Antioxidant properties of Ziziphus Jujuba Mill. aqueous extract of and its preventive role on RBC hemolysis induced by AAPH

Mina Arab[1], Zahra Abotorabi[1], Mohsen Khorashadizadeh[23], Seyed Mahmoud Hosseini[4], Asghar Zarban[5]

Background and Aim: Jujube (Ziziphus Jujuba Mill.) is one of the medicinal herbs with grows in dry and semi-dry areas in Iran; mainly in the South Khorasan province. The present study aimed at evaluating anti-oxidant and free radical scavenging capacity in different types of Jujuba.

Materials and Methods: Four ecotypes of Jujubes were collected from different parts of the South Khorasan providence (Sarayan, Quaen, Arish, and Boshad). The collected samples were air dried and then their aqueous extract was prepared in different dilutions. Anti-oxidant and free radical scavenging capacity of the samples were assessed using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) methods. Their AAPH-induced hemolysis prevention was also analyzed. The total phenolic content of the samples was assessed using Folin–Ciocalteau method.

Results: Maximum phenolic content was obtained from Quaen Jujube (1317±4.3 equal to ?mol Gallic acid). The highest antioxidant capacity by FRAP (1390.1 ± 65.5?mol/L) also belonged to Quaen jujube. The ability of Arish Jujube extracts in scavenging and neutralizing free radical, tested by DPPH, was always higher compared to the other extracts. Results obtained from the effects of different dilutions of Jujube extracts (0-25 – 5 mg/ml) on hemolysis showed a dose dependent relationship. All the extracts showed dose dependent reducing hemolysis in a specific range of concentrations, induced by 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). There was no significant statistical difference between jujube ecotypes in preventing hemolysis.

Conclusion: According to total phenolic content of the Jujobe extracts, its significant antioxidant properties and radical scavenging activities, which was tested through different methods, it can be a potential booster for anti-oxidant capacities.

Key Words: Jujube, Phenolic contents, Total antioxidant capacity, DPPH radical, AAPH radical.

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2017; 24 (Supplementary: Biochimistry & Metabolism): 22-30.

Received: February 20, 2017 ***Accepted: May 31, 2017***

[1] *Student Research Committee, Birjand University of Medical Science, Birjand, Iran.*
[2] *Cellular and Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.*
[3] *Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Birjand University of medical science, Birjand, Iran.*
[4] *Department of Biostatistics, Birjand University of medical science, Birjand, Iran.*
[5] ***Corresponding Author;*** *Birjand CardioVascular Diseases Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran. Email: azarban@yahoo.com Tel: +985632381500*

مقاله اصیل پژوهشی

اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی میوه عناب و توانایی آن در مهار همولیز گلبول‌های قرمز القا شده با AAPH

مینا عرب[1]، زهرا ابوترابی[1]، محسن خراشادی‌زاده[32]،سید محمود حسینی[4]، اصغر زربان[5]

چکیده

زمینه و هدف: عناب یک گیاه دارویی با ارزش در طب سنتی ایران است. این گیاه در مناطق خشک و نیمه‌خشک ایران به‌ویژه در استان خراسان جنوبی رشد می‌کند. در این مطالعه به بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و توانایی مهار رادیکال آزاد چهار گونه عناب پرداخته شد.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، میوه گیاه عناب از چهار منطقه مختلف در استان خراسان جنوبی جمع‌آوری و عصاره آبی آنها تهیه شد. برای تعیین سطح ترکیبات فنولیک از روش فولین‌سیوکالتو، برای تعیین ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی از روش Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) و برای تعیین توانایی آنها در مهار رادیکال آزاد از رادیکال 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) استفاده گردید. همچنین آزمایش مهار همولیز گلبول‌های قرمز با استفاده از رادیکال AAPH در حضور غلظت‌های مختلف عصاره آبی عناب انجام شد.

یافته‌ها: بیشترین میزان ترکیبات فنولیک، مربوط به عناب قائن (4/3±1317 میلی‌گرم اسیدگالیک در هر گرم عصاره خشک) بود. نتایج حاصل از روش FRAP برای تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی میوه عناب نشان داد که عناب قائن، بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را داشت (65/5±1390/1 میکرومول بر لیتر).

در روش DPPH که توانایی مهار یا خنثی‌سازی این رادیکال توسط عصاره‌های مورد نظر ارزیابی شد، عناب آریش بیشترین توانایی (48/2 %) را نشان داد. بررسی نتایج رقّت‌های مختلف گونه‌های عناب (0/25-5 mg/ml) بر همولیز گلبول‌های قرمز القاشده توسط ترکیب آزوبیس 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) نشان داد که در یک روند وابسته به دوز در محدوده غلظتی معین، با افزایش غلظت عصاره آبی میوه عناب، میزان همولیز در گلبول‌های قرمز کاهش یافت، اما بین گونه‌های مختلف عناب از نظر آماری، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: میوه عناب با سطح ترکیبات فنولیک و قدرت آنتی‌اکسیدانی بالا و با توانایی مهار همولیز گلبول‌های قرمز، می‌تواند نقش مهمی در تقویت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: عناب، ترکیبات فنولیک، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی، رادیکال DPPH، رادیکال AAPH

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1396؛ 24 (ویژه‌نامه: بیوشیمی و متابولیسم): 22-30.

دریافت: 1395/12/02 **پذیرش: 1396/03/10**

[1] کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

[2] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

[3] گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

[4] گروه آمار زیستی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

[5] **نویسنده مسؤول؛** مرکز تحقیقات بیماری‌های قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

آدرس: بیرجند- خیابان غفاری- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بیرجند- دانشکده پزشکی

تلفن: 05632381500 پست الکترونیکی: azarban@yahoo.com

مقدمه

رادیکال‌های آزاد، مولکول‌های بسیار ناپایدار و واکنش‌پذیر هستند. تولید آنها در شرایط هوازی اجتناب‌ناپذیر است (1). رادیکال‌های آزاد شامل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، گونه‌های فعال نیتروژن (RNS)، رادیکال‌های کربن-محور و رادیکال‌های سولفور-محور می‌باشند. ROSها شامل: آنیون‌سوپراکسید (O^{-2})، رادیکال‌هیدروکسیل (OH)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال‌پراکسید (ROO^-) و پراکسی‌نیتریت می‌باشند که از واکنش‌های بیولوژیک اکسیداتیو و یا فاکتورهای اگزوژن ایجاد می‌شوند (2). رادیکال‌های آزاد تولیدی، در اثر آلاینده‌های زیست‌محیطی، افزایش دما، خشکسالی، افزایش شدّت نور خورشید، مواد شیمیایی، سموم، غذاهای پرادویه و شدیداً سرخ شده و همچنین استرس فیزیکی، به‌دلیل کاهش آنتی‌اکسیدان‌های سیستم ایمنی، تغییر در بیان ژن و القای پروتئین‌های غیر طبیعی ایجاد می‌شوند (3). رادیکال‌های آزاد قادرند به‌طور برگشت‌ناپذیر به مولکول‌های سیستم بیولوژیک نظیر: اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه آزاد، لیپیدها، لیپوپروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و ماکرومولکول‌های بافت همبند آسیب وارد نمایند (1).

خوشبختانه در طی دوران تکامل سیستم‌های بیولوژیک، طبیعت با طراحی و ساخت آنتی‌اکسیدان‌ها، جانداران را در مقابل اثرات بالقوّه زیانبار رادیکال‌های آزاد محافظت نموده است. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل عوامل آنزیمی نظیر: سوپراکسیددیس‌موتاز، کاتالاز و گلوتاتیون‌پراکسیداز می‌باشد. همچنین در این سیستم عوامل غیر آنزیمی شامل: ویتامینE، ویتامینC، کاروتنوئیدها، پلی‌فنل‌ها، اسیداوریک، بیلی‌روبین و ... به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در خنثی‌سازی بسیاری از رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن دخالت دارند (4).

در شرایط طبیعی، اغلب بین تولید رادیکال‌های آزاد از یک‌سو و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی از سوی دیگر، حالت تعادل وجود دارد که در صورت تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و یا ضعف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، تعادل فوق مختل و حالت استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود (5). نتایج چند تحقیق نشان داده است که استرس اکسیداتیو در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها از جمله: آترواسکلروز، فشارخون، ایسکمی قلبی، دیابت، سرطان، آرتریت‌روماتوئید، التهاب، گاستریت، بیماری‌های دژنراتیو عصبی و ریوی، ایدز و همچنین فرآیند پیری دخالت دارد (1، 2، 6). اخیراً توجه زیادی به شناسایی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با اثرات جانبی کم برای استفاده در طب پیشگیرانه و صنایع غذایی در سطح جهان شده است. گزارش شده است که برخی از گیاهان دارویی حاوی انواع گسترده‌ای از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مانند: اسیدهای فنلیک، فلاونوئیدها و تانین‌ها هستند که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری از گیاهان رژیم‌غذایی می‌باشند. بسیاری از تحقیقات نشان می‌دهد که این ترکیبات ارزش زیادی در جلوگیری از شروع و یا پیشرفت بسیاری از بیماری‌های انسانی دارند (7).

عناب (Ziziphus jujuba Mill.)، میوه‌ای از یک درخت متعلّق به خانواده Rhamnaceae است. این گیاه کاربردهای غذایی و دارویی دارد که به‌صورت تازه، خشک و شکل‌های پردازش‌شده مصرف می‌شود (8). بخش خوراکی گیاه عناب، میوه آن است که از آن به‌عنوان «میوه‌ی زندگی» در چین باستان یاد شده است (9). میوه این گیاه حاوی انواع ویتامین‌های A، B و C، کربوهیدرات‌ها، آمینواسیدها، فسفر، کلسیم، آهن و ترکیبات فنولیک می‌باشد. مدت‌هاست که بخش‌های مختلف عناب برای مصارف انسانی و طب سنتی در درمان بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو استفاده می‌شود. عناب یک گیاه دارویی باارزش در طب سنتی ایران است که از آن به‌عنوان یک ملیّن و تصفیه‌کننده خون یاد شده است. این گیاه در مناطق خشک و نیمه‌خشک ایران به‌ویژه در استان خراسان جنوبی، رشد می‌کند (10). این مسئله باعث شد تا ما از نظر علمی، به بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی چهار گونه عناب به‌عنوان گیاه استراتژیک

منطقه خراسان جنوبی، در راستای نیاز گسترده به آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی به‌منظور تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو، بپردازیم.

روش تحقیق

تهیه عصاره آبی میوه گیاه عناب:

در این مطالعه تجربی، میوه گیاه عناب از چهار منطقه مختلف در استان خراسان جنوبی (عناب سرایان؛ عناب قائن؛ عناب آریش؛ عناب بوشاد) در تابستان سال 1394 با تأیید هرباریوم زیست‌شناسی دانشگاه بیرجند جمع‌آوری و در سایه خشک شد. ابتدا میوه عناب خشک‌شده به‌منظور جداسازی هسته‌های آن، کمی در هاون کوبیده و پس از برداشتن هسته‌های عناب، باقیمانده آن در آسیاب خوب خرد شد. به‌منظور تهیه عصاره آبی، ابتدا 5 گرم از پودر خشک و کوبیده‌شده میوه عناب در 100ml آب داغ 95درجه سانتی‌گراد ریخته شده؛ خوب به‌هم زده شده و به‌مدت 15-10 دقیقه دم شد. سپس با استفاده از کاغذ صافی (واتمن 1)، محلول به‌دست آمده در ظروف مخصوص دستگاه فریزدرایر صاف شده و در فریزر 80- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. این ظروف پس از یخزدن، روی دستگاه فریزدرایر نصب و در دمای 50- درجه سانتی‌گراد و خلأ، فریزدرای شدند. پودر خشک به‌دست آمده، توزین و در ظروف مخصوص پلی‌اتیلن درب‌دار در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در هنگام انجام آزمایش‌ها، مقدار کافی از عصاره خشک توزین و در آب مقطر حل گردید (11). برای بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی در روش‌های FRAP، DPPH و فولین‌سیوکالتو از غلظت 10mg/ml و برای آزمایش مهار همولیز گلبول‌های قرمز از غلظت‌های 0/25-5 mg/ml عصاره آبی میوه عناب استفاده شد.

سنجش ترکیبات فنولیک:

برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک، از روش فولین‌سیوکالتو استفاده شد. در این روش، فسفوتنگستومولیبدات در حضور سولفات‌لیتیم با ترکیبات فنلی، ایجاد رنگ آبی می‌نماید و شدّت رنگ حاصل، در طول موج 760 نانومتر قرائت می‌شود. از رقّت‌های مختلف اسیدگالیک از 62/5-2000 µmol/l به‌عنوان استاندارد، استفاده شد و نتایج به‌صورت معادل اسیدگالیک محاسبه و بیان گردید (12).

تعیین ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی:

برای تعیین ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های عناب، از روش FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power assay) استفاده شد. در این روش برای تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانی گیاه، توانایی عصاره گیاه در احیای یون‌های فریک (Fe^{3+}) و تبدیل آن به یون‌های فرو (Fe^{2+}) اندازه‌گیری می‌شود. یون Fe^{2+} به‌دست آمده، در pH اسیدی و در حضور TPTZ (2,4,6-tripyridy-s-triazin)، کمپلکس Fe-TPTZ را تشکیل می‌دهد که دارای رنگ بنفش است و شدّت رنگ به‌دست آمده در طول موج 593نانومتر و به‌صورت اسپکتروفتومتریک قابل اندازه‌گیری است. این واکنش غیر اختصاصی است و هر مولکولی که تحت شرایط فوق، قابلیّت احیای یون فریک را داشته باشد، در این واکنش شرکت می‌نماید. در این روش، از سولفات‌آهن با غلظت‌های 62/5-2000 µmol/l به‌عنوان استاندارد استفاده شد (13).

اندازه‌گیری فعالیت خنثی‌سازی رادیکال آزاد DPPH:

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) یک رادیکال آزاد پایدار و محلول در الکل است که امروزه برای ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌شود. الکترون منفرد در رادیکال آزاد DPPH، باعث ماکزیمم جذب قوی در 517نانومتر و ایجاد یک رنگ ارغوانی می‌گردد؛ ولی هنگامی که با یک آنتی‌اکسیدان مواجه شود، با ادامه واکنش، از مقدار مولکول DPPH کم شده و رنگ ارغوانی به زرد کمرنگ تغییر می‌کند. هر چه قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه بیشتر باشد، تغییر رنگ محلول نیز بیشتر خواهد بود که این قدرت آنتی‌اکسیدانی به‌صورت استوکیومتری مورد سنجش قرار

می‌گیرد(14).

ارزیابی میزان مهار همولیز گلبول‌های قرمز:

برای اندازه‌گیری میزان مهار همولیز گلبول‌های قرمز در حضور غلظت‌های مختلف عصاره عناب، از ترکیب AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) با غلظت نهایی 50mM استفاده شد. این ترکیب آزوبیس، به‌عنوان منبع تولیدکننده رادیکال‌های پروکسیل، باعث آسیب غشای گلبول قرمز و در نتیجه همولیز آن می‌گردد که شدّت همولیز با اندازه‌گیری میزان هموگلوبین در طول موج 540نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قابل اندازه‌گیری است.

ابتدا سوسپانسیون 5درصد از گلبول‌های قرمز در بافر فسفات نمکی (pH =7/4) تهیه گردید و در لوله‌های مختلف در حضور غلظت‌های مختلف عصاره عناب تحت تأثیر AAPH قرار گرفت. سپس همه لوله‌ها به‌مدّت 2ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر انکوبه شدند. در نهایت تمام لوله‌ها با سرعت 1500rpm سانتریفوژ شدند و قدرت جذب نوری به‌دلیل تغییر شرایط آزمایش از نظر ویژگی گلبول‌های قرمز، یک لوله به‌عنوان کنترل مثبت همولیز (حاوی AAPH و بدون عصاره عناب) و یک لوله دیگر به‌عنوان کنترل منفی (بدون AAPH و حاوی بافر فسفات نمکی) در نظر گرفته شد و درصد همولیز در بقیه لوله‌ها در حضور رقّت‌های مختلف عصاره عناب نسبت به آنها محاسبه گردید (15).

آنالیز آماری:

کلیه آزمایش‌ها سه بار تکرار شد و میانگین و انحراف معیار آنها محاسبه گردید. آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS (ویرایش 16) و با کمک آزمون‌های Kruskal-Wallis، و من ویتنی صورت گرفت. برای مقایسه بین محتوای ترکیبات فنولیک هر یک از نمونه‌های عناب و سطح ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی آنها و نیز توانایی خنثی‌سازی رادیکال DPPH، از ضریب همبستگی Pearson استفاده شد. $P\leq0/05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، ترکیبات فنولیک عصاره آبی میوه 4 گونه عناب از مناطق سرایان، قائن، آریش و بوشاد در غلظت 10mg/ml به‌ترتیب معادل: 3±850، 4/3±1317، 6/2±915 و 20/9±876 میلی‌گرم اسیدگالیک در هر گرم عصاره خشک بوده است که از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0/05$) و بیشترین میزان این ترکیبات متعلّق به عناب منطقه قائن بود (نمودار 1).

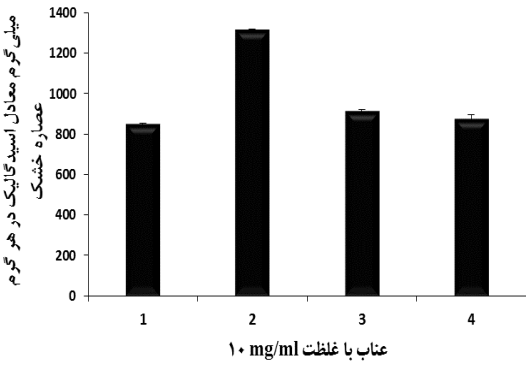
قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی میوه عناب مناطق سرایان، قائن، آریش و بوشاد در غلظت 10mg/ml با استفاده از روش FRAP به‌ترتیب به‌میزان: 26/5±1030/9، 65/5±1390/1، 99/1±1274/5 و 52/2±1207/4 میکرومول بر لیتر و از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0/05$) که بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را عناب منطقه قائن به خود اختصاص داد (نمودار 2).

در روش DPPH توانایی مهار یا خنثی‌سازی این رادیکال توسط عصاره‌های مورد نظر در غلظت 10mg/ml ارزیابی شد که میزان مهار این رادیکال توسط عنّاب مناطق سرایان، قائن، آریش و بوشاد به‌ترتیب معادل: 4/3±37/4، 6/5±44/7، 11/2±48/2 و 6/4±43/9 درصد ثبت گردید. بیشترین درصد فعالیت مهار رادیکال DPPH مربوط به عناب منطقه آریش بود؛ اما مقادیر این آزمون از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0/05$)(نمودار 3).

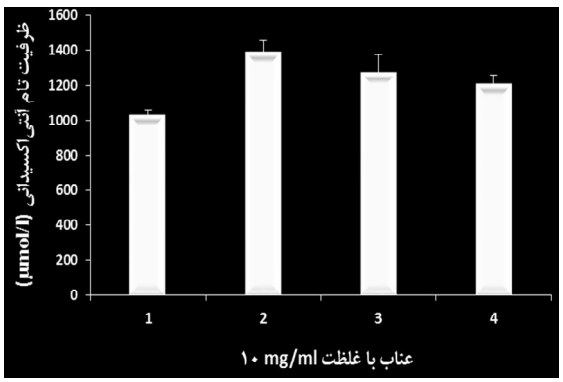
مطالعات همبستگی نشان داد که ارتباط مثبت و معنی‌داری بین محتوای ترکیبات فنولیک نمونه‌های مورد مطالعه و سطح ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی آنها ($r=0/740$، $P<0/01$) وجود دارد؛ اما چنین ارتباط معنی‌داری بین محتوای ترکیبات فنولیک و توانایی مهار رادیکال DPPH در نمونه‌های عناب مشاهده نشد ($r=0/160$، $P>0/05$).

بررسی نتایج رقّت‌های مختلف گونه‌های عناب

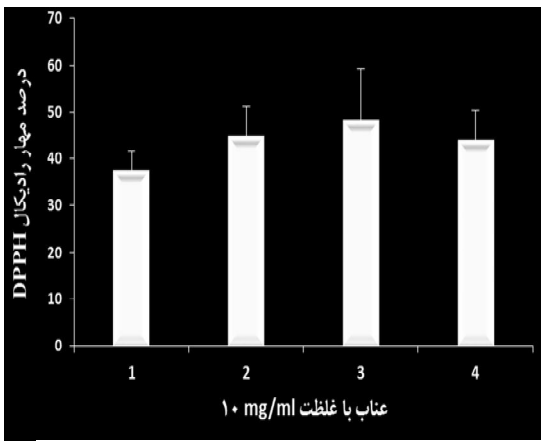
(0/25-5mg/ml) بر همولیز گلبول‌های قرمز القاشده توسط ترکیب آزوبیس AAPH نشان داد که در یک روند وابسته به دوز در محدوده غلظتی معین، با افزایش غلظت عصاره آبی میوه عناب، میزان همولیز در گلبول‌های قرمز نسبت به کنترل مثبت به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<0/001)؛ اما بین گونه‌های مختلف عناب در غلظت‌های مختلف از نظر آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P>0/05)(نمودار 4).



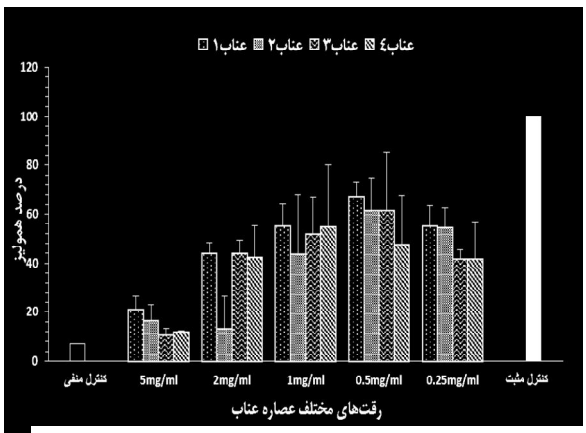
نمودار 1- مقایسه ترکیبات فنولیک موجود در عصاره آبی میوه چهار گونه عناب، اندازه‌گیری‌شده با روش فولین‌سیوکالتو. نتایج به‌صورت میانگین و انحراف از معیار حاصل از 3 بار تکرار آزمایش نشان داده شده‌اند. 1: عناب سرایان؛ 2: عناب قائن؛ 3: عناب آریش؛ 4: عناب بوشاد. (P<0/05)



نمودار 2- مقایسه ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی میوه چهار گونه عناب، اندازه‌گیری شده با روش FRAP. نتایج به‌صورت میانگین و انحراف از معیار حاصل از 3 بار تکرار آزمایش نشان داده شده‌اند. 1: عناب سرایان؛ 2: عناب قائن؛ 3: عناب آریش؛ 4: عناب بوشاد. (P<0/05)



نمودار 3- مقایسه توانایی مهار یا خنثی‌سازی رادیکال DPPH توسط عصاره آبی میوه چهار گونه عناب. نتایج به‌صورت میانگین و انحراف از معیار حاصل از 3 بار تکرار آزمایش نشان داده شده‌اند. 1: عناب سرایان؛ 2: عناب قائن؛ 3: عناب آریش؛ 4: عناب بوشاد. (P>0/05)



نمودار 4- تأثیر رقت‌های مختلف عصاره آبی میوه چهار گونه عناب بر همولیز ناشی از AAPH. نتایج به‌صورت میانگین و انحراف از معیار حاصل از 3 بار تکرار آزمایش نشان داده شده‌اند. عناب1: سرایان؛ عناب2: قائن؛ عناب3: آریش؛ عناب4: بوشاد؛ ستون کنترل منفی: سوسپانسیون گلبول قرمز 5 % و بافر فسفات نمکی؛ ستون کنترل مثبت: سوسپانسیون گلبول قرمز 5 % و AAPH؛ P<0/001

بحث

در این مطالعه، خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی میوه 4گونه عناب با استفاده از چند روش مورد ارزیابی قرار گرفت. ترکیبات فنولیک، گروه مهمی از ترکیبات گیاهی به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه را تشکیل می‌دهند که در پاسخ به استرس‌های محیطی ایجاد می‌شوند. این ترکیبات به‌دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل، توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد را داشته و می‌توانند به‌عنوان دهنده الکترون یا هیدروژن عمل نمایند (16). همچنین این ترکیبات با جلوگیری از تجزیه هیدروپراکسیدها به رادیکال آزاد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهند (17).

در مطالعه Olajuyigbe و Afolayan، ترکیبات فنولیک عصاره آبی عناب (1 mg/ml) به‌روش فولین‌سیوکالتو، 24/72±0/01 میلی‌گرم اسیدگالیک در هر 100 گرم عصاره خشک گزارش شد (17). Guizani و همکاران، محتوای ترکیبات فنولیک عصاره آبی عناب (66/6 mg/ml) را معادل 1644 میلی‌گرم اسیدگالیک در هر 100 گرم عصاره خشک گزارش کردند (18). همچنین در تحقیق صفی‌زاده و همکاران، محتوای فنولی تام عصاره آبی عناب (2/5 g/l) به‌میزان 210±2/66 میلی‌گرم اسیدگالیک در هر گرم عصاره خشک سنجیده شد (19). در مطالعه حاضر نیز محدوده این ترکیبات از 3±850 تا 4/3±1317 میلی‌گرم اسیدگالیک در هر گرم عصاره خشک، در بین گونه‌های مختلف عناب با غلظت 10 mg/ml متغیّر بود که خود گواه بر غنی‌بودن عناب از ترکیبات فنولیک است.

در این مطالعه با استفاده از روش FRAP، قدرت آنتی‌اکسیدانی تام عصاره آبی میوه عناب سنجیده شد. روش FRAP به‌طور دقیق، سریع و با هزینه کم، قدرت احیاکنندگی آنتی‌اکسیدان‌های مختلفی نظیر: ویتامینC، ویتامینE، فلاونوئیدها و ... را می‌سنجد (20)؛ بنابراین، باتوجه به محدوده غلظتی 129/3±1094/6 تا 109/2±1342/5 میکرومول بر لیتر در مورد عصاره عناب‌های مورد مطالعه، می‌توان گفت که میوه این گیاه حاوی یک یا چند نوع از این آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد. Olajuyigbe و Afolayan در مطالعه خود با استفاده از روش FRAP قدرت احیاکنندگی عصاره آبی عناب را در غلظت‌های mg/ml 0/1-0/02 بررسی کردند. آنها نشان دادند که در یک روند وابسته به دوز، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد و بیشترین میزان جذب، در بالاترین غلظت عصاره معادل 0/14±0/002mg/ml بود (17). صفی‌زاده و همکاران، فعالیت آنتی‌اکسیدانی تام عصاره آبی عناب را در غلظت 2/5g/l برابر 6/25±350/63 مولار آهن در هر گرم عصاره خشک گزارش کردند (19). در مطالعه Zhang و همکاران، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی سه گونه عناب از مناطق مختلفی در چین با روش FRAP در محدوده 16/10±252/43 تا 31/59±982/31 میلی‌گرم اکی‌والان آسکوربیک‌اسید در هر 100 گرم عصاره خشک میوه آن به‌دست آمد (21).

روش DPPH نیز به‌طور گسترده به‌منظور ارزیابی توانایی مهار یا خنثی‌سازی این رادیکال توسط آنتی‌اکسیدان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. رادیکال DPPH نسبت به رادیکال‌های هیدروکسیل و آنیون‌سوپراکسید پایداری بیشتری دارد و این موضوع از مزایای آن محسوب می‌شود (16). عصاره عناب نیز به‌دلیل داشتن مقادیر زیاد ترکیبات فنولیک و سطح بالای ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی، قدرت زیادی در خنثی‌سازی رادیکال DPPH از خود نشان داد. در مطالعه Olajuyigbe و Afolayan، فعالیت خنثی‌سازی رادیکال DPPH در غلظت‌های mg/ml 0/1-0/02 عصاره آبی عناب در یک روند وابسته به دوز، در محدوده 0/02±9/87 تا 0/02±70/34 درصد گزارش شد (17). Kandimalla و همکاران با هدف بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره عناب در حلال‌های مختلف (متانول، هگزان، کلروفرم، اتیل‌استات و آب) با روش DPPH نشان دادند که جزء آبی عصاره عناب در بالاترین غلظت مورد استفاده (100 µg/ml) نسبت به

استاندارد آسکوربیک‌اسید، فعالیت بالقوّه‌ای دارد (22). Shad و همکاران، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی میوه عناب را در محدوده غلظتی 0/25-1 mg/ml با روش DPPH بررسی کردند و نشان دادند که بیشترین میزان فعالیت (47/3%) در بالاترین غلظت این عصاره بوده است (23).

در مطالعات مختلف از ترکیبات متنوعی به‌عنوان عامل مهاجم و ایجاد همولیز در گلبول‌های قرمز استفاده می‌شود. ترکیبات آزوبیس نظیر AAPH، توانایی نفوذ به درون غشای سلولی از جمله غشای گلبول قرمز را دارند و نسبت به هموگلوبین به‌سرعت واکنش می‌دهند. ترکیب AAPH با تولید رادیکال‌های بسیار فعال (آلکوکسیل و پروکسیل) و حمله به اسیدهای چرب غیراشباع، سبب القای پراکسیداسیون لیپیدی در غشای سلولی و پارگی گلبول قرمز می‌شود (24). در مطالعه حاضر، تأثیر عصاره آبی میوه عناب بر همولیز گلبول‌های قرمز نشان داد که این عصاره می‌تواند میزان همولیز را در یک محدوده غلظتی مشخص، کاهش دهد و این نتیجه گواهی دیگر از خواص آنتی‌اکسیدانی عناب و توانایی آن در مهار رادیکال‌های آزاد است. Benammar و همکاران نشان دادند که میوه عناب نسبت به سایر بخش‌های این گیاه، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری در جلوگیری از لیز گلبول قرمز دارد (25) که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعه انجام‌شده، میوه عناب دارای ترکیبات فنولیک بوده واز خاصیت آنتی‌اکسیدانی خوبی برخوردار است و توانایی مهار رادیکال‌های آزاد را دارد. این گیاه با توانایی مهار همولیز گلبول‌های قرمز در حضور AAPH می‌تواند نقش مهمی در کاهش استرس اکسیداتیو داشته باشد. پیشنهاد می‌شود تأثیر مصرف عناب در تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی افراد سالم و مبتلا به بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو، مورد مطالعه قرار گیرد. در صورت تأیید اثرات فوق در مطالعات in vivo، مصرف بیشتر این گیاه یا فرآورده‌های آن را می‌توان در جامعه توصیه نمود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان، مراتب تقدیر و تشکر خود را از حوزه معاونت تحقیقات و فناوری و آزمایشگاه جامع تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی بیرجند اعلام می‌دارند.

منابع:

1- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacogn Rev. 2010; 4(8): 118-26.

2- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Indian J Clin Biochem. 2015; 30(1): 11-26.

3- Pourmorad F, Hosseinimehr S, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African J Biotechnol. 2006;5(11):1142-5.

4- Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. Nutr J. 2016; 15(1): 71.

5- Zarban A, Malkaneh M, Hassan Pour M, Najari M, Abad M. Evaluation of antioxidant properties in 28 herbs in Iran. Birjand Univ Med Sci. 2004; 11(1): 5-13.[Persian]

6- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy Ch. Free radicals, antioxidants in disease and health. Int J Biomed Sci. 2008; 4(2): 89-96.

7- Bouayed J, Piri K, Rammal H, Dicko A, Desor F, Younos C, et al. Comparative evaluation of the antioxidant potential of some Iranian medicinal plants. Food Chem. 2007; 104(1): 364-8.

8- Plastina P. Pharmacological Aspects of Jujubes. Pharmacologia. 2016;7(5):243-55.

9- Al-Reza SM, Yoon JI, Kim HJ, Kim JS, Kang SC. Anti-inflammatory activity of seed essential oil from Zizyphus jujuba. Food Chem Toxicol. 2010; 48(2): 639-43.

10- Tahergorabi Z, Abedini MR, Moodi M, Hassanpour Fard M, Beydokhti H. "Ziziphus jujuba": A red fruit with promising anticancer activities. Pharmacogn Rev. 2015; 9(18): 99-106.

11- Tabba HD, Chang RS, Smith KM. Isolation, purification, and partial characterization of prunellin, an anti-HIV component from aqueous extracts of Prunella vulgaris. Antiviral Res. 1989;11(5-6):263-73.

12- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Ravent?s RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 1999; 299: 152-78.

13- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem. 1996; 239(1): 70-6.

14- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology. 1995;28(1):25-30.

15- Bureau A, Lahet JJ, Lenfant F, Bouyer F, Petitjean M, Chaillot B, et al. Optimization of a model of red blood cells for the study of anti-oxidant drugs, in terms of concentration of oxidant and phosphate buffer. Biomed Pharmacother. 2005; 59(7): 341-4.

16- Zarban A, Malekaneh M, Boghrati MR. Antioxidant properties of pomegranate juice and its scavenging effect on free radicals. Birjand Univ Med Sci. 2007;14(3):19-27. [Persian]

17- Olajuyigbe OO, Afolayan AJ. Phenolic content and antioxidant property of the bark extracts of Ziziphus mucronata Willd. subsp. mucronata Willd. BMC Complement Altern Med. 2011; 11: 130.

18- Guizani N, Waly MI, Singh V, Rahman MS. Nabag (Zizyphus spina-christi) extract prevents aberrant crypt foci development in colons of azoxymethane-treated rats by abrogating oxidative stress and inducing apoptosis. Asian Pac J Cancer Prev. 2013; 14(9): 5031-5.

19- Safizadeh B, Hoshyar R, Hemmati M, Zarban A, Ebrahimi R. A preliminary evaluation of effects of high doses of Jujube and Saffron on biochemical and hematological parameters in rats. Clinical Phytoscience. 2016;2(1):15.

20- Abolhasannezhad M, Sharifzadeh G, Ghasemzadeh R, Zarban A. Assessment of antioxidant properties of berberis vulgarris syrup and their protective effects on hepatic damages induced by CCI4 in the rat. Birjand Univ Med Sci. 2014; 21(3): 283-91. [Persian]

21- Zhang H, Jiang L, Ye S, Ye Y, Ren F. Systematic evaluation of antioxidant capacities of the ethanolic extract of different tissues of jujube (Ziziphus jujuba Mill.) from China. Food Chem Toxicol. 2010; 48(6): 1461-5.

22- Kandimalla R, Dash S, Kalita S, Choudhury B, Malampati S, Kalita K, et al. Protective Effect of Bioactivity Guided Fractions of Ziziphus jujuba Mill. Root Bark against Hepatic Injury and Chronic Inflammation via Inhibiting Inflammatory Markers and Oxidative Stress. Front pharmacol. 2016; 7: 298.

23- Shad AA, Ahmad S, Ullah R, AbdEl-Salam NM, Fouad H, Rehman N Ur, et al. Phytochemical and biological activities of four wild medicinal plants. ScientificWorldJournal. 2014; 2014: ID 857363.

24- Chisté RC, Freitas M, Mercadante AZ, Fernandes E. Carotenoids are effective inhibitors of in vitro hemolysis of human erythrocytes, as determined by a practical and optimized cellular antioxidant assay. J Food Sci. 2014; 79(9): H1841-7.

25- Benammar C, Hichami A, Yessoufou A, Simonin AM, Belarbi M, Allali H, et al. Zizyphus lotus L. (Desf.) modulates antioxidant activity and human T-cell proliferation. BMC Complement Altern Med. 2010; 10: 54.