بررسی فارماگنوزی، سنجش محتوای فنل و فلاونوئید تام و بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره ساقه و برگ ۶ گونه *Stellaria* و دو جنس نزدیک آن در ایران

مریم کشاورزی[۱]*، سمیه اسفندانی بزچلویی[۲]، خدیجه کیارستمی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۰۳
تاریخ تصویب: ۹۳/۰۳/۰۵

چکیده

در این مطالعه به بررسی عصاره کل گیاه به روش خیساندن برای بررسی حضور ترکیبات موثره، سنجش خاصیت آنتی اکسیدانی، ترکیبات فنلی و فلاونوئید کل در میان ۶ گونه جنس Stellaria و دوگونه نزدیک آن شامل Myosoton aquaticum و Mesostemma kotschyanum متعلق به زیر خانواده Alsinoides از خانواده میخک پرداخته شده است. محتوای ترکیبات فنول و فلاونوئید به ترتیب به روش های فولن- سیوکالتیو و کلرید آلومینیوم اندازه گیری شد. نتایج نشان

۱ دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (نویسنده مسئول: Neshat112000@yahoo.com).
۲ دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا.
۳ دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا.

(DOI): 10.22051/jab.2016.2478

داد که تفاوت معنی داری بین میانگین های محتوای ترکیبات فنل و فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی گونه های مختلف وجود دارد .(P< ۰,۰۱) نتایج نشان داد که محتوای ترکیبات فنل کل در ۸ گونه مطالعه شده از ۰/۰۲۸ ± ۱ تا ۰/۶۹ ± ۸/۱۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک و محتوای فلاونوئید کل از ۰/۰۲۶ ± ۱ تا ۰/۵۹ ± ۶/۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک متغیر بود. بیشترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در گونه S. alsinoides با مقدار IC۵۰ معادل ۰/۱ ± ۳ میلی گرم بر میلی لیتر وزن خشک مشاهده شد.

واژه های کلیدی: خاصیت آنتی اکسیدانی، محتوای فنل و فلاونوئید، Stellaria

مقدمه

آنتی اکسیدان ها در بدن موجودات زنده وظیفه خنثی سازی فعالیت های اضافی رادیکال های آزاد از قبیل اکسیژن را بر عهده دارند. یکی از مهمترین آنتی اکسیدان های طبیعی، مواد پلی فنلی نظیر ویتامین ها، رنگیزه ها و سایر مواد پلی فنلی می باشند که خصوصیات ضد جهش، ضد سرطان و کاهش قند خون را دارا هستند (Shun et al., 2003). رادیکال های آزاد تولید شده در سامانه های غذایی باعث اکسیداسیون خود به خودی و تولید ترکیبات شیمیایی نامطلوب و در نتیجه باعث تندی و بد طعمی ماده غذایی می شوند (Cheman and Jaswir, 2000, Nedyalka et al., 1999). جنس *Stellaria* یا علف قناری متعلق به تیره Caryophyllaceae و زیرتیره Alsinoideae است. این جنس تقریباً دارای ۲۰۰-۱۵۰گونه درسراسر دنیا می باشد(Bittrich, 1993) . پراکنش اصلی این جنس اروپا - و مرکز پراکندگی آن در کوه های شرق آسیای مرکزی است. البته بعضی گونه های این جنس در قاره آفریقا نیز پراکنده اند و برخی گونه ها نیز توزیع جهانی دارند (Bittrich, 1993). رشینگر در فلور ایرانیکا ۹ گونه *Stellaria* را از ایران معرفی کرده است(Rechinger, 1988) . مطالعه بر روی گیاهان دارویی که در مناطق مختلف ایران برای درمان استفاده می شود یکی از کارهای مهمی است که می توان انجام داد. *Stellaria media* (L.) Vill. به عنوان یک گیاه دارویی در طب سنتی چینی و

همچنین در اروپا و آمریکای شمالی معرفی شده است که بیش از ۲۰۰ سال است که از آن استفاده های دارویی می شود این گونه در درمان بیماری های گوارشی، کلیوی، تنفسی و تناسلی به کار برده می شود و سرشار از ویتامین ها، موادمعدنی، فلاونوئیدها، گامالینولنیک اسید، ترکیبات فنلی و بتا کاروتن و روتین می باشد، روتین از نظر درمانی، شکنندگی عروق موئی را کاهش می‌دهد. کل گیاه هم به صورت خام به عنوان سالاد و هم به صورت پخته شده مصرف می گردد و همچنین منبعی برای غذای حیوانات می باشد (Haq et al., 2011 ؛ Rani et al., 2012؛ Ma et al., 2012). Mamedov و همکاران (۲۰۰۵) با مطالعه بر روی ترکیبات شیمیایی از *S. media* به این نتیجه رسیدند که این گیاه دارای ۵ ترکیب شیمیایی از جمله: 6,8-di-C-glucopyranosyl apigenin, quercitin, daucosterol, apigenin می باشد. Sing و Yadav (۲۰۱۰) با بررسی آنالیز فیتوشیمیایی از عصاره کل گیاه *S.media* حضور ترکیبات فنلی و آلکالوئید را نشان دادند و به بررسی ضد میکروبی این عصاره پرداختند و نشان دادند هر دو عصاره آبی و کلروفرمی باعث مهار رشد موجوداتی مانند *Salmonella typhi* و *E. coli* می شود. Bukola و Bernard (۲۰۱۱) با بررسی های فیتوشیمیایی برگ گونه های *Cajanus cajan*, *Stellaria media* و *Tetracera potatoria* دریافتند که انواع مختلفی از متابولیت های ثانویه همانند آلکالوئید، تانن، گلیکوزید قلبی و فلاونوئید در گونه ها وجود دارند. سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH نشان داد که گونه *T. potatoria* با IC_{50} ۲۷۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر دارای بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد (۸۲/۳ ٪) می‌باشد.

Ghedira (۲۰۰۵) پی برد که گیاه *S. media* دارای روتین می باشد. Jekendra و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی ترکیبات، متابولیت های ثانویه، مواد معدنی و فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه *S. media* دریافتند IC_{50} ۲۰۸/ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد و نشان دادند که محتوای ترکیبات معدنی که در برگ این گیاه وجود دارد تا حدودی برای انسان مفید می باشد. اما تا به حال هیچ بررسی فیتوشیمیایی بر روی گونه های *Stellaria* در ایران انجام نشده است با توجه به این که در بعضی مناطق شمال ایران گونه *S. media* در پخت نان و به عنوان سبزی مصرف زیادی دارد و این گونه در همه جای دنیا و در تمام مناطق ایران رشد می کند هدف از پژوهش شناسایی ترکیبات موثره در این گونه ها می باشد بدین جهت به بررسی عصاره کل گیاه به روش خیساندن برای بررسی آنالیز فیتوشیمیایی، سنجش خاصیت آنتی اکسیدانی، ترکیبات فنل و فلاونوئید کل در میان گونه های *S. media*, *S. pallida* (Dumort.) Pire, *S. holostea* L., *S. persica* Boiss., *S. graminea* L., از بخشه *Stellaria*

و گونه *S. alsinoides* Boiss & Buhse از بخشه *Pseudalsine Boiss* و همچنین جنس های نزدیک آن شامل *Myosoton aquaticum* (L.) Moench. و *Mesostemma kotschyanum* (Fenzl ex Boiss.) از ایران پرداخته شده است.

مواد و روش ها

جمع آوری گیاه

در این مطالعه به منظور بررسی های فیتوشیمی بر روی جمعیت های گوناگون ۶ گونه از *Stellaria* و همچنین *Myosoton aquaticum* و *Mesostemma kotschyanum* در ایران پرداخته شد. به این منظور سفرهایی به استان های تهران، اصفهان، مازندران، گیلان، مرکزی، البرز و گلستان صورت گرفت. نمونه برداری از اسفند ۱۳۹۰ تا تابستان ۱۳۹۲ صورت گرفت. گونه های مطالعه شده در هرباریوم دانشگاه الزهرا (ALUH) نگه داری شده اند که مشخصات آنها در جدول ۱ مشاهده می شود.

جدول ۱: مشخصات جمعیتها و گونه های مورد مطالعه در این تحقیق

نام تاکسون	مشخصات جمعیت و شماره هرباریومی	نام جمع آوری کننده	مختصات جغرافیایی
Stellaria media (L.) Vill.	*تهران، ونک، ۱۳۰۰ متر، (ALUH 993)*	*اسفندانی بزچلویی*	۳۵° ۴۶' ۲۱/ ۵۱" N ۵۱° ۲۳' ۲۶/ ۲۷" E
S. pallida (Dumort.) Pire	*گلستان، گرگان، رامیان، ۲۲۰ متر، (ALUH 1030)*	*اسفندانی بزچلویی*	۳۷° ۰۱' ۰۳/ ۴۱" N ۵۵° ۰۹' ۱۱/ ۶" E
S. holostea L.	*تهران، کرج، جاده چالوس، سیاه بیشه ۲۲۰۰ متر، (ALUH 1032)*	*اسفندانی بزچلویی*	۳۶° ۱۲' ۵۰/ ۰۱" N ۵۱° ۱۸' ۵۲/ ۵۶" E
S. persica Boiss.	*تهران، کرج، جاده چالوس، تونل کندوان، ۲۸۰۰ متر، (ALUH 1035)*	*اسفندانی بزچلویی*	۳۶° ۰۹' ۱۰/ ۲۵" N ۵۱° ۱۸' ۴۲/ ۲۵" E
S. graminea L.	*تهران، کرج، جاده چالوس، تونل کندوان، ۲۸۰۰ متر، (ALUH 1036)*	*اسفندانی بزچلویی*	۳۶° ۰۹ ۱۰' / ۲۵" N ۵۱° ۱۸ ' ۴۲/ ۲۵" E
S. alsinoides Boiss & Buhse	*مازندران، جاده هراز، امام زاده هاشم، ۲۷۰۰ متر، (ALUH 1038)*	*اسفندانی بزچلویی*	۳۵° ۴۶' ۴۹/ ۳۰" N ۵۲° ۰۲' ۲۱/ ۹۴" E
Myosoton aquaticum (L.) Moench	*گیلان، رضوان شهر، روستای خوشابیره، ۴۰ متر، (ALUH 1040)*	*اسفندانی بزچلویی*	۳۷° ۳۲' ۳۹/ ۷۱" N ۴۹° ۰۸' ۰۳/ ۷۳" E
Mesostemma kotschyanum (Fenzl in Boiss) Vved. Subsp. kotschyanum	*تهران، توچال، نزدیک تله کابین دوم، ۲۹۰۰ متر، (ALUH 1041)*	*اسفندانی بزچلویی*	۳۵° ۵۲' ۵۹/ ۰۵" N ۵۱° ۲۵' ۰۸/ ۱۱" E

(ALUH مخفف هرباریوم دانشگاه الزهرا (س) می باشد)

مواد شیمیایی

همه مواد شیمیایی و حلال های استفاده شده در این پژوهش از شرکت مرک (آلمان) با درصد خلوص بالا تهیه شده است.

بررسی فارماگنوزی

ابتدا جهت عصاره گیری به روش خیساندن، به ۳۰ گرم از پودر گیاه خشک شده ۲۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درجه اضافه گردید و محلول فوق به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد و هر ۴ الی ۵ ساعت یکبار هم زده شد سپس عمل صاف کردن با استفاده از کاغذ صافی انجام شد و با استفاده از روتاری تغلیظ وکلروفیل زدایی نمودیم سپس ۵۰ میلی لیتر به آن آب مقطر اضافه گردید و مجدداً محلول فوق را صاف کرده و عصاره را در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری کردیم (Sing and Yadav, 2010). جهت انجام تست های فیتوشیمی بدین صورت عمل کردیم:

۱- آزمون فلاونوئید

- با استفاده از آزمون هیدروکسید سدیم: به ۲-۱ میلی لیتر ازعصاره حاصل درون یک لوله آزمایش، چندقطره از محلول NaOH اضافه گردید تا رنگ زرد تشکیل شد، سپس با اضافه کردن چند قطره HCL رقیق تبدیل رنگ زرد به سفید یا بی رنگ شدن نشان دهنده وجود فلاونوئیدهاست (Bahatt and Dhyani, 2011).

-با استفاده از آزمون فلاونوئید: به ۲-۱ میلی لیتر از عصاره حاصل درون یک لوله آزمایش،۵ میلی لیتر اتیل استات اضافه گردید تشکیل رنگ زرد در فاز آلی نشان دهنده وجود فلاونوئیدهاست (Bahatt and Dhyani, 2011).

۲- آزمون آلکالوئید

- با استفاده از معرف درژاندروف: به ۲-۱ میلی لیتر از عصاره حاصل درون یک لوله آزمایش، چند قطره از معرف درژاندروف اضافه گردید ، تشکیل یک رسوب قهوه ای- نارنجی نشان دهنده وجود آلکالوئیدهاست (Bahatt and Dhyani, 2011).

طرز تهیه معرف درژاندروف: الف) مقدار ۰/۶ گرم سونیترات بیسموت در ۲ میلی لیتر اسید کلروهیدریک غلیظ حل شده و ۱۰ میلی لیتر آب اضافه گردید. محلول ب) مقدار ۶ گرم یدور پتاسیم در ۱۰ میلی لیتر آب حل شده و سپس ۵ میلی لیتر از هر یک از محلول های فوق به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر و ۲۰ میلی لیتر استیک اسید ۱۰۰٪ خالص اضافه شد (هاربورن، ۱۳۵۸).

- با استفاده از معرف واگنر: به ۲-۱ میلی لیتر از عصاره حاصل درون یک لوله آزمایش، چند قطره از معرف واگنر اضافه گردید، تشکیل یک رسوب قهوه ای-

قرمز نشان دهنده حضور آلکالوئیدهاست (Bahatt and Dhyani, 2011).

طرز تهیه معرف واگنر: مقدار ۲ گرم ید و ۶ گرم یدید پتاسیم به ۱۰۰ میلی لیتر آب اضافه گردید (هاربورن، ۱۳۵۸).

۳-آزمون ساپونین :

- شاخص کف کنندگی: به ۲ میلی لیتر ازعصاره حاصل درون یک لوله آزمایش، ۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه گردید و آن را به مدت ۱۵ ثانیه شدیداً تکان دادیم و سپس محلول فوق را به مدت نیم ساعت به طور ثابت درجا لوله ای قرار دادیم، تشکیل کف پایدار نشان دهنده وجود ساپونین است (Bahatt and Dhyani, 2011).

۴-آزمون فنیک :

به ۲ میلی لیتر از عصاره حاصل درون یک لوله آزمایش، ۳ قطره از مخلوط تازه آماده شده کلرید آهن ۱٪ اضافه گردید و سپس ۱ میلی لیترپتاسیم فروسیانید به آن اضافه شد تشکیل رنگ سبز-آبی نشان دهنده وجود فنل است (Bahatt and Dhyani,2011).

۵-آزمون تانن:

به ۲ میلی لیتر ازعصاره حاصل، درون یک لوله آزمایش، چند قطره معرف $FeCl_3$ ۱۰٪ اضافه نموده تشکیل رنگ سبز مایل به سیاه-آبی تند نشان دهنده حضور تانن است (Kujur et al., 2010).

۶- آزمون فلوباتانین:

تشکیل یک رسوب قرمز وقتی که عصاره آبی از گیاه در HCL ۱٪ جوشانده شود، نشان دهنده حضور فلوباتانین است (Kujur et al., 2010).

۷- آزمون استرول :

- با روش سالکوسکی: به ۱ میلی لیتر از عصاره حاصل درون یک لوله آزمایش، ۲ میلی لیتر محلول کلروفرم اضافه گردید، سپس با اضافه کردن H_2SO_4 غلیظ به آرامی به دیواره لوله آزمایش، تشکیل رنگ قهوه ای درحد فاصل این دو، نشان دهنده وجود استرول است (Bahatt and Dhyani, 2011).

-با روش لیبرمن- بورشارد: به ۱ میلی لیتر از عصاره حاصل درون یک لوله آزمایش، ۲ میلی لیتر محلول انیدرید استیک اضافه گردید و سپس با اضافه کردن H_2SO_4 غلیظ به آرامی به دیواره لوله آزمایش، تشکیل رنگ سبز -آبی نشان دهنده حضور استرول است (Bahatt and Dhyani, 2011).

۸- آزمون گلیکوزید:

-با روش کیلر کیلانی: به ۲ میلی لیتر از عصاره حاصل درون یک لوله آزمایش، ۱ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال خالص

اضافه گردید ، سپس ۱ قطره محلول $FeCL_3$ ۵٪ به آن اضافه شد و سپس H_2SO_4 غلیظ به آن اضافه شد، تشکیل رنگ قهوه ای در وسط و رنگ سبز آبی در لایه فوقانی نشان دهنده حضور گلیکوزیداست (Bahatt and Dhyani, 2011).

سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی، ترکیبات فنلی و فلاونوئید کل

استخراج عصاره

ابتدا به ۳ گرم از پودر گیاه خشک شده ۱۰ میلی لیتر متانول مطلق اضافه شد و مخلوط را به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق قرار دادیم و آن را هر ۴ الی ۵ ساعت یکبار هم زدیم. عصاره استخراج شده برای انجام مراحل بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گرفت .(Bahatt and Dhyani, 2011)

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH

جهت تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی از رادیکال آزاد و پایدار DPPH استفاده شد . برای سنجش میزان خاصیت آنتی اکسیدانی گونه های مختلف *Stellaria* , *Myosoton* و *Mesostemma* مقدار ۸۰-۱ میکرولیتر از عصاره ها با اضافه کردن متانول مطلق به حجم ۲ میلی لیتر رسید. سپس در شرایط تاریکی ۱ میلی لیتر محلول ۰.۰۰۴ درصد DPPH در متانول به آن اضافه شد و بعد از ۱۵ دقیقه قرار گرفتن در تاریکی جذب نمونه ها در۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر CECILL (ساخت انگلستان) خوانده شد و در نهایت با استفاده از فرمول زیر به دام اندازی رادیکال های آزاد DPPH اندازه گیری شد (Akowuah et al., 2005).

$$\mathbf{I}\% = \left[\frac{\mathbf{Ablank-Asample}}{\mathbf{Ablank}}\right] \times 100$$

در این فرمول Ablank-Asapmle به ترتیب جذب نوری کنترل منفی را که فاقد عصاره می باشد و میزان جذب نوری غلظت های مختلف عصاره را بیان می کند و I٪ مهار رادیکال آزاد DPPH را نشان می دهد. برای مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی گونه های مختلف از پارامتر IC_{50} استفاده شد. IC_{50} بیانگر غلظتی از نمونه است که باعث مهار جاروب کردن ۵۰٪ رادیکال های آزاد DPPH می شود و برحسب mg پودر خشک گیاه در میلی لیتر عصاره تعیین شد.

تعیین مقدار ترکیبات فنلی کل

محتوای ترکیبات فنلی کل بر اساس روش رنگ سنجی فولن - سیوکالتو با استفاده از گالیک اسید به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (Marinova et al., 2005). ابتدا محلول‌های استاندارد با غلظت‌های mgl^{-1} ۱۰۰-۰ از محلول مادر گالیک اسید (GAE) در آب مقطر تهیه گردید. به۰/۲ میلی‌لیتر از هر محلول استاندارد ۱/۸ میلی لیتر آب مقطر

اضافه شد، سپس ۰/۲میلی‌لیتر معرف فولین- سیوکالیتو رقیق ($_{V/V}$ ۱:۱۵) اضافه شد. سپس ۳ میلی‌لیتر از محلول ۷۵٪ کربنات سدیم به آن افزوده شده و به حجم ۵ میلی لیتر رسید بعد از ۹۰ دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه جذب آنها در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده و منحنی استاندارد آن رسم گردید.

در مورد نمونه های مجهول مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره گیاهی گونه‌های مختلف برداشته شده و پس از طی مراحل ذکر شده برای رسم منحنی استاندارد، مقدار ترکیبات فنلی بر حسب mg GAE g^{-1} DW بدست آمد.

تعیین مقدار ترکیبات فلاونوییدی

محتوای فلاونوئید کل به روش رنگ سنجی کلراید آلومینیوم با استفاده از کوئرستین به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (Beketov et al., 2005) ابتدا محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۱۰۰ mg l^{-1} -۰ از محلول مادر کوئرستین در متانول مطلق تهیه گردید، سپس به ۰/۲ میلی‌لیتر محلول استاندارد ۰/۲ میلی‌لیتر کلراید آلومینیوم و ۰/۱ میلی‌لیتر استیک‌اسید ۳۳٪ آبی افزوده و به خوبی هم زده شد. در نهایت مخلوط واکنش با اتانل ۹۰ درصد به حجم ۵ میلی‌لیتر رسیده و لوله‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. میزان جذب نوری آن‌ها در طول موج ۴۱۴ نانومتر خوانده و منحنی استاندارد رسم گردید. در مورد نمونه‌های مجهول مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره گیاهی گونه‌های مختلف پس از طی مراحل ذکر شده برای رسم منحنی استاندارد، سنجش شده و میزان فلاونوئید کل برحسب mg g^{-1} DW بدست آمد.

تجزیه و تحلیل داده ها

همه آزمایش ها در قالب ۳ تکرار انجام شد. داده های حاصل از سنجش های انجام شده در ۸ گونه مورد بررسی بر اساس روش آنالیز واریانس یک طرفه(ANOVA) با استفاده از نرم افزار SPSS version ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج هر یک از گروه ها برحسب میانگین(±SD) تعریف شد.

نتایج

نتایج بررسی فارماگنوزی نشان داد که گونه های مختلف حداقل دارای یکی از انواع آلکالوئیدها، فلاونوئید، ساپونین، گلیکوزید، استرول و تانن می باشد. نتایج بررسی فارماگنوزی به روش عصاره گیری کل گیاه با استفاده از اتانول برای گونه های مورد بررسی در جدول۲ آورده شده است و نشان می دهد که گونه های *S. media*، *Myosoton aquaticum* و *Mesostemma kotschyanum* دارای متابولیت ثانویه آلکالوئید می باشد و سایر گونه ها به دلیل مقدار بسیار کم در این آزمون قابل شناسایی نمی باشند. تانن، فلوباتانین و ترکیبات فنلی در همه

گونـه هـا حضـور داشـته و از ایـن لحـاظ بیـن گونـه هـا اختلافـی مشـاهده نشـد تنهـا در *S. media* و *S. holostea* آزمـون سـاپونین مثبـت و در سـایر گونـه هـا ایـن آزمـون منفـی بـود (تشـکیل کـف پایـدار نداشـتیم)، آزمـون گلیکوزیـد در *S. holostea* و *S. pallida* منفـی بـوده (دارای گلیکوزیـد کمتـری نسـبت بـه بقیـه گونـه هـا مـی باشـند) درحالیکـه در سـایر گونـه هـا مثبـت (مقـدار آن زیـاد بـوده و بـه راحتـی قابـل تشـخیص بودنـد) بودنـد. بـا انجـام آزمـون فلاونوئیـد به روش هیدروکسـید سـدیم حضـور ایـن مـاده در همـه گونـه هـا تاییـد شـد ولـی آزمـون اسـتات اتیـل بـرای حضـور ایـن مـاده در همـه گونـه هـا منفـی مـی باشـد. حضـور اسـترول در گونـه هـا بـا روش هـای Salkowski و Liberman انجـام شـد کـه در *S. media* و *S. pallida* منفـی و در سـایر گونـه هـا مثبـت شـد. ایـن یافتـه هـا بـا نتایـج (Kujur et؛Sing and Yadav , 2010 Bahatt and Dhyani, 2011 ؛al., 2010) کـه

جدول۲: نتایج کیفی و بررسی فارماگنوزی با استفاده از عصاره اتانولی کل گیاه برای گونه های مورد بررسی

Taxa		*S. media*	*S. pallida*	*S. holostea*	*S. graminea*	*S. persica*	*Myosoton aquaticum*	*Mesostemma kotschyanum*
آلکالوئید	D	+	−	−	−	−	+	+
	V	+	+	−	−	−	+	+
تانن		+	+	+	+	+	+	+
ساپونین		+	−	+	−	−	−	−
فلاونوئید	A	+	+	+	+	+	+	+
	N	−	−	−	−	−	−	−
استرول	S	−	−	−	+	+	+	+
	L	−	−	+	+	+	−	+
گلیکوزید		+	−	−	+	+	+	+
فنول		+	+	+	+	+	+	+
فلوباتانین		+	+	+	+	+	+	+

($_D$ روش درژانـدروف، $_V$ روش واگنـر، $_N$ روش NaOH ، $_A$ روش اسـتات اتیـل، $_S$ روش Salkowski ، $_L$ روش Liberman علامـت + نشـان دهنـده وجـود مـاده بـه مقـدار زیـاد و علامـت – وجـود مـاده بـه مقـدار خیلـی ناچیـز)

بررسی های فیتوشیمیایی مقدماتی بر روی گونه *S. media* انجام داده بودند تطابق دارد. نتایج حاصل از سنجش محتوای فنل کل با معرف فولین- سیوکالتئو نشان می دهد که محتوای فنل کل در نمونه ها بین ۱ تا ۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک متغیر است. گونه *S. alsinoides* با مقدار ۸/۱۸ ، بیشترین و گونه *S. pallida* با مقدار ۱ میلی گرم بر گرم وزن خشک کم ترین محتوای ترکیبات فنلی را نشان دادند (جدول۳). بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده ها برای جمعیت های مطالعه شده در سطح احتمال ۰.۰۵ >P معنی دار بود. محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئید کل در دو گونه *S. persica* و *Myosoton aquaticum* اختلاف معنی داری نشان نمی دهد. همچنین گونه *S. alsinoides* با مقدار۶/۷ ، بیشترین و گونه *S. pallida* با مقدار ۱ میلی گرم بر گرم وزن خشک کم ترین محتوای ترکیبات فلاونوئیدی را نشان دادند (جدول۳). بر اساس نتایج آماری محتوای فلاونوئید عصاره کل جمعیت های مطالعه شده در سطح احتمال ۰.۰۵ >P معنی دار بود همچنین محتوای فلاونوئید کل ۳ گونه *S. persica*، *S. graminea* و *Myosoton aquaticum* تفاوت معنی داری نشان ندادند.

میانگین IC_{50} ۶ گونه *Stellaria* و *Mesostemma kotschyanum* و *Myosoton aquaticum* با استفاده از عصاره متانولی کل گیاه، به روش سنجش خاصیت آنتی اکسیدانی با معرف DPPH در جدول ۳ نشان داده شده است. در این بررسی بیشترین IC_{50} و کمترین خاصیت آنتی اکسیدانی متعلق به ۳ *S. pallida* (۱/ ±) ۲۸ بعد از آن به ترتیب گونه های *S. media* < *S. graminea* < *S. holostea* < *Myosoton aquaticum* < *Mesostemma kotschyanum* < *S. persica* < *S. alsinoides* دارای بیشترین IC_{50} و کمترین خاصیت آنتی اکسیدانی به ترتیب ۱/۹± ۲۷، ۱/۵±۲۵، ۰/۹±۱۲/۵، ۰/۷± ۱۲ ، ۰/۵± ۱۳، ۰/۵± ۶، ۰/۱± ۳ میلی گرم بر میلی لیتر وزن خشک بودند. بر اساس نتایج آماری میزان IC_{50} عصاره کل گیاه ۶ گونه *Stellaria* و *Mesostemma kotschyanum* و *Myosoton aquaticum* در

جدول۳: محتوای فنول و فلاونوئید کل در ۸ گونه مورد بررسی. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح ۰.۰۵ >P است.

گونه	محتوای فلاونوئید کل(mg/g)	محتوای فنل کل(mg/g)	IC_{50} (mg DW ml^{-1})
Stellaria media	۲/۵۸ ±۰/۰۳۳^{d}	۲/۷۴±۰/۰۷۶^{e}	۲۷ ±۱/۹^{d}
S. pallida	۱ ±۰/۰۲۶^{e}	۱/۲۵±۰/۰۲۸^{e}	۲۸± ۱/۳ ^{d}

S. holostea	۵/۸ ±۰/۵^{b}	۵/۲±۰/۴۳^{c}	۱۲/۵±۰/۹^{c}
S. persica	۴/۶ ±۰/۲۹^{c}	۳/۹۵± ۰/۲۹^{d}	۶ ±۰/۵^{b}
S. graminea	۴/۲ ±۰/۰۴۵^{c}	۷/۶۷ ±۰/۶۳^{b}	۱۲ ±۰/۷^{c}
S. alsinoides	۶/۷ ±۰/۵۹^{a}	۸/۱۸±۰/۶۹^{a}	۳ ±۰/۱^{a}
Myosoton aquaticum	۴/۵ ±۰/۳^{c}	۴/۲±۰/۳۳^{d}	۲۵±۱/۵^{d}
Mesostemma kotschyanum	۲ ±۰/۰۲۹^{d}	۳/۹۳ ±۰/۰۱۵^{d}	۱۳ ±۰/۵^{c}

سطح احتمال ۰.۰۵ >P معنی دار بود.

بحث

نتایج بررسی های فارماگنوزی نشان می دهد که گونه *S. media* حاوی تانن، آلکالوئید، ساپونین، گلیکوزید، ترکیبات فنلی و فلاونوئید است. سنجش خاصیت آنتی اکسیدانی با روش DPPH نشان داد $IC_{۵۰}$ این گونه ۲۷ میلی گرم بر میلی لیتر است که در مقایسه با نتایج بررسی های Bukolaو Bernard (۲۰۱۱) که ۰/۲۱$IC_{۵۰}$ میلی گرم بر میلی لیتر را برای این گونه گزارش دادند بیش از صد برابر است. فعالیت آنتی اکسیدانی مشاهده شده در این گیاه را می توان به حضور ترکیبات فنلی نسبت داد. تفاوت خاصیت آنتی اکسیدانی مشاهده شده در این پژوهش ممکن است مربوط به تفاوت روش عصاره گیری و حلال های مورد استفاده یا رویشگاه گیاه در روش Bukola و Bernard (۲۰۱۱) باشد که از طریق تاثیر نوع حلال روی نوع ترکیب های استخراج شده می تواند غلظت رادیکال های آزاد در سنجش DPPH را تغییر دهد (Litwinienkol and Engold, 2007).

بررسی های Bukola و Bernard (۲۰۱۱) نشان داد که این گونه سطح قابل ملاحظه ای از فلوباتانین و ساپونین دارد. همچنین Singhو Yadav (۲۰۱۰) با بررسی عصاره قسمت های هوایی گونه *S. media* دریافتند این گونه در حلال های مختلف همانند کلروفرم و آب دارای انواع متفاوتی از متابولیت های ثانویه همانند فلاونوئید، آلکالوئید، ساپونین، تانن و گلیکوزید می باشد. یافته های این پژوهشگران مبنی بر حضور فلاونوئید، آلکالوئید، ساپونین، تانن و گلیکوزید با یافته های ما همخوانی دارد. بررسی حضور ترکیبات مختلف در سایر گونه های *Stellaria* نشان داد که این گونه ها از نظر حضور با یکدیگر تفاوت داشته و گونه *Myosoton aquaticum* بیشترین شباهت را به *S. media* دارد در زمینه فارماگنوزی این گونه ها گزارشی

دریافت نکردیم. فلاونوئید ها انواعی از ترکیبات فنلی هستند که در گستره وسیعی از گیاهان با بیش از ۸۰۰۰ ترکیب مختلف شناسایی شده اند که دارای خاصیت آنتی اکسیدان و ضد میکروبی می باشند و بعضی از آنها ضد حساسیت هستند (Pietta, 2000) . در برخی گیاهان فعالیت آنتی اکسیدانی ممکن است به علت وجود ترکیب های ناشناخته یا برهم کنش های سینرژیک (همیاری) بین مواد مختلف باشد. علاوه بر ساپونین ها، ترکیبات فنلی و فلاونوئید ها نیز از آنتی اکسیدان های مشهور گیاهی هستند. هر گیاه دارای طیف وسیعی از ترکیب های فنلی است و خاصیت آنتی اکسیدانی هر کدام از این مواد وابسته به ساختار شیمیایی آنها می باشد (صبورا و همکاران، ۱۳۹۲).

با توجه به نتایج این پژوهش بررسی های فلاونوئید و ترکیبات فنل کل که با استفاده از عصاره متانلی کل گیاه، سنجیده شده بود نشان داد که بیشترین محتوای ترکیبات فلاونوئیدی (۶/۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک) و ترکیبات فنلی (۸/۱۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک) متعلق به *S. alsinoides* و کمترین محتوای فلاونوئید و فنل کل (۱ میلی گرم بر گرم وزن خشک) متعلق به *S. pallida* به دست آمد (جدول ۳). Singh و Yadav (۲۰۱۰) محتوای ترکیبات فنل را با استفاده از معرف فولین- سیوکالتیو در گونه *S. media* ۰/۲۵ ± ۴۵/۵ میلی گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک محاسبه کردند که با نتایج ما در مطالعه حاضر مطابقت نداشته که به علت اختلاف در روش استخراج می باشد. سنجش خاصیت آنتی اکسیدانی با معرف DPPH نشان داد که بیشترین IC_{50} (۱/۳ ±۲۸) و کمترین خاصیت آنتی اکسیدانی متعلق به *S. pallida* و کمترین مقدار IC_{50} ۰/۱ ±۳ میلی گرم بر میلی لیتر وزن خشک و بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی متعلق به *S. alsinoides* به دست آمد. مقایسه محتوی ترکیب های فنلی و فلاونوئیدی این دوگونه *S. alsinoides* و *S. pallida* که در بالا ذکر شده است هماهنگ با تغییرات خاصیت آنتی اکسیدانی آنهاست و همبستگی مثبتی با این دو عامل نشان می دهد به نحوی که با افزایش مختصر فنل و فلاونوئید کل میزان IC_{50} آنها به نحو قابل توجهی کاسته شده همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است مقدار IC_{50} گونه *S. holostea* (جمعیت سیاه بیشه) ، *S. graminea* (جمعیت کندوان از چالوس) و *Mesostemma kotschyanum* (جمعیت توچال) تفاوت معنی داری را نشان ندادند و خاصیت آنتی اکسیدانی آنها در حد متوسط می باشد (جدول ۳)که شاید به علت رویشگاه یکسان این گونه ها که کوهستانی می باشد و در ارتفاعات یکسانی رشد می کنند و به لحاظ اکولوژیکی دارای دما و رطوبت تقریبا یکسانی هستند، باشد.

با توجه به این که گونه *S. media* دارای ارزش خوراکی در منطقه شمال ایران و همچنین به علت گستردگی و پراکنش فراوان این گونه در سراسر جهان، مطالعات ما در این پژوهش نشان داد که سایر گونه های *Stellaria* دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به این گونه می‌باشد در صورت مطالعات تکمیلی و بررسی کاربرد عصاره گونه های مطالعه شده می توان از این عصاره ها در صنایع غذایی و داروسازی استفاده کرد.

منابع

هاربورن، ج.(۱۳۵۸). روش های نوین تجزیه شیمیایی گیاهان/ ترجمه یعقوب آینه چی. انتشارات دانشگاه تهران. تهران.

صبورا، ع.(۱۳۹۲). سنجش محتوای فنول و فلاونوئید تام و بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره ساقه وبرگ ۶ گونه میخک وحشی (Dianthus L.) در ایران. فصلنامه علمی – پژوهشی گیاهان دارویی و معطر ایران ۲۹ (۲): ۲۹۵-۲۸۱

Akowuah, G.A., Ismail, Z., Norhayati, I. and Sadikun, A. (2005). The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of orthosiphon stamineus and evaluation of the free radical. Scavenging activity Journal of Food Chemistry 93: 311-317.

Beketov, E.V., Pakhomov, V.P.P. and Nesterova, O.V. (2005). Improved method of flavonoid extraction from bird cherry fruits. Journal of Pharmaceutical Chemistry 39(6): 3-35.

Bittrich, V. (1993). Caryophyllaceae.The families and genera of vascular plants, Flowering plants, Dicotyledons Magnoliid, Hamamelid and caryophyllid families. Pp. 206-236. in: K. Kubitzki, J. Rohwer and V. Bittrich (eds). Vol. 2, Springer –Verlag. Berlin, Germany.

Bukola, O. and Bernard, S. (2011). Phytochemistry and in vitro anti-oxidant activities of Stellaria media, Cajanus cajan and Tetracera potatoria methanolic extracts. Journal of Medicinal Plants Research 5(30): 6622-6627.

Bahatt, S. and Dhyani, S. (2011). Preliminary phytochemical screening of Ailanthus excelsa roxb. International Journal of Pharmaceutical 4(1): 87-89.

Cheman, Y. and Jaswir, I. (2000). Effect of rosemary and sage extracts on frying performance of refined, bleached and deodorized (RBD) palm olein during deep-fat frying. Food Chemistry. 69: 301 - 7.

Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytothérapie, Numéro 3(4): 162-169.

Haq, F., Ahmad, H. and Alam, M. (2011). Traditional uses of medicinal plants of Nandiar Khuwarr catchment (District Battagram), Pakistan Journal of Medicinal Plants Research 5(1): 39-48.

Jekendra, S., Joylani, S.D., Rebika, N.D. and Priyadarshini, S. (2011). Secondary Metabolites, Antioxidant Status and Nutritive Composition of Two Non-Conventional Leafy Vegetables - *Stellaria media* L. and Chenopodium album L. Indian Journal of Agricultural Biochemistry 24(2): 136-140.

Litwinienko, G. and Ingold, K.U.)2007 (. Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals. Accounts of Chemical Research 40(3): 222-230.

Kujur, R.S., Sing,V., Ram, M., Yadav, H., Sing, K.K., Kumrari, S. and Roy, B. K. (2010). Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of Stevia rebaudiana in alloxan- induced diabetic rats. Pharmacognosy Research 2(4): 258-263.

Marinova, D., Ribarova, F. and Atanassaova, M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallugy 40(3): 255-260.

Mahasneh, A.M. and El-Oqlah, A.A. (1999). Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. Journal of Ethnopharmacology 64(3): 271–276.

Ma, L., Song, J., Shi, Y., Wang, C., Chen, Bin, Xie. D. and Jia, X. (2012). Anti-Hepatitis B Virus Activity of Chickweed [Stellaria media (L.) Vill.] Extracts in Hep G2.2.15 Cells. Molecules, 17(7): 8633-8646.

Mamedov, N., Gardner, Z. and Craker, L.E. (2005). Medicinal Plants Used in Russia and Central Asia for the Treatment of Selected Skin Conditions.

Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants 11:(1/2) 191-222.

Nedyalka, V., Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M., Gordon, M.H. and Raneva, V.G. (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. Food Chemistry. 64: 59 -66.

Pietta, P. (2000). Flavonoids as antioxidants. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants. 63(7): 1035-1042.

Qureshi, S. J. and Khan, M. A. (2001). Ethnobotanical study of Kahuta from Rawlpindi district Pakistan. Journal of Biological Sciences 1(1): 27-30.

Rani, N., Vasudeva, N. and Sharma, S. K. (2012). Quality assessment and anti-obesity activity of *Stellaria media* (Linn.) Vill . Rani et al. BMC Complementary and Alternative Medicine 12:145-153.

Rechinger, K.H. (1988). *Stellaria* L. Flora Iranica. 163: 60- 76. (Rechinger, K. H. Ed.) vol.163, Akademische Druck- U Verlagsanstalt, Graz, Austria.

Singh, B. and Yadav, S. K. (2010). In Vitro studies on antibacterial activity and phytochemical analysis of whole plant extracts of *Stellaria media*. International Journal of Phytomedicine 2 : 260- 26.

Shinwari, M. I. and Khan, M. A. (2000). Folk use of medicinal herbs of Margalla Hills National Park, Islamabad. Journal of Ethnopharmacology 69(1): 45–56.

Srivastav, P. K., Ibohal singh, N. and Sana jaoba, T. H. (2009). Medicinal food plants of Manipur. Annals of Forestry. 17(2): 269-292.

Shun, Y.M., Wen, Y.H., Yong, C.Y. and Jian, G.S. (2003). Two benzyl dihydroflavones from *phellinus igniarius*. Chinese Chemical Letters 14(8): 810-3.