیر می‌باشد. در ضمن با استفاده از تنوع آب و هوایی و شرایط اکولوژیکی متنوعی که کشور ایران از آن برخوردار است، می‌توان گیاهان باارزشی را با درصد بالای مواد مؤثره کشت و برداشت نمود و در راستای طب سنتی و گیاه‌درمانی نوین از آن بهره جست. عصاره‌های گیاهی دارای ترکیبات طبیعی فراوانی هستند که حاصل از متابولیسم ثانویهٔ گیاهان می‌باشند. این ترکیبات طبیعی به‌طور وسیعی در صنایع آرایشی و بهداشتی، غذایی و دارویی به‌عنوان مواد معطر، آنتی‌اکسیدان، ضد قارچ و باکتری، نگهدارنده و... به‌کار می‌روند. امروزه تحقیقات در جهت یافتن آنتی‌اکسیدان‌هایی با منشأ گیاهی پیش می‌روند [۱]. در این تحقیق از گیاه افسنطین با نام علمی Artemisia absinthium از خانواده (Asteraceae) و تحت خانواده (Asteroideae) و از گیاهان معطر بومی به‌خصوص در نواحی شمالی و شمال‌غربی و شرق ایران بوده در ایران با نام‌های خاراگوش، گندواش، مروه و آفسنطین معروف است [۲]؛ که در طب سنتی در بی‌اشتهایی، گاستربت، درد روده،بیماری‌های کبدی، نفخ، آنمی، قاعدگی‌های نامنظم، تب‌های متناوب و انگل‌های روده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. افسنطین گیاهی است چندساله و علفی با ارتفاع ۵۰ تا ۱۰۰ سانتی‌متر که دارای برگ‌ها و ساقه‌های نقره‌ای رنگی می‌باشد. گلچه‌های زبانه‌ای و لوله‌ای شکل در این گیاه به فرم گل‌آذین کاپیتول (کلاپرک) دیده می‌شوند و میوه آن فندقه‌ای به رنگ قهوه‌ای روشن می‌باشد. در تکثیر با بذر معمولا بذور را در اوایل بهار در خزانه هوای آزاد کشت می‌نمایند و نشاهای حاصله را در پاییز به زمین اصلی منتقل می‌نمایند. تقسیم بوته شامل تقسیم گیاهان ۳ تا ۴ ساله به ۱۰ تا ۱۵ گیاه کوچک می‌گردد که در زمین اصلی کشت خواهند شد. برداشت شامل قطع گیاهان از ارتفاع ۴۰ سانتی‌متری زمین می‌باشد که معمولا در زمان گل‌دهی گیاه این عمل انجام می‌گیرد [۳-۴]. از این‌رو هدف از این تحقیق تعیین محتوای فلاونوییدی عصارهٔ گیاه A. absinthium جمع‌آوری‌شده از استان اردبیل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاه

گونهٔ گیاهی Artemisia absinthium از منطقه نمین، استان اردبیل در شمال‌غربی ایران در تیرماه ۹۴ جمع‌آوری شد. گیاهان جمع‌آوری‌شده نیز جهت استفاده در مرحله عصاره‌گیری در دمای محیط خشک و سپس آسیاب شدند.

مواد شیمیایی و معرف‌ها

تمامی مواد شیمیایی، معرف‌ها و استانداردهای استفاده شده از شرکت‌های Merck، Sigma-Aldrich و Fluka خریداری شدند.

دستگاه‌ها

به‌منظور تهیهٔ عصاره خشک از دستگاه روتاری مدل EL 131 ساخت کشور آلمان مجهز به حمام آب گرم مدل

BUCHI 461 استفاده شد و برای اندازه‌گیری محتوای فلاونوییدی از دستگاه اسپکتروفوتومتر فرابنفش مدل PC X-ma 2000 ساخت شرکت Human corporation استفاده شد. برای توزین مواد از ترازوی مدل AND HR-200 ساخت ژاپن با دقت ۴ رقم اعشار (۰/۰۰۰۱) استفاده گردید.

عصاره‌گیری

عصاره گیاه طبق روش Lin و همکاران تهیه شد [۵]. بدین ترتیب که ۳ گرم پودر خشک در مقداری حلال با دو روش مختلف کاربرد امواج فراصوت و خیساندن عصاره‌گیری شد. حلال‌های مورد استفاده یکی از محلول‌های شامل متانول ۸۰٪، متانول و اتیل استات است که در مقالات متعدد به آن‌ها اشاره شده است. در روش اول استخراج، مخلوط نمونه و حلال در دمای اتاق در یک حمام اولتراسونیک به مدت ۲۰ دقیقه در معرض امواج فراصوت با قدرت ۴۰ MHz قرار گرفتند. در روش دوم، مخلوط نمونه و حلال به مدت ۷۲ ساعت درجای تاریک و دمای اتاق خیسانده شد [۵].

بررسی محتوای تام فلاونوییدی گیاه Total (flavonoid content)

محتوای تام فلاونوییدی موجود در عصارهٔ گیاه بر اساس روش Zhishen و همکارانش انجام شد [۶]. ابتدا ۰/۲۵ میلی‌لیتر از نمونه رقیق‌شده با غلظت (۰/۰۰۵ گرم بر میلی‌لیتر) به یک لوله حاوی ۱ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیرشده اضافه گردید. سپس ۰/۷۵ میلی‌لیتر از ۵٪ $NaNO_2$ و ۰/۰۷۵ میلی‌لیتر از ۱۰٪ $AlCl_3$ و ۰/۵ میلی‌لیتر از 1M NaOH در زمان صفر و پنج و شش دقیقه پشت سر هم اضافه شدند. نهایتاً حجم محلول واکنش به‌همراه آب دوبار تقطیرشده به میزان ۲/۵ میلی‌لیتر تنظیم گردید. جذب محلول به‌وسیله اسپکتروفوتومتر در طول‌موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای فلاونوئیدی موجود در هر عصارهٔ گیاه بر اساس میلی‌گرم catechin هم‌ارز (CE) بر گرم عصاره گیاه بیان شد [۶].

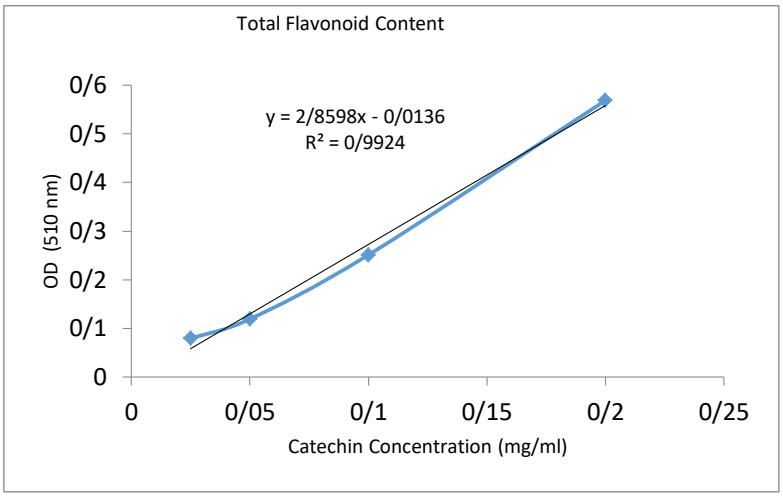
تجزیه‌وتحلیل آماری

برای آزمون مورد بررسی آزمایش در ۳ تکرار انجام شد و نتایج به‌دست آمده میانگین سه تکرار± انحراف معیار بودند. داده‌ها با کمک نرم‌افزار Excel آنالیز شدند.

یافته‌ها و بحث

محتوای تام فلاونوییدی گیاه

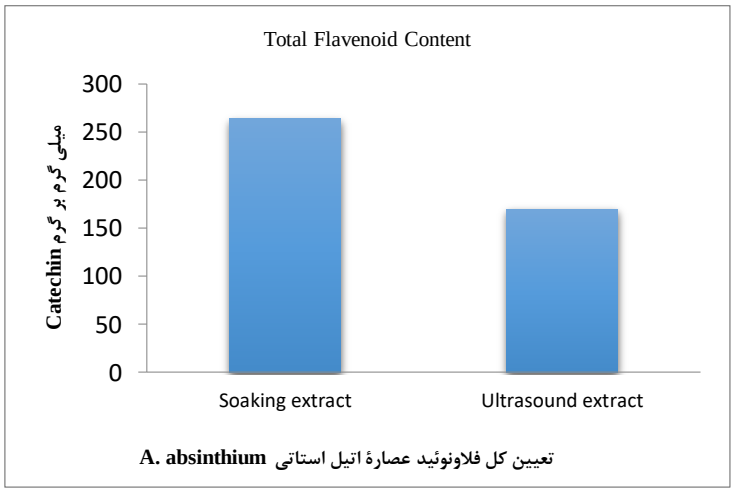
محتوای تام فلاونوییدی عصاره‌های گیاه برحسب میلی‌گرم کاتچین بر گرم نمونه و به‌صورت جدول ۱ تا ۳ به دست آمد. از کاتچین به‌عنوان یک فلاونوئید استاندارد استفاده شد (شکل ۱). نمودارهای مقایسه‌ای بین محتوای تام فلاونوییدی عصاره‌های گیاه به دو روش خیساندن و اولتراسونیک در شکل‌های ۲ تا ۴ به‌صورت مقایسه‌ای آورده شده است.



شکل ۱: منحنی استاندارد کاتچین

جدول ۱- تعیین محتوای تام فلاونوییدی عصاره برحسب میلی‌گرم کاتچین بر گرم نمونه

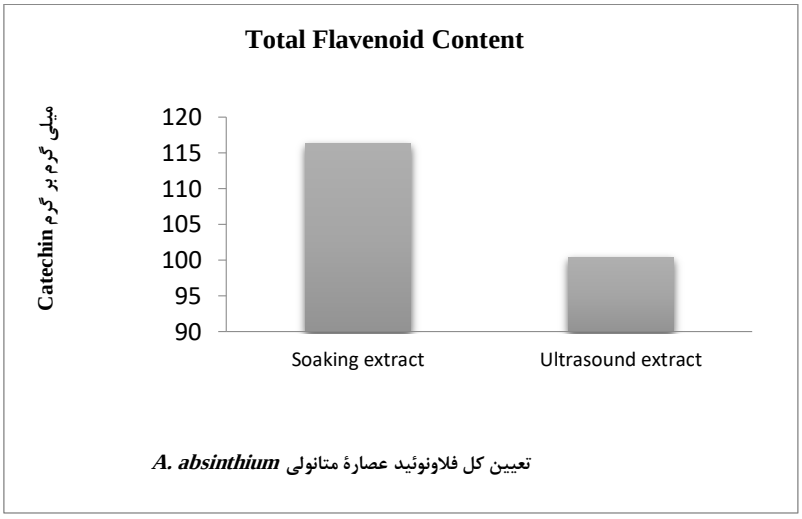
نوع حلال	روش عصاره گیری	محتوای فلاونوئیدی
اتیل استاتی	خیساندن	۲۶۳/۶ ± ۰/۰۰۰۲
اتیل استاتی	اولتراسونیک	۱۶۹/۲۹۶ ± ۰/۰۰۰۳۵



شکل ۲: تعیین کل فلاونویید عصاره اتیل استاتی برحسب میلی‌گرم کاتچین بر گرم نمونه

جدول ۲- تعیین محتوای تام فلاونوییدی عصاره برحسب میلی‌گرم کاتچین بر گرم نمونه

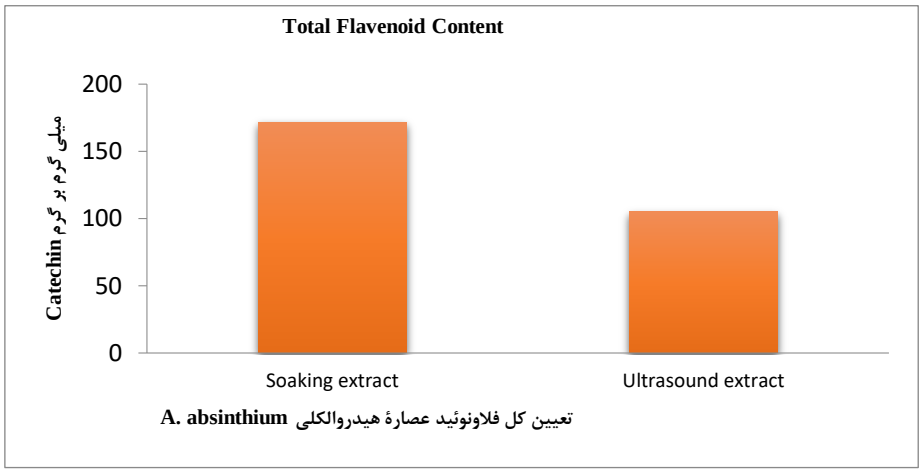
نوع حلال	روش عصاره گیری	محتوای فلاونوئیدی
متانولی	خیساندن	۱۱۶/۲۶ ± ۰/۰۰۰۹
متانولی	اولتراسونیک	۱۰۰/۴۰۸ ± ۰/۰۰۱۳



شکل ۳: تعیین کل فلاونویید عصاره متانولی بر حسب میلی‌گرم کاتچین بر گرم نمونه

جدول ۳- تعیین محتوای تام فلاونوییدی عصاره برحسب میلی‌گرم کاتچین بر گرم نمونه

نوع حلال	روش عصاره گیری	محتوای فلاونوئیدی
متانول ۸۰٪	خیساندن	۱۷۱/۴۸۸ ± ۰/۰۰۱
متانول ۸۰٪	اولتراسونیک	۱۰۴/۹۴۴ ± ۰/۰۰۰۶



شکل ۴: تعیین کل فلاونویید عصاره هیدروالکلی برحسب میلی‌گرم کاتچین بر گرم نمونه

در هر سه حلال محتوای تام فلاونوئیدی به روش خیساندن بیشتر از روش اولتراسونیک می‌باشد و میزان محتوی فلاونوئیدی عصارهٔ اتیل استاتی (۰/۰۰۰۲ ± ۲۶۳/۶) بیش‌تر از محتوی فلاونوئیدی عصارهٔ هیدرو الکلی (۰/۰۰ ± ۱۷۱/۴۸۸) و محتوای فلاونوئیدی عصارهٔ هیدروالکلی بیش‌تر از محتوی فلاونوئیدی عصارهٔ متانولی (۰/۰۰۰۹ ± ۱۱۶/۲۶) می‌باشد.

نتیجه‌گیری

بسیاری از ترکیبات طبیعی به‌دست آمده از گیاهان دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی هستند. ترکیبات شیمیایی موجود در عصارهٔ یک گیاه در بروز خواص بیولوژیکی آن تأثیر فراوانی دارند. برخی آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند از خطر اکسیداتیو توسط اکسیژن و نیتروژن واکنش‌دهنده، بروز بیماری‌های خاص مثل سرطان جلوگیری کنند. در این میان از جنس آرتمیزیا تاکنون اثرات بیولوژیکی و دارویی فراوانی گزارش شده است [۱]. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بیش‌تر در گیاهانی موجود می‌باشند که حاوی ترکیبات فنلی هستند. محتوای فنلی و ترکیبات گیاه به فاکتورهای ژنتیکی و محیطی وابسته می‌باشند. ترکیبات آنتی اکسیدانی فراوانی در گیاهان موجود می‌باشند و شناسایی تک‌تک آن‌ها کاری دشوار می‌باشد؛ بنابراین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با سنجش‌های مختلفی ارزیابی می‌گردند. عوامل متعددی مقدار ترکیبات فنولی موجود در بافت‌های گیاهی را تحت تاثیر قرار می‌دهند که از آن جمله می‌توان به فاکتورهای ژنتیکی میزان تابش نور خورشید، شرایط خاک، درجه رسیدگی در زمان برداشت و شرایط محیطی، آب‌وهوا، عملیات پس از برداشت و شرایط نگهداری اشاره کرد [۷]. حلالیت ترکیبات فنلی بسته به نوع حلال، درجه پلیمریزاسیون و برهمکنش آن‌ها با سایر ترکیبات وجود در بافت گیاهی متفاوت است. تحقیقات نشان داده است که حلال‌های اتانول و متانول به‌صورت مخلوط با آب (۴۰ تا ۸۰ درصد) توانایی بیش‌تری نسبت به حالت خالص در استخراج ترکیبات فنلی از بافت‌های گیاهی دارند [۸]. استفاده از حلال آب در عصاره گیری، با ایجاد یک محیط کاملا قطبی سبب می‌شود فقط مقدار کمی از ترکیبات فنلی با درجه قطبیت پایین استخراج گرند؛ بنابراین با افزودن آب به حلال‌های آلی و با تشکیل یک محیط نسبتا قطبی مقادیر

و انواع بیش‌تری از ترکیبات فنلی استخراج می‌شوند [۹]. ترکیبات فنولی (فلاونوئیدها و پروآنتوسیانیدین ها) مسئول توانایی آنتی‌اکسیدانی هستند به‌طوری که بسیاری از فلاونوئیدها به‌عنوان مهارکنندهٔ بالقوه بسیاری از آنزیم‌های متابولیک شناخته شده‌اند [۱۱-۱۰]. فنل ها و فلاونوئیدها به خاطر داشتن ظرفیت تداخل با عملکرد میتوکندری و دفع رادیکال‌های پروکسی و کاهش یا کلاته کردن آهن در آنزیم لیپواکسیژناز، از شروع فعالیت پراکسیداسیون لیپیدی و تولید رادیکال‌های آسیب رساننده به ماده ژنتیکی جلوگیری کرده و به‌عنوان عوامل اصلی ضد جهش‌زایی به کار می‌روند [۱۳-۱۲]. گزارش‌های متعددی همبستگی بین خاصیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی گیاهان را نشان می‌دهد، با این وجود قدرت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها وابسته به برخی ساختارهای، به‌ویژه تعداد و آرایش گروه‌های هیدروکسیل، حضور واحدهای دهنده و گیرنده الکترون در ساختار حلقه می‌باشد [۱۴]. در تحقیقات مشابه در مطالعه بر روی عصارهٔ اتانولی عصارهٔ A. absinthium جمع‌آوری شده از بخارست، میزان محتوای فنولیِ این عصاره برابر با (۱/۵۸ ± ۱۷۸/۷۶) میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصارهٔ خشک و میزان محتوای فلاونوئیدی آن برابر با (۲/۲۲ ±۵۲/۴۳) میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصارهٔ خشک به‌دست آمد [۱]. در مطالعهٔ مشابه در مورد گیاه A. absinthium از کشور هند، مشخص گردید که میزان محتوای فنولی در عصارهٔ اتانولی بیش‌تر (mg GAE/g ۰/۵۷±۴۳/۰۴۷۶) از عصارهٔ آبی (mgGAE/g ۲/۱۱ ± ۴۰/۰۰) و آن‌هم بیش‌تر از عصارهٔ کلروفرمی (mgGAE/g ۲/۳۹ ± ۲۸/۳۴) بوده است.

ولی میزان محتوای فلاونوئیدی در عصارهٔ اتانولی (mgQuE/g ۴۸/۷۸±۱۱۰۸/۱۵) بیش‌تر از عصارهٔکلروفرمی (mgQuE/g ۵۱/۲۶ ± ۶۶۷/۴۰) و آن‌هم بیش‌تر از آبی (mgQuE/g ۴۵/۹۳ ± ۵۵۰/۵۳) بوده است [۱۶].

در مطالعهٔ دیگری که بر روی عصارهٔ متانولی گیاه A.absinthium جمع‌آوری شده از ترکیه، میزان محتوای فنولیِ این عصاره برابر با ۱/۴۱ (۱۶۱/۸ میلی‌گرم بر لیتر) گالیک اسید و میزان محتوای فلاونوئیدی آن برابر با ۱/۴۱ ± ۵۷/۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر کوئرستین به‌دست آمد [۱۷] در جنس Artemisia وجود ترکیبات فنولی و سزکوئی ترپن به اثبات رسیده است [۱۸]. نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان داد که و میزان محتوی فلاونوئیدی عصارهٔ اتیل استاتی نسبت به هیدروالکلی (متانول ۸۰٪) دارای قدرت بالاتری و میزان محتوی فلاونوئیدی عصارهٔ هیدروالکلی (متانول ۸۰٪) دارای قدرت بالاتری نسبت به میزان محتوی فلاونوئیدی عصارهٔ متانولی در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از این گیاه به‌دست آمد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی به خاطر مساعدت در استفاده از تجهیزات و امکانات آزمایشگاهی تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

[1] Rustaiyan, A., Masoudi, S., 2011, Chemical constituents and biological activities of Iranian *Artemisia* species. Phytochemistry letters, 4: 440-447.

[2] Avijgan, M., 2004, *Aloe vera* gel as an effective and cheap option for treatment in chronic bed sores. Journal of Guilan University of medical Sciences, 13(50): 45-51.

[۳] زرگری، ع.، فصلنامه گیاهان دارویی، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ایران، ۱۳۷۵، ۱۱۳-۱۰۶ :(۶۱۲) ۶۰۵ .

[۴] محمدی، غ.، صبر زرد، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران، ایران، ۱۳۷۳، ۱۰-۱.

[5] Lin, M., Tsai, M., Wen, K. 1999, Supercritical fluid extraction of flavonoids from Scutellaria Radix. Chromatography A, 830: 387-395.

[6] Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999, The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem, 64(4): 555-559.

[7] Faller, ALK., Fialho, E., 2009, The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic coking. Food Research International, 42: 210-215.

[8] Suzuki, M., Watanabe, T., Miura, A., Harashima, E., Nakagawa, Y., Tsuji, K., 2002, An extraction solvent optimum for analyzing polyphenol contents by Folin-Denis assay. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi, 49: 507-511.

[9] Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., Larondelle, Y., 2007, Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashnua (Tropaeolum tubersum Ruiz and Pavon) tubers. Separation & Purification Technology, 55: 217-225.

[9] Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002, Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. Plant. Sci., 163(6): 1161-1168.

[11] Luthria, D.L., Mukhopadhyay, S., Krizek, D.T., 2006, Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. J. Food. Compos. Anal., 19: 771-777.

[12] Harman, D., 1992, Role of free radicals in aging and disease. Ann. N.Y. Acad. Sci., 673: 126-141.

[13] Kumaran, A., Karunakaran, R.J., 2007, In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five phyllanthus species from India. LWT. Food Sci. & Tech., 40(2): 344-352.

[14] Miliauskas, G., Van Beek, T.A., De Waard, P., Venskutonis, R.P., Sudholter, E.J.R., 2005, Identification of radical scavenging compounds in Rhaponticum carthamoides by means of LC-DAD-SPE-NMR. J. Nat. Prod., 68: 168-172.

[15] Moldovan, L., Gaspar, A., Toma, L., Craciunescu, O., Saviuc, C., 2011, Comparison of polyphenolic content and Comparison of polyphenolic content and antioxidant capacity of five Romanian traditional medicinal plants. Rev. Chim., (Bucharest); 62(3): 299-303.

[16] Singh, R., Kumar Verma, P., Singh, G., 2012, Total phenolic, flavonoids and tannin contents in different extracts of Artemisia absinthium. J. Intercult. Ethnopharmacol., 1 (2): 101-104.

[17] Baykanerel, S., Reznicek, G., GokhanSenol, S., 2012, Antimicrobial and antioxidant properties of Artemisia L. species from western Anatolia. Turk. J. Biol., 36: 75-84.

[18] Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H. J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002, Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. Plant Science, 163(6): 1161-1168.