

Antioxidant activity, total flavonoid and total phenolic contents of extracts taken from aerial parts of *Ballota platyloma* using three different methods: percolation, ultrasonic and polyphenolic fraction

Seyedalipour B^{1*}, Hasani A², Ebrahimzadeh MA³, Taravati A¹

1- Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I. R. Iran.

2- Department of Biochemistry, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Sanandaj, I. R. Iran.

3- Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I. R. Iran.

Received August 30, 2015; Accepted May 28, 2016

Abstract:

Background: The genus *Ballota* L. (BL) belongs to the Labiateae family spread throughout the world. Plants of this genus possess anti oxidant, anti cancer, anti microbial and anti inflammatory properties. This study aimed to investigate the antioxidant activities of extract taken from aerial parts of *Ballota platyloma* Rech. f. using percolation, ultrasonic and polyphenol fraction methods.

Materials and Methods: In this experimental study, aerial parts of *Ballota platyloma* were collected from Veresk (Mazandaran, Iran). Dried aerial parts of *Ballota platyloma* were extracted by percolation, ultrasonic and polyphenol fraction. The antioxidant activity of extracts was investigated using different methods: 1, 1-diphenyl- 2-picryl hydrazyl (DPPH), iron ion chelating activity and reducing power. Data were analyzed using ANOVA and Duncan test at a significant level of $P<0.05$.

Results: The total phenolic and total flavonoid contents were in order of polyphenol> ultrasonic > percolation, respectively. The IC_{50} for polyphenol, percolation and ultrasonic extracts in DPPH radical-scavenging activity were 7.52 ± 1.07 , 6.64 ± 0.87 and 2.58 ± 0.06 , respectively. The IC_{50} for iron chelating ability were in order of polyphenol < ultrasonic < percolation. Polyphenol fraction showed better reducing power than the ultrasonic and percolation extracts ($P<0.001$) which was comparable to that of Vitamin C ($P<0.05$).

Conclusion: The results showed that polyphenol fraction was rich in total phenolic and total flavonoid contents. Polyphenol fraction showed the best activity in reducing power but ultrasonic extracts was the most potent one in DPPH radical-scavenging activity. Thus, antioxidant activity may be attributed to the presence of phenols and flavonoids in the extracts.

Keywords: Antioxidant activity, *Ballota platyloma*, Flavonoids, Ultrasonic method, Polyphenol fraction

* Corresponding Author.

Email: b.alipour81@gmail.com

Tel: 0098 11 353 02450

Fax: 0098 11 353 02450

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2016; Vol. 20, No 2, Pages 147-156

Please cite this article as: Seyedalipour B, Hasani A, Ebrahimzadeh MA, Taravati A. Antioxidant activity, total flavonoid and total phenolic contents of extracts taken from aerial parts of *Ballota platyloma* using three different methods: percolation, ultrasonic and polyphenolic fraction. Feyz 2016; 20(2): 147-56.

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی، محتوی فنول و فلاونوئید تام عصاره های بخش هوای گیاه فراسیون آسای کجوری (*Ballota platyloma* Rech.f.) با سه روش التراسونیک، پلی- فنولیک و پرکولاسیون

باقر سیدعلی پور^{۱*}، علی حسنی^۲، محمدعلی ابراهیم زاده^۳، علی طراوتی^۱

خلاصه:

سابقه و هدف: جنس فراسیون آسا (*Ballota* L.) متعلق به خانواده نعناعیان (Labiatae) است که در سراسر جهان پراکنده می باشد. گیاهان این جنس خصوصیات آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد میکروبی و ضد التهابی از خود نشان می دهند. این مطالعه با هدف بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره قسمت هوایی گیاه *Ballota platyloma* با استفاده از روش های التراسونیک، پلی فنولیک و پرکولاسیون انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی قسمت های هوایی گیاه از منطقه ورسک استان مازندران جمع آوری شد. عصاره گیری با روش های التراسونیک، پلی فنولیک و پرکولاسیون انجام گرفت. فعالیت آنتی اکسیدانی با روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل، قدرت احیاکنندگی و میزان شلات کنندگی یون آهن مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: محتوی فنول و فلاونوئید تام به ترتیب بدین صورت بود: پلی فنول < التراسونیک < پرکولاسیون. میزان IC_{50} برای به دام اندازی رادیکال DPPH با سه روش پلی فنولی، پرکولاسیون و التراسونیک به ترتیب $7/52 \pm 0.7/1$ ، $64/6 \pm 87/0$ و $58/2 \pm 0.6/0$ به دست آمد. میزان IC_{50} برای شلات کنندگی یون آهن نیز به صورت زیر بود: پلی فنول > التراسونیک > پرکولاسیون. عصاره پلی فنولیک قدرت احیاء کنندگی بیشتری نسبت به عصاره اولتراسونیک و پرکولاسیون ($P < 0.001$) در مقایسه با ویتامین C نشان داد ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: نتایج فراکشن پلی فنولیک بالاترین مقدار پلی فنول و فلاونوئید تام را نشان داد. فراکشن پلی فنولیک بیشترین قدرت احیاء کنندگی و التراسونیک بیشترین فعالیت به دام اندازی رادیکال DPPH را نشان داد. بنابراین فعالیت آنتی اکسیدانی را می توان به حضور فنول ها و فلاونوئیدها در عصاره ها نسبت داد.

واژگان کلیدی: فعالیت آنتی اکسیدان، *Ballota platyloma*، محتوی فلاونوئید، عصاره التراسونیک، عصاره پلی فنولیک

دو ماه نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیستم، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۵، صفحات ۱۴۷-۱۵۶

مقدمه

آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که مانع فعالیت رادیکال های آزاد شده و از حملات اکسیداتیو آنها جلوگیری می کنند و با غیرفعال کردن آنها سلول های بدن را از اثرات مخرب این ترکیبات مصون نگه می دارند [۲]. مکانیزم اثر این آنتی اکسیدان ها به این ترتیب است که با دادن اتم هیدروژن به رادیکال آزاد تشکیل شده، از گسترش واکنش های زنجیره ای اکسیداسیون جلوگیری می کنند؛ لذا، کارائی و درجه تأثیر یک آنتی اکسیدان به سهولت جدا شدن اتم هیدروژن از آن مربوط می شود. بدیهی است که رادیکال آزاد به جا مانده از آنتی اکسیدان پس از دادن هیدروژن باید حتی الامکان خود سبب تولید رادیکال اسید چرب و آغاز اکسیداسیون نشود و در ضمن به سرعت توسط اکسیژن اکسید نگردد [۳]. در میان آنتی اکسیدان ها، ترکیبات فنولی از همه مؤثرتر می باشند؛ این ترکیبات به خوبی اتم هیدروژن را اهداء می کنند. هم چنین، حد واسط رادیکالی آنها به واسطه رزونانس پایدار است [۴]. امروزه استفاده از آنتی اکسیدان های سنتزی در پزشکی، کشاورزی و صنایع دارویی بسیار رواج یافته است [۵]. شواهد بسیار زیادی وجود دارد که سمیت و اثرات سوء مواد غذایی حاوی آنتی اکسیدان های سنتزی را تأیید می کند.

امروزه موضوع رادیکال های آزاد و گونه های فعال اکسیژن و اثرات آن بر سیستم های بیولوژیک یکی از مباحث مهم و مطرح در دانش پزشکی می باشد. رادیکال های آزاد ترکیبات مضر هستند که موجب تغییر در سلول های بدن، آسیب به هسته سلول ها و در نهایت مرگ آنها می شوند [۱]. این ترکیبات به صورت طبیعی در بدن تولید می شوند و در اثر مواجهه با سموم محیطی میزان آنها افزایش می یابد.

^۱ استادیار، گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران

^۲ کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات،

سندج، ایران

^۳ دانشیار، گروه شیمی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

*نشانی نویسنده مسئول:

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

دورنویس: ۰۱۱۳۵۳۰۲۴۵۰

تلفن: ۰۱۱۳۵۳۰۲۴۵۰

پست الکترونیک: b.alipour81@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۵/۳/۸

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۸

به همین دلیل یافتن آنتی اکسیدان های طبیعی به ویژه از منابع گیاهی و استفاده از آنها در پزشکی، کشاورزی و صنایع دارویی بسیار مطلوب است [۷،۶]. مطالعات نشان داده است که فعالیت آنتی اکسیدانی قسمت های پوست، برگ، ساقه، میوه و ریشه گیاهان به مقدار کل ترکیبات فنولی آنها بستگی دارد. ترکیبات فنولی یک گروه متابولیت های ثانویه آروماتیک گیاهی هستند که به طور گسترده ای در سراسر گیاه پخش شده اند و دارای تأثیرات بیولوژیکی متعدد همچون فعالیت آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد باکتریایی هستند [۸]. فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی در گیاهان عمدتاً به دلیل ویژگی های اکسایش-کاهش و ساختار شیمیایی آنها است که می توانند نقش های مهمی را در خنثی کردن رادیکال های آزاد، احاطه کردن فلزات واسطه و فرونشاندن مولکول های اکسیژن از طریق تغییر مکان یا تجزیه پراکسیدها ایفا کنند. این ویژگی ها با تأثیرات مفید آنتی اکسیدان های فنولی بر روی سلامت در ارتباط است که به دلیل تأثیرات بازدارندگی این ترکیبات در مقابل پیشرفت بسیاری از بیماری های وابسته به تنش اکسایشی، همچون بیماری قلبی-عروقی، سندرم روده التهابی و بیماری آلزایمر است. استرس اکسیداتیو ناشی از عدم توازن میان تولید اکسیژن فعال و خنثی شدن آن توسط سازوکارهای آنتی اکسیدانی، عامل ایجاد بسیاری از بیماری ها همچون پیری، انواع سرطان و بی نظمی های نورودژنراتیو همچون آلزایمر، پارکینسون و هانتینگتون می باشد [۹-۱۱]. طبق بررسی های به عمل آمده در تیره نعنای ۴۰۰۰ گونه و زیرگونه گیاهی شناخته شده است که دارای پراکندگی جغرافیایی وسیعی هستند؛ به طوری که در اغلب نواحی یافت می شوند، اما بیشترین پراکندگی را در منطقه مدیترانه دارا می باشند. گیاهان این تیره عموماً علفی، یک ساله و یا پایا و دارای ساقه های راست یا خزانده هستند [۱۲]. در بین گیاهان این تیره گونه های مفید به وفور یافت می شوند که در داروسازی و پزشکی مورد استفاده قرار می گیرند. برخی از گونه های نعنای جهت تولید اسانس در سراسر دنیا برای مصارف دارویی کشت می شود. گیاهان این تیره به علت دارا بودن خاصیت ضد التهابی، ضد اسپاسم و محرک بودن در طب سنتی جهت درمان تهوع، برونشیت، بی اشتها و ناراحتی کبدی استفاده می گردند [۱۳،۱۴]. جنس فراسیون آسا (*Ballota* L.) متعلق به تیره Lamiaceae می باشد. این جنس در ایران سه گونه گیاهی علفی چندساله دارد که شامل *Ballota nigra* L. (فراسیون آسای سیاه) و *Ballota aucheri* Boiss. و یک گونه انحصاری ایران *Ballota platyloma* Rech.f. می باشد. گونه مذکور یکی از گونه های اندمیک تیره نعنایان در ایران است که در شمال ایران نظیر دیلمان، خطیرکوه،

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی گیاه *Ballota platyloma* Rech.f. در بهار ۱۳۹۱ از منطقه ورسک استان مازندران با

مختصات جغرافیایی ۵۲ درجه و ۵۹ دقیقه طول شرقی و ۳۵ درجه و ۵۴ دقیقه عرض شمالی جمع آوری و توسط دکتری سیستماتیک گیاهی شناسایی گردید؛ نمونه هرباریومی گیاه مذکور در دانشکده بیولوژی دانشگاه آزاد قائم شهر به شماره ۳۹۳ نگهداری می شود. برای عصاره گیری از سه روش پرکولاسیون، پلی فنولیک و التراسونیک استفاده شد. 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. پانزده گرم از نمونه پودر شده با متانول ۸۰ درصد مخلوط شد. بعد از یک روز ماندگاری، فاز آلی با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ جدا گردید و این عمل سه بار تکرار شد. در نهایت کل عصاره جمع آوری گردید و از دستگاه تبخیر کننده چرخان برای حلال پراکنی استفاده شد. برای حذف کامل آب و تهیه پودر نیز از فریز درایر استفاده گردید. در روش عصاره گیری همراه با امواج فراصوت از امواج غیرمستقیم التراسونیک با فرکانس ۱۰۰ کیلو هرتز در دمای ۲۵ درجه به مدت یک ساعت استفاده شد. برای این منظور ۱۵ گرم از نمونه پودر شده با ۲۰۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد به مدت یک ساعت در حمام التراسونیک قرار گرفت. هر ۲۰ دقیقه حلال را عوض کرده، این عمل ۳ بار تکرار شد. در نهایت کل عصاره جمع آوری گردید و از دستگاه تبخیر کننده چرخان برای حلال پراکنی استفاده شد و برای حذف کامل آب و تهیه پودر از فریز درایر استفاده شد [۱۸]. در روش استخراج پلی فنولیک، ابتدا مقدار ۲۰ گرم از نمونه پودر شده با ۲۵۰ میلی لیتر حلال (متانول، استون و آب) به ترتیب با نسبت های ۳/۵، ۳/۵ و ۳ که حاوی فرمیک اسید ۱ درصد بود، مخلوط گردید. نمونه به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت و سپس صاف شد. با استفاده از دستگاه تبخیر کننده چرخان و با تنظیم دمای ۳۵ تا ۴۰ درجه حلال پراکنی انجام شد؛ در این صورت با توجه به دمای تنظیم شده استون و متانول حذف می شوند. سپس ماده از دستگاه جدا شده و محتویات آن داخل یک قیف جداکننده ریخته شده و طی دو مرحله و در هر مرحله ۵۰ میلی لیتر پترولیوم اتر به آن اضافه شد. این عمل جهت جدا کردن پیگمان ها استفاده شد. پس از آن فاز اتری رویی جدا شده و به فاز آبی باقی مانده طی ۳ مرحله اتیل استات (۱:۱) اضافه شد و در پایان اتیل استات حلال پراکنی شده و در نهایت فریز و خشک شد [۱۹].

اندازه گیری محتوای تام فنولی و فلاونوئیدها

محتوای تام فنولی از طریق روش فولین سیوکالتیو انجام شد [۲۰]؛ بدین منظور غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از هر

عصاره (در متانول) تهیه شد. مقدار ۰/۵ میلی لیتر از هر عصاره با ۲/۵ میلی لیتر واکنش گر ۰/۲ نرمال فولین سیوکالتیو مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه هم زده شد. سپس ۲ میلی لیتر محلول کربنات سدیم با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه شد. جذب نمونه ها پس از ۲ ساعت توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراء بنفش در طول موج ۷۶۰ نانومتر در مقابل بلانک اندازه گیری شد. سپس، محتوای تام فنولی عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی گرم گالیک اسید در هر یک گرم عصاره اندازه گیری شد. میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره از طریق روش های رنگ سنجی ارزیابی شد [۲۱]. غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از هر عصاره تهیه شد. به ۰/۵ میلی لیتر از نمونه (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ 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 اسپکتروفوتومتر مرئی-ماوراء بنفش بررسی شد. کوئرتستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید بر اساس میزان معادل میلی گرم کوئرتستین در گرم عصاره (ماده خشک) گزارش گردید.

فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد

رادیکال پایدار دی فنیل پیکریل هیدرازیل برای تعیین فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد به کار رفت. به ۱ میلی لیتر از عصاره (۴۰ میلی گرم در ۲۵ میلی لیتر)، ۱ میلی لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه شد؛ مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک انکوبه شد. جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد [۲۲]. در این روش ویتامین C (آسکوربیک اسید) به عنوان استاندارد استفاده شد. آزمایشات سه بار تکرار شد و میانگین آنها گزارش گردید. میزان IC_{50} به معنی غلظتی از هر عصاره که لازم است تا ۵۰ درصد رادیکال ها پاک سازی شوند، برای عصاره ها تعیین شد. در این آزمایش غلظت های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر برای همه عصاره ها تهیه شد. در نهایت درصد به دام اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\left(\frac{A_C - A_S}{A_C} \right) \times 100$$

A_C = جذب کنترل؛ و A_S = جذب نمونه یا استاندارد

نتایج

در این پژوهش، درصد بازده انواع عصاره‌های پرکولا-سیون، التراسونیک و پلی فنولیک بخش هوایی گیاه *Ballota Platyloma* متفاوت بود. پس از انجام فرآیند عصاره‌گیری وزن عصاره‌ها محاسبه شد و بازده هریک از آنها گزارش شد.

جدول شماره ۱- بازده استخراج بخش هوایی گیاه *Ballota*

<i>Platyloma</i> براساس روش‌های مختلف عصاره‌گیری			
عصاره گیاه	وزن خشک گیاه (گرم)	مقدار عصاره به دست آمده (گرم)	بازده
پرکولاسیون	۱۵	۱/۷۳	۱۱/۵۳٪
التراسونیک	۱۵	۱/۳۲	۸/۸٪
پلی فنولیک	۲۰	۱/۴۱	۷/۰۵٪

ارزیابی محتوی فنول و فلاونوئید تام عصاره‌ها

محتوی تام فنولی با متد فولین سیوکالتیو براساس معادله خط منحنی استاندارد گالیک اسید به صورت زیر محاسبه شد: ($Y=0.0054X+0.0583$, $R^2=0.999$). محتوی تام فنولی برای عصاره متانولی حاصل از روش‌های پلی فنولیک، التراسونیک و پرکولاسیون به ترتیب $50/206 \pm 98/12$ ، $56/177 \pm 43/7$ و $33/1 \pm 33/1$ میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره به دست آمد. محتوی تام فنولی اندازه‌گیری شده با استفاده از روش‌های مختلف استخراج تفاوت معنی‌داری را نشان دادند ($P=0/001$). با انجام آنالیز تعقیبی دانکن مشخص شد که محتوی تام فنولی حاصل از هر سه روش استخراج تفاوت معنی‌داری در سطح $0/05$ باهم دارند؛ به نحوی که بیشترین محتوی فنولی تام برای روش پلی-فنولیک مشاهده شد و بعد از آن به ترتیب برای روش‌های التراسونیک و پرکولاسیون. همچنین، محتوی فلاونوئید تام نمونه‌ها با معادله خط استاندارد کوئرتستین به صورت ($Y=0.0064X-$, $R^2=0.999$, 0.010) محاسبه شد. محتوی تام فلاونوئید موجود در عصاره متانولی حاصل از روش‌های پلی فنولیک، التراسونیک و پرکولاسیون به ترتیب $14/40 \pm 0/1$ ، $87/31 \pm 62/0$ و $56/0 \pm 84/29$ میلی گرم کوئرتستین در گرم عصاره به دست آمد. محتوی تام فلاونوئید اندازه‌گیری شده با استفاده از روش‌های مختلف استخراج تفاوت معنی‌داری را نشان دادند ($P<0/001$). با انجام آنالیز تعقیبی دانکن مشخص شد که محتوی تام فلاونوئید حاصل از هر سه روش استخراج تفاوت معنی‌داری در سطح $0/05$ باهم دارند؛ به نحوی که بیشترین محتوی فلاونوئید تام برای روش پلی فنولیک مشاهده شد و بعد از آن به ترتیب برای روش‌های التراسونیک و پرکولاسیون (جدول شماره ۲).

بررسی قدرت احیاء کنندگی

قدرت احیاء کنندگی عصاره‌ها از طریق روش Yen و Chen ارزیابی شد [۲۳]. مقادیر مختلفی از هر عصاره (۵۰-۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در آب با $2/5$ میلی‌لیتر بافر فسفات $0/2$ مولار ($pH=6/6$) و $2/5$ میلی‌لیتر محلول 1 درصد پتاسیم فری سیانید [$K_3Fe(CN)_6$] مخلوط شد. مخلوط مربوطه در دمای 50 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه انکوبه شد. پس از افزودن $2/5$ میلی‌لیتر از محلول 10 درصد تری کلرواستیک اسید به عنوان متوقف کننده واکنش، مجموعه به مدت 10 دقیقه با دور 3000 سانتریفوژ شد. فاز فوقانی با آب مقطر و محلول $0/1$ درصد فریک کلراید ($FeCl_3$) مخلوط شده و بلافاصله جذب محلول در طول موج 700 نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شد و میانگین آنها گزارش گردید. افزایش جذب در مخلوط واکنش به-مفهوم افزایش قدرت احیاء کنندگی (آنتی اکسیدانی) خواهد بود. آسکوربیک اسید به عنوان شاهد مثبت برای مقایسه به کار گرفته شد.

ارزیابی میزان شلات کنندگی آهن II

برای اندازه گیری میزان شلاته کنندگی آهن از روش دینز استفاده شد [۲۴]. به 5 میلی‌لیتر از هر عصار (۵۰-۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) $0/1$ میلی‌لیتر محلول 2 میلی‌مولار کلرید آهن II و یک میلی‌لیتر محلول 5 میلی‌مولار فروزین اضافه شد و پس از 10 دقیقه انکوبه شدن در دمای محیط، جذب محلول در طول موج 562 نانومتر قرائت شد. EDTA به عنوان کنترل مثبت به-کار رفت و فعالیت شلاته کنندگی آهن برحسب اکی‌والان Na_2EDTA در گرم عصاره بیان شد. درصد مهار تشکیل کمپلکس آهن-فروزین با کمک فرمول زیر محاسبه شد: $[(A_0 - A_s)/A_s] \times 100$ جذب کنترل و A_s جذب عصاره یا استاندارد می‌باشد.

آنالیز آماری

داده‌ها پس از جمع‌آوری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۲ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. برای بررسی نتایج و مقایسه میانگین عصاره‌های مختلف از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه ANOVA جهت مقایسه کلی و پس از آزمون دانکن جهت مقایسه زیر گروه‌ها استفاده شد. تمامی اندازه‌گیری‌ها برای هر نمونه سه بار تکرار شد و مقادیر به صورت میانگین- $\pm$ انحراف معیار گزارش گردید. مقادیر IC_{50} از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت‌های مربوطه به دست آمد.

جدول شماره ۲- مقایسه محتوای فنولی و فلاونوئیدی تام عصاره‌های مختلف بخش هوایی گیاه *Ballota platyloma*

روش عصاره‌گیری				
P	پركولاسيون	التراسونيك	پلی فنوليك	
۰/۰۰۱	۷۲/۱۵۷ ± ۳۳/۱a	۷۶/۱۷۷ ± ۴۳/۷b	۵۰/۲۰۶ ± ۹۸/۱۲c	فنول تام ^۱
<۰/۰۰۱	۸۴/۲۹ ± ۵۶/۰a	۸۷/۳۱ ± ۶۲/۰b	۱۴/۴۰ ± ۰۱/۱c	فلاونوئید تام ^۲

^۱ میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره؛ ^۲ میلی گرم کونستین اسید در گرم عصاره

سنجش میزان شلاته کنندگی آهن II

نتایج این تحقیق نشان داد عصاره متانولی بخش‌های هوایی گیاه *Ballota platyloma* قابلیت اتصال به آهن را دارا می‌باشد. عصاره روش پركولاسيون نسبت به عصاره‌های التراسونيك و پلی فنوليك دارای قدرت شلاته کنندگی بیشتری بود؛ به طوری که در غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر درصد شلاته کنندگی عصاره‌های بخش‌های هوایی گیاه به ترتیب ۹۰/۰۸±۱/۱۰، ۸۱/۹۹±۰/۵۹ و ۶۴/۷۱±۲/۹۹ به دست آمد. IC₅₀ برای شلاته کنندگی عصاره‌های پركولاسيون، التراسونيك و پلی فنوليك به ترتیب ۲۳۷/۲۷±۵۹/۱۱ و ۱۵۱/۳۵±۰/۰۰، ۸۳/۱۹±۲/۷۱ برحسب میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد. این درحالی است که میزان شلاته کنندگی برای استاندارد EDTA مقدار ۱۴/۶۹±۳۰/۲ میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد. آنالیز آماری نشان داد که برای میزان شلاته کنندگی بین تمامی روش‌ها و همچنین استاندارد تفاوت معنی داری وجود دارد ($P < ۰/۰۰۱$). همان‌طور که در جدول شماره ۳ نشان داده شده است، عصاره به دست آمده از روش پركولاسيون بهترین فعالیت شلاته کنندگی را از خود نشان داده است و بعد از آن بهترین فعالیت شلاته کنندگی به ترتیب برای روش‌های التراسونيك و پلی فنوليك مشاهده شد.

فعالیت به دام اندازی رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)

نتایج این تحقیق نشان داد عصاره متانولی بخش‌های هوایی گیاه *Ballota platyloma* حاصل از روش‌های پلی-فنوليك، التراسونيك و پركولاسيون توانایی خوبی در به دام اندازی و مهار رادیکال DPPH دارند. میانگین و انحراف معیار مقادیر IC₅₀ برای عصاره‌های پركولاسيون، التراسونيك و پلی فنوليك به ترتیب برابر ۶۴±۰/۸۷، ۵۸±۰/۰۶، ۷۵±۰/۷۱ و برای استاندارد ویتامین C ۳/۶۱±۰/۰۳ برحسب میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد. فعالیت به دام اندازی رادیکال DPPH اندازه‌گیری شده با استفاده از روش‌های مختلف استخراج تفاوت معنی داری را نشان دادند ($P = ۰/۰۰۵$). بنابراین، با تجزیه و تحلیل داده‌ها نتیجه می‌گیریم که همه عصاره‌های حاصل از این گیاه در غلظت مهار ۵۰ درصد توانایی خوبی در مهار رادیکال DPPH دارند. به دلیل اینکه تفاوت معنی داری بین عصاره حاصل از استخراج به روش التراسونيك و ویتامین C در مهار رادیکال DPPH وجود ندارد می‌توان نتیجه گرفت که عصاره حاصل از این روش توانایی خوبی در حد ویتامین C در مهار رادیکال DPPH از خود نشان می‌دهد. تفاوت معنی داری بین عصاره‌های حاصل از استخراج با روش‌های پركولاسيون و پلی فنوليك مشاهده نشد، اما با روش التراسونيك تفاوت معنی داری داشتند.

جدول شماره ۳- بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف بخش هوایی گیاه *Ballota platyloma*

روش عصاره‌گیری					
P	استاندارد	پركولاسيون	التراسونيك	پلی فنوليك	
۰۰۵/۰	۶۱/۳±۰۳/۰ ^a	۶۴/۶±۸۷/۰ ^b	۵۸/۲±۰۶/۰ ^a	۵۲/۷±۰۷/۱ ^b	فعالیت به دام اندازی DPPH IC ₅₀ (μg/ml)
<۰۰۱/۰	۶۹/۱۴±۳۰/۲ ^a	۱۹/۸۳±۷۱/۲ ^b	۳۵/۱۵۱±۰۰/۰ ^c	۲۷/۲۳۷±۵۹/۱۱ ^d	میزان شلاته کنندگی آهن IC ₅₀ (μg/ml)

*حروف متفاوت در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد است؛ *مقادیر IC₅₀ تست DPPH برحسب میکروگرم بر میلی لیتر برای ویتامین C برابر ۶۱/۳±۰۳/۰؛

*مقادیر IC₅₀ تست شلاته کنندگی برحسب میکروگرم بر میلی لیتر برای EDTA برابر ۶۹/۱۴±۳۰/۲

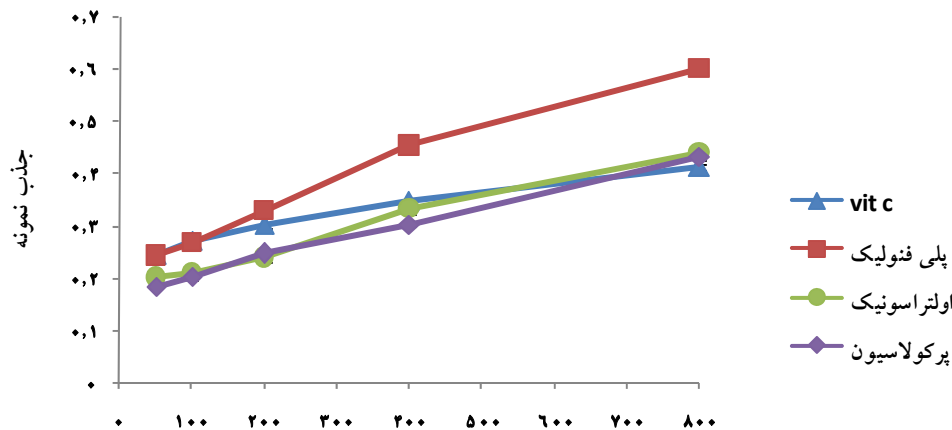
قدرت احیاء کنندگی عصاره‌ها

در بررسی قدرت احیاء کنندگی جذب نور با قدرت احیاء کنندگی رابطه مستقیم دارد. نمودار شماره ۱ منحنی غلظت-جذب را در عصاره‌های به دست آمده از روش‌های پركولاسيون، التراسونيك و پلی فنوليك نشان می‌دهد که تفاوت معنی داری بین

سونيك و پلی فنوليك نشان می‌دهد که تفاوت معنی داری بین گروه‌ها وجود دارد ($P < ۰/۰۰۱$). همان‌طور که در نمودار مشخص است قدرت احیاء کنندگی تمام عصاره‌ها با افزایش غلظت زیاد می‌شود؛ به طوری که عصاره پلی فنوليك نسبت به سایر عصاره‌ها

استاندارد ویتامین C هم بالاتر بود.

جذب بیشتری داشته است؛ یعنی با افزایش غلظت قدرت احیاء کنندگی بیشتری را نشان داد. فعالیت عصاره پلی فنولیک حتی از



غلظت (میکرو گرم بر میلی لیتر)

شکل شماره ۱- مقایسه قدرت احیاء کنندگی عصاره های پرکولاسیون، التراسونیک و پلی فنولیک بخش های هوایی گیاه *Ballota platyloma* با استاندارد ویتامین C

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که گیاه *Ballota platyloma* مانند بسیاری از گیاهان حاوی ترکیبات آنتی اکسیدانی می باشد که با روش های مختلف عصاره گیری استخراج می شوند. استخراج این ترکیبات به عوامل متعددی بستگی دارد که مهم ترین آنها نوع حلال و روش استخراج می باشند [۲۵]. هر روش، راندمان استخراج متفاوتی دارد. بنابراین انتخاب روش مناسب استخراج می تواند غلظت آنتی اکسیدان های موجود در عصاره مربوط به گیاه را افزایش دهد. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین بازده استخراج مربوط به روش پرکولاسیون و کمترین آن مربوط به روش پلی فنولیک بود. فنول ها و ترکیبات پلی فنولی، مانند فلاونوئیدها به طور گسترده در بسیاری از مواد غذایی با منشأ گیاهی یافت می شوند و می توانند اثرات آنتی اکسیدانی بسیار بالایی داشته باشند [۲۶]. پلی فنول ها ترکیبات آنتی اکسیدانی هستند که در بسیاری از ترکیبات طبیعی وجود دارند. خاصیت آنتی اکسیدانی این مواد به گروه های آروماتیک و هیدروکسیل فراوان موجود در ساختارشان نسبت داده می شود؛ یکی از مکانیسم های محتمل برای این مواد، به دام اندازی رادیکال های آزاد از طریق الکترون های جفت شده موجود در اطراف حلقه آروماتیک آن ها است که این توانایی ناشی از وجود پیوندهای هیدروژنی حلقه آروماتیک است [۲۷]. فلاونوئیدها نیز بزرگترین دسته پلی فنول ها هستند که به طور گسترده در رژیم غذایی انسان وجود دارند و دارای ساختمان بنزوپیرن

می باشد. مطالعات نشان داد که افزایش سطح فلاونوئیدها در رژیم غذایی، می تواند منجر به کاهش برخی بیماری ها در انسان شود [۲۸]. مکانیسم عمل فلاونوئیدها برای بروز اثر آنتی اکسیدانی به صورت جمع آوری رادیکال های آزاد نظیر سوپراکسید، آنیون ها، رادیکال های پراکسید چربی و رادیکال های هیدروکسیل می باشد. علاوه بر این، توانایی به دام اندازی اکسیژن منفرد و شلات کردن فلزات را نیز دارند. جهت ارزیابی محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی موجود در عصاره های متانولی گیاه *Ballota platyloma*، از روش فولین سیوکالتو و روش رنگ سنجی استفاده شد. باتوجه به نتایج به دست آمده این تحقیق، عصاره به دست آمده از روش پلی فنولیک محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی بیشتری نسبت به عصاره های حاصل از روش های التراسونیک و پرکولاسیون نشان داد؛ به طوری که محتوی فنول و فلاونوئید تام برای عصاره ها به صورت زیر می باشد: پلی فنولیک < التراسونیک < پرکولاسیون. مطالعه *Kalia* و همکارانش بر روی قسمت هوایی گیاه *Poten-tilla atrosanguinea* نشان داد بیشترین میزان تام فنولی و فلاونوئیدی به ترتیب برای روش سوکسیله، روش عصاره گیری با مایکروویو، روش عصاره گیری با امواج فراصوت و ماسراسیون به دست آمد [۲۹]. مطالعه عصاره برگ و گل گیاه *Lythrum salicaria* نشان داد محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی عصاره پلی فنولیک بیشتر از عصاره التراسونیک و پرکولاسیون می باشد که با مطالعه ما همخوانی داشت [۳۰]. بنابراین شاید بتوان گفت که

خاصیت آنتی اکسیدانی قسمت‌های هوایی این گیاه بیشتر مربوط به ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در آنها می‌باشد و میزان فنول تام و فلاونوئید در این تحقیق می‌تواند فعالیت آنتی اکسیدانی موجود در عصاره‌های تهیه شده از گیاه را توجیه نماید. به‌منظور ارزیابی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها سه روش به‌دام اندازی رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)، قدرت احیاء کنندگی و میزان شلات کنندگی آهن اندازه‌گیری شد. رادیکال DPPH یک رادیکال آزاد پایدار با اتم مرکزی نیتروژن بوده که با احیاء توسط فرآیندهای گرفتن هیدروژن یا الکترون رنگ آن از ارغوانی به زرد تبدیل می‌شود. ترکیب‌هایی که قابلیت انجام این عمل را دارند به‌عنوان یک آنتی اکسیدان مطرح می‌شوند [۳۱]. فعالیت به‌دام اندازی رادیکال DPPH اندازه‌گیری شده با استفاده از روش‌های مختلف استخراج تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. درصد مهار کلیه عصاره‌ها در غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به- ترتیب برای عصاره‌های پرکولاسیون، التراسونیک و پلی فنولیک برابر با $93/71 \pm 1/18$ ، $95/26 \pm 0/65$ و $78/25 \pm 0/70$ به‌دست آمده است که این درصدها در مقایسه با استاندارد ویتامین C با درصد مهار $95/84 \pm 0/56$ بسیار قابل توجه بود. با توجه به درصد مهار به- دست آمده مشخص شد که عصاره‌های حاصل از روش التراسونیک و پرکولاسیون نسبت به عصاره پلی فنولیک فعالیت و توانایی بیشتری در به‌دام اندازی رادیکال DPPH از خود نشان دادند. در مقایسه بین عصاره‌ها، عصاره التراسونیک کمترین IC_{50} و در نتیجه بیشترین توانایی در به‌دام اندازی رادیکال DPPH نسبت به عصاره‌های پرکولاسیون و پلی فنولیک داشت. Cai و همکارانش در سال ۲۰۰۴ ارتباط خطی بین فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوی فنول تام در بسیاری از گیاهان گزارش کردند، درحالی- که این ارتباط خطی در مطالعه ما و بعضی از مطالعات دیگر مشاهده نشد [۳۲]. مطالعات He و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان داد که روش استخراج التراسونیک باعث استخراج با کیفیت بهتر و زمان کوتاه‌تر در مقایسه با روش سنتی می‌شود [۳۳]. مطالعه انجام شده روی گیاه *Hyoscyamus squarrosus* نشان داد عصاره التراسونیک در به‌دام اندازی رادیکال DPPH و به‌دام اندازی نیتریک اکساید بهتر از ماسراسیون عمل می‌کند [۳۴]. مطالعه انجام شده روی برگ و قسمت‌های هوایی گیاه *Lythrum salicaria* با سه روش مختلف نیز نشان داد به‌دام اندازی رادیکال DPPH و نیتریک اکساید عصاره پلی فنولیک بیشتر از عصاره التراسونیک و پرکولاسیون بوده که با نتایج ما هم‌خوانی نداشت. به‌علاوه، قدرت احیاء کنندگی پلی فنولیک بیشتر از آسکوربیک اسید گزارش شده که موافق با نتایج ما بود [۳۰]. بنابراین با استفاده از داده‌های

حاصل می‌توان این‌گونه تفسیر کرد که این گیاه از لحاظ مهار رادیکال‌های هیدروکسیل بسیار توانمند بوده و قدرت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها در مقایسه با آسکوربیک اسید کاملاً قابل ملاحظه است. نتایج آزمون DPPH نشان داد توانایی عصاره‌های پرکولاسیون، التراسونیک و پلی فنولیک در مهار رادیکال آزاد وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت فعالیت به‌دام اندازی رادیکال افزایش می‌یابد؛ به‌عبارت دیگر در غلظت‌های بالاتر ترکیبات موجود در عصاره‌ها به‌دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به- دنبال آن قدرت مهار کنندگی عصاره افزایش می‌یابد. عناصر واسطه دوظرفیتی که معمول‌ترین آنها آهن است، توانایی انتقال الکترون را دارند و از طریق واکنش فنتون، باعث تولید مقدار زیادی رادیکال هیدروکسیل می‌شوند؛ به‌این ترتیب اثرات تخریبی هیدروپراکساید افزایش می‌یابد. رادیکال هیدروکسیل مهم‌ترین رادیکال آزاد در بافت‌های بیولوژیک است و به‌راحتی با اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و DNA واکنش داده و باعث تخریب سلول می‌شود [۳۵]. با توجه به تمایل بالای رادیکال هیدروکسیل به مولکول‌های زیستی بدن و اثرات مخرب آن، پیشگیری از چنین واکنش‌های آسیب رسانی در سلامتی انسان اهمیت دارد. اضافه کردن آنتی اکسیدان‌ها می‌تواند باعث احیاء رادیکال‌های هیدرو- کسید و هیدروکسیلاسیون شود. EDTA، آسکوربیک اسید، ترکیبات فنولی و اسید سیتریک با شلات کردن فلزاتی مثل آهن از تولید رادیکال هیدروکسیل جلوگیری می‌کنند. عوامل شلات کننده به‌عنوان آنتی اکسیدان‌های ثانویه هستند، زیرا آنها پتانسیل احیاء را کاهش داده و باعث پایداری فرم اکسید شده یون فلزی می‌شوند. شلاتورهای آهن با اتصال به آهن ترکیبات پایداری ایجاد می‌کنند که از طریق مدفوع یا ادرار دفع می‌شوند. درمان با شلاتورها، مشکلات مربوط به سمیت آهن را در انسان کاهش داده و کیفیت زندگی و بقا در بیماری‌هایی مثل تالاسمی بهبود می‌یابد [۳۶]. عناصر واسطه مانند آهن قابلیت تشکیل رادیکال‌های آزاد از پراکسیدها را براساس واکنش‌های فنتون دارا بوده و می‌توانند موجب بیماری‌های قلبی عروقی در انسان شوند [۳۷]. یکی از درمان‌های اصلی بیماری آلزایمر که ناشی از عدم تنظیم جریان آهن در مغز و تشکیل پلاک‌های پروتئینی از پیش‌سازهای آمیلوئیدی است، استفاده از شلاتورهای آهن می‌باشد [۳۸]. امروزه داروهای زیادی به‌عنوان شلاته کننده آهن مانند دفروکسامین- سیلات و دفراسیروکس برای درمان سمیت مزمن آهن ناشی از تزریق آهن در آنمی‌ها مانند تالاسمی و هم‌چنین در سمیت حاد آهن استفاده می‌شود. در این تحقیق هم EDTA و هم عصاره‌ها

با آسکوربیک اسید میزان احیاء کنندگی بیشتری را نشان داد، می توان نتیجه گرفت که عصاره پلی فنولیک با کمک اهداء الکترون موجب ختم واکنش های زنجیره ای می شود.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان می دهد بخش های هوایی گیاه *Ballota platyloma* دارای مقادیر بالایی از ترکیبات طبیعی آنتی اکسیدانی از جمله فنول و فلاونوئید می باشد. عصاره های مختلف بخش هوایی این گیاه در تمامی مدل های مورد مطالعه سطوح مختلفی از فعالیت آنتی اکسیدانی را از خود نشان دادند. عصاره های التراسونیک، پلی فنول و پرکولاسیون بیشترین فعالیت در به دام اندازی رادیکال DPPH، قدرت احیایی و توانایی شلات کنندگی آهن را به ترتیب نشان دادند. بنابراین، مطالعات تکمیلی در مورد جداسازی ترکیبات موثره این گیاه، و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات جدا شده به شکل مجزا می تواند اطلاعات مفیدی در مورد فعالیت های دارویی برای درمان بیماری ها فراهم کند.

تشکر و قدرانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر بهمن اسلامی برای کمک در جمع آوری و شناسایی نمونه و هم چنین از کارشناس آزمایشگاه سرکار خانم عظیمی برای کمک در کارهای آزمایشگاهی نهایت تشکر به عمل می آید.

دارای اثر شلاته کنندگی بوده و آهن را قبل از تشکیل کمپلکس رنگی با فروزین شلاته نمودند. مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های متانولی و کنترل مثبت EDTA به صورت زیر بود: EDTA < پرکولاسیون < التراسونیک < پلی فنول. برپایه این نتایج، تمامی عصاره ها توانایی شلات دهندگی از خود نشان دادند؛ عصاره حاصل از پرکولاسیون فعالیت بیشتری از عصاره حاصل از سونیکیت و پلی فنول از خود نشان داد، ولی با استاندارد مورد نظر فاصله داشت. سنجش قدرت احیاء کنندگی در نمونه ها، ناشی احیا آهن III (فریک) به آهن II (فروس) با اهدا الکترون می باشد. میزان کمپلکس آهن با اندازه گیری میزان تشکیل رنگ آبی پروس در طول موج ۷۰۰ نانومتر قابل اندازه گیری است. افزایش جذب نوری در این طول موج نشان دهنده افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و افزایش قابلیت احیاء کنندگی می باشد [۳۹]. همان طور که در بخش نتایج آورده شده است، قدرت احیاء کنندگی تمامی عصاره ها تفاوت معنی داری در مقایسه با استاندارد نشان دادند ($P < 0.001$). عصاره ها در غلظت ۵۰-۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر قدرت احیاء 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، التراسونیک و پلی فنولیک 0.431 ± 0.007 ، 0.438 ± 0.007 و 0.403 ± 0.009 به دست آمد. از آنجا که قابلیت احیاء کنندگی عصاره پلی فنولیک نسبت به سایر عصاره ها قوی تر بوده و حتی در مقایسه

References:

- [1] Babitha N, Swamy DN, Chakrapania S. Role of green tea as an antioxidant in periodontal disease. *J Orofac Sci* 2009; 1(2): 39-42.
- [2] Lamina S, Ezema CI, Theresa AI, Anthonia EU. Effects of free radicals and antioxidants on exercise performance. *Oxid Antioxid Med Sci* 2013; 2: 83-91.
- [3] Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM. Antioxidant activities of methanol extract of sambucus ebulus L. Flower. *Pak J Biol Sci* 2009; 12(5): 447-50.
- [4] Ebrahimzadeh MA, Ehsonifar S, Eslami B. Sambucus ebulus elburensis Fruits: A good for antioxidants. *Pharmacogn Mag* 2009; 4(19): 213-18.
- [5] Aruoma OI. Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. *J Am Oil Chem Soc* 1996; 73: 1617-25.
- [6] Gao JJ, Igalashi K, Nukina M. Radical scavenging activity of phenylpropanoid glycosides in *Caryopteris incana*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999; 63(6): 983-8.
- [7] Williams GM, Iatropoulos MJ, Whysner J. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food Chem Toxicol* 1999; 37(9-10): 1027-38.
- [8] Stoilova A, Krastano A, Dtoyanova P, Senev P, Farfova S. Antioxidant activity of ginger extract (*Zingiber Officinale*). *Food Chem* 2007; 102(3): 764-70.
- [9] Wardle EN. Cellular oxidative process in relation to renal disease. *Am J Nephrol* 2005; 25(1): 13-22.
- [10] Espin JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J Agric Food Chem* 2000; 48(3): 648-56.
- [11] 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.

- [12] Jamzad Z. Flora of Iran: Lamiaceae. Research Institute of Forests and Rangelands. 1st ed. Tehran; 2012. 76: 407-15, 1066.
- [13] Iscan G, Kirimer N, Kurkcuglu M, Baser KHC, Demirci F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J Agric Food Chem* 2002; 50(14): 3943-46.
- [14] Moreno L, Bello R, Primo-Yufera E, Esplugues J. Pharmacological properties of the methanol extract from *Mentha suaveolens* Ehrh. *Phytother Res* 2002; 16 Suppl 1: S10-3.
- [15] Zolfaghari B, Yegdaneh A. Recent advances in extraction methods of medicinal plant components. *Journal Herbal Drugs* 2010; 1(1): 51-5.
- [16] Wang J, Sun BG, Cao YP, Tian Y. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem* 2008; 106(2): 804-10.
- [17] Yang B, Zhao MM, Shi J, Yang N, Jiang YM. 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.
- [18] 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.
- [19] Sun J, Yao J, Huang S, Long X, Wang J, Garcia-Garcia E. Antioxidant activity of polyphenol and anthocyanin extracts from fruits of *Kadsura coccinea* (Lem.) A.C. Smith. *Food Chem* 2009; 117: 276-81.
- [20] Ordone AAL, Gomez JD, Vattuone MA. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) swartz extracts. *Food Chem* 2006; 97(3): 452-58.
- [21] Chang YL, Kim DO, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem* 2002; 50(13): 3713-17.
- [22] Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Hafezi S. Antioxidant activities of Iranian Corn Silk. *Turk J Biol* 2008; 32: 43-9.
- [23] Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem* 1995; 43(1): 27-32.
- [24] Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 1994; 315: 161-9.
- [25] Samsam shariat SH. Extraction of effective components of herbal medicine, determination and evaluation methods. Esfahan: Mani Press; 1992. p. 12-3. [in Persian]
- [26] van Acker SA, van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJ, et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20(3): 331-42.
- [27] Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 2000; 48(8): 3597-604.
- [28] Hertog MG, Feskens EM, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidants flavonoids and the risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 1993; 342(8878): 1007-11.
- [29] Kalia K, Sharma K, Singh HP, Singh B. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. *J Agric Food Chem* 2008; 56(21): 10129-34.
- [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* 2014; 21(2): 783-8.
- [31] Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wissen Technol* 1995; 28: 25-30.
- [32] 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: 2157-84.
- [33] He Ch, Ji X, Pan YM, Wang H, Wang K, Liang M, et al. Antioxidant activity of alcoholic extract of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Med Chem Res* 2009; 19(5): 448-61.
- [34] Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B. Free radical scavenging ability of methanolic extract of *Hyoscyamus squarrosus* leaves. *Pharmacologyonline* 2009; 2: 796- 802.
- [35] Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2008; 48(5): 430-41.
- [36] Hebbel RP, Leung A, Mohandas N. Oxidation-induced changes in microheological properties of the red cell membrane. *Blood* 1990; 76(5): 1015-22.
- [37] Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119(6): 598-620.
- [38] Reznichenko L, Amit T, Zheng H, Weinreb O, Avramovich-Tirosh Y, Youdim MB, et al. Reduction of the iron-regulated beta-amyloid precursor protein and toxic beta-amyloid peptides expression by green tea polyphenol (-) - epigallocatechin-3-gallate: implication of iron chelation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2006; 97(2): 527-36.
- [39] Jayaprakash GK, Singh RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seed extracts on per oxidation models invitro. *Food Chem* 2001; 55: 1018-22.