

Antioxidant properties of aqueous extract of Jujube and its preventive role on RBC hemolysis induced by AAPH

Mina Arab¹, Zahra Abotorabi¹, Mohsen Khorashadizadeh², Asgar Zarban³

Background and Aim: Jujube (*Ziziphus Jujube*) is one of medicinal plants and native of dry and semi-dry land in Iran, mainly in 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 Jujuba were collected from different parts of Southern khorasan providence (Sarayan, Quaen, Arish, Boshad). The collected

fruits were air dried and then aqueous extract was prepared in different dilutions. Anti-oxidant and free radical scavenging capacity of samples were assessed using DPPH and FRAP methods. AAPH-induced hemolysis prevention was also analyzed. The total phenolic content of samples was assessed by Folin-Ciocalteu 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) was also related to Quaen jujube. The ability of Arish Jujube extracts in scavenging and neutralizing free radical, tested by DPPH, was always higher compared to other extracts. Results obtained from the effects of different dilutions of Jujube extracts (0-25 – 5 mg/ml) on hemolysis, showed a dose dependent manner. All the extracts showed dose dependent reducing hemolysis in a specific range of concentrations, induced by 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 by different methods, it could be a potential booster for anti-oxidant systems.

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

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2017; 24 (5): Supplementary

Received: February 20, 2017

Accepted: May 31, 2017

¹ Student Research Committee, Brijand University of medical science, Birjand, Iran.

² Brijand University of medical science, Birjand, Iran.

³ **Corresponding Author;** Birjand CardioVascular Diseases Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.
Email: azarban@yahoo.com

اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی میوه 4 گونه عناب و توانایی آن در مهار

همولیز گلبول‌های قرمز القا شده با AAPH

مینا عرب¹، زهرا ابوترابی¹، محسن خراشادی‌زاده²، اصغر زربان³

چکیده

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

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 فولین سیوکالتو، برای تعیین ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی از روش FRAP و برای تعیین توانایی آن‌ها در مهار رادیکال آزاد از رادیکال 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 ($1317 \pm 4/3$ 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 دارد ($1390/1 \pm 65/5$ میکرومول بر لیتر).

در روش DPPH که توانایی مهار یا خنثی‌سازی این رادیکال توسط عصاره‌های مورد نظر ارزیابی شد، عناب آرایش بیشترین توانایی (48/2%) را نشان داد. بررسی نتایج رقت‌های مختلف گونه‌های عناب (0/25-5 mg/ml) بر همولیز گلبول‌های قرمز القا شده توسط ترکیب آزو بیس 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 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 (5): ویژه نامه .

دریافت: 1395/12/02 پذیرش: 1396/03/10

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

² گروه پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

³ نویسنده مسؤؤل؛ 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

پست الکترونیکی: azarban@yahoo.com

مقدمه

تعدادل 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، آرتریت روماتوئید، التهاب، گاستریت، بیماری‌های دژنراتیو عصبی و ریوی، ایدز و همچنین فرایند 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).

عناَب (*Ziziphus jujuba* Mill.)، میوه‌ای از یک درخت متعلق به خانواده Rhamnaceae است. این گیاه کاربردهای غذایی و دارویی دارد که به صورت تازه، خشک و فرم‌های پردازش شده مصرف می‌شود (8). بخش خوراکی گیاه عناب، میوه آن است که از آن به عنوان "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 با ارزش در طب سنتی ایران است که از آن به عنوان یک ملین و تصفیه کننده خون یاد شده است. این گیاه در مناطق خشک و نیمه خشک ایران به ویژه در استان خراسان جنوبی، رشد می‌کند (10). این مسئله باعث شد تا ما از نظر علمی، به بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی چهار گونه عناب به عنوان گیاه استراتژیک منطقه خراسان جنوبی، در راستای نیاز گسترده به آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی به

رادیکال‌های آزاد، مولکول‌های بسیار ناپایدار و واکنش پذیر هستند تولید آنها در شرایط هوای اجتناب ناپذیر است (1). رادیکال‌های آزاد شامل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، گونه‌های فعال نیتروژن (RNS)، رادیکال‌های کربن-محور و رادیکال‌های سولفور-محور می‌باشند. ROSها شامل آنیون سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل (OH)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال پراکسید (ROO) و پراکسی نیتريت می‌باشند که از واکنش‌های بیولوژیک اکسیداتیو و یا فاکتورهای اگزوزن ایجاد می‌شوند (2). رادیکال‌های آزاد تولیدی در اثر آلاینده‌های زیست محیطی، افزایش دما، خشکسالی، افزایش شدت نور خورشید، مواد شیمیایی، سموم، غذاهای پرادویه و شدیداً سرخ شده و همچنین استرس فیزیکی، به دلیل کاهش آنتی‌اکسیدان‌های سیستم ایمنی، تغییر در بیان ژن و القاء پروتئین‌های غیر طبیعی ایجاد می‌شوند (3). رادیکال‌های آزاد قادرند به طور 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 بالقوه زیانبار رادیکال‌های آزاد محافظت نموده است. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل عوامل آنزیمی نظیر سوپراکسیددیس‌موتاز، کاتالاز و گلوکوتاتیون پراکسیداز می‌باشد. همچنین در این سیستم عوامل غیر آنزیمی شامل ویتامین E، ویتامین C، کاروتنوئیدها، پلی‌فنل‌ها، اسیداوریک، بیلی‌روبین و... به عنوان آنتی‌اکسیدان در خنثی‌سازی بسیاری از رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن دخالت دارند (4). در شرایط طبیعی، اغلب بین تولید رادیکال‌های آزاد از یک سو 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،

760 نانومتر قرائت می‌شود. از رقت‌های مختلف اسیدگالیک از $62/5-2000 \mu\text{mol/l}$ به عنوان استاندارد، استفاده شد و نتایج به صورت معادل اسیدگالیک محاسبه و بیان می‌گردد (12).

تعیین ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی:

برای تعیین ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های عناب، از روش (Ferric Reducing Antioxidant Power) FRAP 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+} به دست آمده، در pH اسیدی و در حضور TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazin)، کمپلکس Fe-TPTZ را تشکیل می‌دهد که دارای رنگ بنفش است و شدت رنگ حاصله در طول موج 593 نانومتر و به صورت اسپکتروفوتومتریک قابل اندازه‌گیری است. این واکنش غیر اختصاصی است و هر مولکولی که تحت شرایط فوق، قابلیت احیای یون فریک را داشته باشد، در این واکنش شرکت می‌نماید. در این روش، از سولفات آهن با غلظت‌های $62/5-2000 \mu\text{mol/l}$ به عنوان 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 517 نانومتر 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 به صورت استوکیومتری مورد سنجش قرار می‌گیرد (14).

ارزیابی میزان مهار همولیز گلبول‌های قرمز:

برای اندازه‌گیری میزان مهار همولیز گلبول‌های قرمز در

منظور تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو، پردازیم.

روش تحقیق

تهیه عصاره آبی میوه گیاه عناب:

در این مطالعه تجربی، میوه گیاه عناب از چهار منطقه مختلف در استان خراسان جنوبی (1: عناب سرایان؛ 2: عناب قائن؛ 3: عناب آریش؛ 4: عناب بوشاد) در تابستان سال 1394 با تأیید هرباریوم زیست‌شناسی دانشگاه بیرجند جمع‌آوری و در سایه خشک شد. ابتدا میوه عناب خشک شده به منظور جداسازی هسته‌های آن، کمی در هاون کوبانده و بعد از برداشتن هسته‌های عناب، باقیمانده در آسیاب خوب خرد شد. به منظور تهیه عصاره آبی، ابتدا 5 گرم از پودر خشک و کوبیده شده میوه عناب در 100 ml آب داغ 95 درجه سانتی‌گراد ریخته شده، خوب هم‌زده و به مدت 15-10 دقیقه دم شد. سپس با استفاده از کاغذ صافی (واتمن 1)، محلول حاصله در ظروف مخصوص دستگاه فریزدرایر صاف شده و در فریزر 80- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. این ظروف پس از یخ زدن، روی دستگاه فریزدرایر نصب و در دمای 50- درجه سانتی‌گراد و خلأ، فریزدرای شدند. پودر خشک حاصله توزین و در ظروف مخصوص پلی‌اتیلن درب‌دار در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در هنگام انجام آزمایشات 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 10 mg/ml و برای آزمایش مهار همولیز گلبول‌های قرمز از غلظت‌های 5-0/25 mg/ml عصاره آبی میوه عناب استفاده شد.

سنجش ترکیبات فنولیک:

برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک، از روش فولین‌سیوکالتو استفاده شد. در این روش، فسفوتنگستومولیدات در حضور سولفات لیتیم با ترکیبات فنلی، ایجاد رنگ آبی می‌نماید و شدت رنگ حاصل، در طول موج

عناصیب از مناطق سرایان، قائن، آریش و بوشاد در غلظت 10 mg/ml به ترتیب معادل 850 ± 3 ، $1317 \pm 4/3$ ، $915 \pm 6/2$ و $876 \pm 20/9$ میلی‌گرم اسیدگالیک در هر گرم عصاره خشک بوده است که از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$) و بیشترین میزان این ترکیبات متعلق به عناصیب منطقه قائن بود (نمودار 1).

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

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

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 عناصیب مشاهده نشد ($P > 0/05$ ، $r = 0/160$).

بررسی نتایج رقت‌های مختلف گونه‌های عناصیب (mg/ml) 5-0 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 عناصیب، میزان همولیز در گلبول‌های قرمز نسبت به کنترل

حضور غلظت‌های مختلف عصاره عناصیب، از ترکیب AAPH (2-amidinopropane) 2,2'-azobis (dihydrochloride) با غلظت نهایی 50 mM استفاده شد. این ترکیب آزوبیس، به عنوان منبع تولیدکننده رادیکال‌های پروکسیل، باعث آسیب غشای گلبول قرمز و در نتیجه همولیز آن می‌گردد که شدت همولیز با اندازه‌گیری میزان هموگلوبین در طول موج 540 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قابل اندازه‌گیری است. ابتدا سوسپانسیون 5% از گلبول‌های قرمز در بافر فسفات نمکی (pH = 7/4) تهیه گردید و در لوله‌های مختلف در حضور غلظت‌های مختلف عصاره عناصیب تحت تأثیر AAPH قرار گرفت. سپس همه لوله‌ها به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر انکوبه شدند. در نهایت تمام لوله‌ها با سرعت 1500rpm سانتریفوژ شدند و قدرت جذب نوری دلیل تغییر شرایط آزمایش از نظر ویژگی گلبول‌های قرمز، یک لوله به عنوان کنترل مثبت همولیز (حاوی AAPH و بدون عصاره عناصیب) و یک لوله دیگر به عنوان کنترل منفی (بدون AAPH و حاوی بافر فسفات نمکی) در نظر گرفته شد و درصد همولیز در بقیه لوله‌ها در حضور رقت‌های مختلف عصاره عناصیب نسبت به آنها محاسبه گردید (15).

آنالیز آماری:

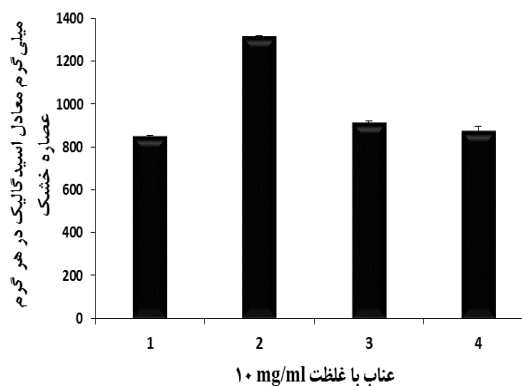
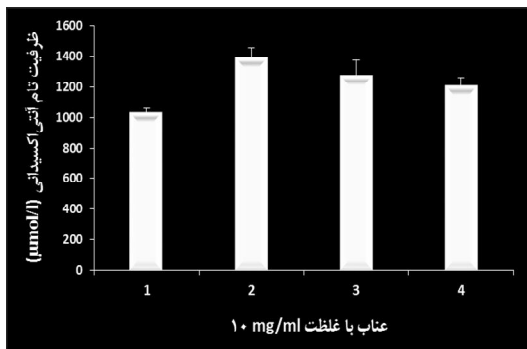
کلیه آزمایش‌ها سه بار تکرار شد و میانگین و انحراف معیار آنها محاسبه گردید. آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 16 و با کمک آزمون‌های Kruskal-Wallis، و من ویتنی صورت گرفت. برای مقایسه بین محتوای ترکیبات فنولیک هر یک از نمونه‌های عناصیب و سطح ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی آنها و نیز توانایی خنثی‌سازی رادیکال DPPH، از ضریب همبستگی Pearson استفاده شد. $P \leq 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، ترکیبات فنولیک عصاره آبی میوه 4 گونه

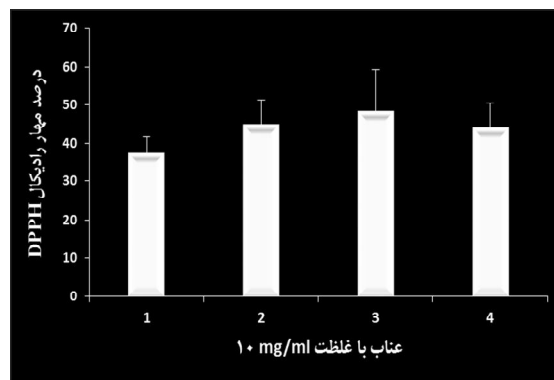
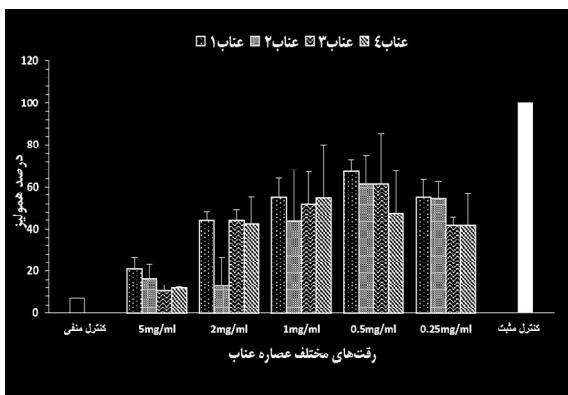
مثبت به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/001$) اما بین گونه‌های مختلف عناب در غلظت‌های مختلف از نظر آماری

تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0/05$) (نمودار 4).



نمودار 1- مقایسه ترکیبات فنولیک موجود در عصاره آبی میوه چهار گونه عناب، اندازه‌گیری شده با روش فولین سیوکالتو. (نتایج به صورت 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.

نمودار 2- مقایسه ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی میوه چهار گونه عناب، اندازه‌گیری شده با روش FRAP. (نتایج به صورت 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.



نمودار 3- مقایسه توانایی مهار یا خنثی‌سازی رادیکال DPPH توسط عصاره آبی میوه چهار گونه عناب (نتایج به صورت 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؛ ستون کنترل منفی: سوسپانسیون گلبول قرمز 5% و بافر فسفات نمکی؛ ستون کنترل مثبت: سوسپانسیون گلبول قرمز 5% و AAPH؛ ***= $P < 0/001$

نمودار 4- تأثیر رقت‌های مختلف عصاره آبی میوه چهار گونه عناب بر همولیز ناشی از AAPH. (نتایج به صورت 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؛ ستون کنترل منفی: سوسپانسیون گلبول قرمز 5% و بافر فسفات نمکی؛ ستون کنترل مثبت: سوسپانسیون گلبول قرمز 5% و AAPH؛ ***= $P < 0/001$

بحث

ویتامین E، فلاونوئیدها و ... را می‌سنجد (20): بنابراین، باتوجه به محدوده غلظتی $1094/6 \pm 129/3$ تا $1342/5 \pm 109/2$ 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 $0/02-0/1$ mg/ml بررسی کردند و نشان دادند که در یک روند وابسته به دوز، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد و بیشترین میزان جذب، در بالاترین غلظت عصاره معادل $0/14 \pm 0/002$ بود (17). صفی‌زاده و همکارانش، فعالیت آنتی‌اکسیدانی تام عصاره آبی عناب را در غلظت $2/5$ g/l برابر $350/63 \pm 6/25$ مولار آهن در هر گرم عصاره خشک گزارش کردند (19). در مطالعه Zhang و همکارانش، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی سه گونه عناب از مناطق مختلفی در چین با روش FRAP در محدوده $252/43 \pm 16/10$ تا $982/31 \pm 31/59$ میلی‌گرم اکی‌والان آسکوربیک اسید در هر 100 گرم عصاره خشک میوه آن به دست آمد (21).

روش DPPH نیز به طور گسترده به منظور ارزیابی توانایی مهار یا خنثی‌سازی این رادیکال توسط آنتی‌اکسیدان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. رادیکال DPPH نسبت به رادیکال‌های هیدروکسیل و آنیون سوپراکسید پایداری بیشتری دارد و این موضوع از مزایای آن محسوب می‌شود (16). عصاره عناب نیز به دلیل 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 $0/02-0/1$ mg/ml عصاره آبی عناب در یک روند وابسته به دوز، در محدوده $9/87 \pm 0/02$ تا $70/34 \pm 0/02$ درصد گزارش شد (17).

در این مطالعه، خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی میوه 4 گونه عناب با استفاده از چند روش مورد ارزیابی قرار گرفت. ترکیبات فنولیک، گروه مهمی از ترکیبات گیاهی به عنوان متابولیت‌های ثانویه را تشکیل می‌دهند که در پاسخ به استرس‌های محیطی ایجاد می‌شوند. این ترکیبات به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل، توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد را داشته و می‌توانند به عنوان 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) به روش فولین‌سیوکالتو، $24/72 \pm 0/01$ میلی‌گرم اسیدگالیک در هر 100 گرم عصاره خشک گزارش شد (17). Guizani و همکارانش، 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 همکارانش، محتوای فنولی تام عصاره آبی عناب ($2/5$ g/l) به میزان $210 \pm 2/66$ میلی‌گرم اسیدگالیک در هر گرم عصاره خشک سنجیده شد (19). در مطالعه حاضر نیز محدوده این ترکیبات از 850 ± 3 تا $1317 \pm 4/3$ میلی‌گرم اسیدگالیک در هر گرم عصاره خشک، در بین گونه‌های مختلف عناب با غلظت 10 mg/ml متغیر بود که خود گواه بر غنی بودن عناب از ترکیبات فنولیک است.

در این مطالعه با استفاده از روش FRAP، قدرت آنتی‌اکسیدانی تام عصاره آبی میوه عناب سنجیده شد. روش FRAP به طور دقیق، سریع و با هزینه کم، قدرت احیاکنندگی آنتی‌اکسیدان‌های مختلفی نظیر ویتامین C،

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.

[Kandimalla](#) و همکارانش 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 ($100 \mu\text{g/ml}$) نسبت به استاندارد آسکوربیک‌اسید، فعالیت بالقوه‌ای دارد (22). Shad و همکارانش، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی میوه عناب را در محدوده غلظتی $0/25-1 \text{ mg/ml}$ 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 به عنوان عامل مهاجم و ایجاد همولیز در گلبول‌های قرمز استفاده می‌شود. ترکیبات آروبیسی نظیر AAPH توانایی نفوذ به درون غشای سلولی از جمله غشای گلبول قرمز را دارند و نسبت به هموگلوبین سرعت 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 همکارانش 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 انجام شده، میوه عناب دارای ترکیبات فنولیک بوده و از خاصیت آنتی‌اکسیدانی خوبی برخوردار است و توانایی مهار رادیکال‌های آزاد را دارد. این

منابع:

1. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*. 2010;4(8):118-26.
2. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 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 journal of biotechnology*. 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. *Nutrition journal*. 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 University of Medical Sciences* 2004;11(1):5-13.[Persian]
6. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. 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 Chemistry*. 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 and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2010;48(2):639-43.
10. Tahergorabi Z, Abedini MR, Moodi M, Hassanpour Fard M, Beydokhti H. "*Zizyphus jujuba*": A red fruit with promising anticancer activities. *Pharmacognosy reviews*. 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 Research*. 1989;11(5):263-73.
12. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. Volume 299: Academic Press; 1999. p. 152-78.
13. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*. 1996;239(1):70-6.
14. Brand-Williams W, Cuvelier M-E, 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. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 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 University of Medical Sciences*. 2007;14(3):19-27.
17. Olajuyigbe OO, Afolayan AJ. Phenolic content and antioxidant property of the bark extracts of *Zizyphus mucronata* Willd. subsp. *mucronata* Willd. *BMC complementary and alternative medicine*. 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 Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 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 vulgaris syrup and their protective effects on hepatic damages induced by CCl4 in the rat. *Birjand University of Medical Sciences*. 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 (*Zizyphus jujuba* Mill.) from China. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 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 *Zizyphus jujuba* Mill. Root Bark against Hepatic Injury and Chronic Inflammation via Inhibiting Inflammatory Markers and Oxidative Stress. *Frontiers in pharmacology*. 2016;7:298.
23. Shad AA, Ahmad S, Ullah R, NM. A-S, H. F, Rehman. U, et al. Phytochemical and biological activities of four wild medicinal plants. *The Scientific World Journal*. 2014;2014:7.

24. Chiste 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. *Journal of food science*. 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 complementary and alternative medicine*. 2010;10:54.