(گزارش کوتاه)

ارزیابی و مقایسه عملکرد آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف دو گونه (*Hyoscyamus kurdicus* Bornm. و *Hyoscyamus niger* L.) در رویشگاه‌های مختلف استان اردبیل

پریا مهدی[۱]، مه‌لقا قربانلی*[۲]، فرزانه عظیمی‌مطعم[۳]

[۱] کارشناسی‌ارشد علوم گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان، ایران

[۲] گروه زیست‌شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاداسلامی، گرگان، ایران

[۳] مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، استان اردبیل، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۹٤/٦/۲۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۹٤/۱۱/٤

چکیده

بذرالبنج (*Hyoscyamus niger* L.) و بذرالبنج کردی (*Hyoscyamus kurdicus* Bornm.) از گونه‌های دارویی و مهم تیره سیب زمینی هستند که در مناطق نیمه خشک و سرد کشور خصوصاً استان اردبیل از رویشگاه‌های طبیعی برخوردار است و در طب سنتی به‌عنوان مسکن، ضد اسپاسم، خواب‌آور و ضدسرطان استفاده می‌شود. در این تحقیق، اندام هوایی و ریشه هر دو گونه در زمان گلدهی از دو رویشگاه قره‌آغاج (۱۲۰۰ متر) و روستای فتح مقصود (۲۲۰۰ متر) واقع در استان اردبیل در قالب طرحی کاملاً تصادفی جمع‌آوری گردید. عصاره‌های متانولی به روش خیساندن و سنجش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به سه روش DPPH، RP و TAC در ٤ تکرار و بر مبنای IC_{50} گزارش گردید. نتایج نشان داد که عملکرد آنتی‌اکسیدانی اندام هوایی گیاه *H. kurdicus* به غیر از روش TAC در هر دو منطقه بیش از اندام ریشه بوده و اینکه مخصوصاً در روش DPPH با افزایش میزان ارتفاع بر عملکرد آنتی‌اکسیدانی گونه‌ها نیز به‌طور معنی‌دار افزایش یافته است، نتیجه اینکه یک رابطه معنی‌دار بین گونه‌ها، اندام و ارتفاع منطقه با عملکرد آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها دارد ($P<۰/۰۵$).

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اردبیل، اندام، بنگ دانه تنوع رویشگاهی، *H. kurdicus*، *H. niger*

*نویسنده مسئول: mahlagha.ghorbanli@yahoo.com

مقدمه

آنتی اکسیدان‌ها به موادی گفته می‌شود که موجب به تاخیر انداختن، کند کردن و یا حتی توقف فرایندهای اکسیداسیونی می‌شوند. این ترکیب‌ها می‌توانند به نحو مطلوبی از تغییر در رنگ و طعم مواد غذایی در نتیجه واکنش‌های اکسیداسیون جلوگیری کنند. مکانیسم اثر آنتی اکسیدان‌ها به این صورت است که با دادن اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد از گسترش واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون جلوگیری می‌کنند (Mohammadi et al., 2014) که در سال‌های اخیر به‌دلیل عوارض جانبی داروهای شیمیایی، توجه بشر بار دیگر به گیاهان دارویی معطوف شده است (Saliani, 2004).

جنس بنگ دانه (*Hyoscyamus*) با حدود ۲۰ گونه متعلق به خانواده سیب‌زمینی، یکی از عوامل اکولوژیکی ناحیه ایرانی- تورانی می‌باشد که همه گونه‌های آن به‌جز چند گونه معدود، در ایران می‌رویند (Ganj Karimi, 1996). به‌طوری‌که از فراورده‌های گونه‌های مختلف این جنس، علاوه بر طب سنتی، در صنایع داروسازی به‌عنوان مدر، ضداسپاسم، آنتی‌کولینرژیک، مسکن و آرام‌بخش استفاده می‌شود (Ghafarzadegan et al., 2009). در کنار خواص ذکر شده خاصیت ضدمیکروبی (Bazzaz and Haririzadeh, 2003) و ضدکاندیدایی نیز برای این گیاهان به‌ویژه برای گونه *Hyoscyamus niger* L. گزارش شده است (Dulger et al., 2010).

گیاه دارویی بنگ دانه (بذرالبنج) با نام علمی *Hyoscyamus niger* L.، گیاهی علفی دو ساله، به ارتفاع ٦٠ تا ٨٠ سانتی‌متر، به‌طور خودرو در زمین‌های شخم نزده، سواحل شنی کنار دریاها، کنار جاده‌ها و اطراف ساختمان‌های متروکه می‌روید. این گیاه بومی اروپا می‌باشد ولی به کانادا، آمریکای شمالی، غرب و تمام قسمت‌های جنوبی آسیا برده شده است (Saliani, 2004) و در نقاط مختلف ایران پراکنش دارد. زمان گلدهی آن اواخر بهار تا اواخر تابستان است و خاص منطقه ایران و تورانی می‌باشد. گیاه دارویی بذرالبنج کردی با نام علمی *Hyoscyamus kurdicus* Bornm.، گیاهی علفی، یک ساله یا چند ساله و به ارتفاع ٢٠ تا ٦٠ سانتی‌متر است که دارای میوه کپسول و دانه کلیوی شکل، همراه با تزئینات مشبک است (Khatamsaz, 1998). در طب سنتی از برگ‌ها و دانه این گیاه به‌عنوان ضد تشنج، مسکن، مخدر، باز کننده مردمک چشم، خواب‌آور، ضدسرطان و ضد صرع استفاده می‌شود (Zolfeghari et al., 2012). اغلب مطالعات انجام گرفته روی جنس بنگ دانه بیشتر مربوط به استخراج و عملکردهای دارویی ترکیب‌های ثانویه آلکالوئیدی آن گونه‌ها می‌باشد (Mirzadeh et al., 2011؛ Alaghemand et al., 2013) و اندک بررسی در مورد مقایسه عملکرد آنتی‌اکسیدانی گونه‌های مورد مطالعه صورت گرفته است.

ابراهیم‌زاده و همکاران (Ebrahimzadeh et al., 2009) طی تحقیقی با چند روش، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره میوه‌های گیاه *Hyoscyamus squarrosus* در ناحیه گلستانک (مرکز البرز) را مورد ارزیابی قرار دادند و با تعیین مقدار فنل کل عصاره (١٧٨/٩±٧/٨ میلی‌گرم معادل اسید گالیک) و فلاونوئید کل (١٦/٤±١/٠٦ میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم پودر عصاره)، نشان دادند که به همان دلیل عصاره گیاه از عملکرد آنتی‌اکسیدانی خوبی برخوردار است، به‌طوری‌که برای این گیاه میزان IC_{50} را در روش DPPH برابر با ٠/٣٢٥±٠/٠١٢ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش نمودند بود و اینکه مخصوصاً در روش RP فعالیت مهاری خوبی را علیه نیتریک اکسید در غلظت‌های ٠/١ تا ١/٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (IC_{50}= 0.972±0.07 mg ml^{-1}) و توانایی بالای آن در

کلاته کردن Fe^{2+} با میزان IC_{50}= 104±3.8 µg ml^{-1} نشان داد (P<۰/۰۱).

اسماعیل (Ismeel, 2011) نیز طی تحقیقی در مورد عصاره گیاه *H. niger* جمع‌آوری شده از عراق در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان ۱/۵۱۵ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی را گزارش کرد. القزیر و همکاران (Alghazeer et al., 2012) نیز طی تحقیقی میزان IC_{50} عصاره گیاه *Hyoscyamus albus* را در روش DPPH در محدوده ٦۰ و در روش RP در محدوده ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیترگزارش کردند و آن عملکرد را به مقادیر بالای مقدار فنل (۷/۸۲±٤۸/۵٤ میلی‌گرم معادل گالیک اسید) و فلاونویید کل عصاره (۰/۸۷±۲۷/۳۹ میلی‌گرم معادل روتین در گرم وزن خشک) نسبت دادند. بنابراین با توجه به گستردگی پراکنش دو گونه مورد مطالعه و از طرفی استفاده‌های سنتی آن در منطقه و سپس لزوم جستجو برای یافتن داروهای آنتی‌اکسیدان و طبیعی، این تحقیق برای نخستین بار در استان اردبیل با هدف اندازه‌گیری و مقایسه عملکرد آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف دو گونه فراوان با استفاده از روش‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مشخصات مناطق نمونه‌برداری: اندام‌های هوایی و ریشه گونه‌های *H. niger* و *H. kurdicus* از دو رویشگاه طبیعی زیر در استان اردبیل جمع‌آوری شدند:

۱) دشت مغان به سمت قره آغاج با طول جغرافیایی E ″۱۵ ′۳۱ °٤۷ و عرض جغرافیایی N ″۰۷ ′٤٦ °۳۸ به مساحت ۳۲٦۹/٤۲ هکتار و ارتفاع ۱۲۰۰ متر از سطح دریا، در جنوب غربی شهرستان گرمی واقع شده است. در طول یک دوره ۱۰ ساله (سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۸۳) میانگین درجه حرارت سالانه ۱۱/۷ درجه سانتی‌گراد، میانگین بارندگی سالانه ۳۰۹ میلی‌متر و رطوبت نسبی سالانه ٦۰ درصد و اقلیم منطقه نیمه خشک سرد گزارش شد.

۲) روستای فتح مقصود با طول جغرافیایی E ″۵/۵ ′۲۵ °٤۸ و عرض جغرافیایی N ″٤۸/۳۰ ′۳۵ °۳۸ به مساحت ٤٦۸۲/۹ هکتار و ارتفاع ۲۲۰۰ متر از سطح دریا، در شمال شهر اردبیل و در فاصله ۲۷ کیلومتری آن واقع شده است. در طول یک دوره ۱۰ ساله (سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۸۳) میانگین درجه حرارت سالانه ۹/٦ درجه سانتی‌گراد، میانگین بارندگی سالانه ۳٤٦/۸ میلی‌متر و رطوبت نسبی سالانه ۷۱/۷ درصد و اقلیم منطقه نیمه خشک گزارش شد.

تهیه نمونه گیاهی و خاک مناطق مورد مطالعه: طی عملیات صحرایی فراوان و انتخاب رویشگاه‌های طبیعی دو گونه در استان اردبیل، ریشه و اندام هوایی گونه‌ها در زمان گلدهی در قالب طرحی کاملا تصادفی بین خرداد تا تیرماه سال ۱۳۹۲ از هر دو رویشگاه جمع‌آوری گردید و پس از آن، دور از نور و با جریان هوا خشک شد. سپس جهت تعیین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل انتقال یافت. همچنین نمونه‌برداری از خاک پس از برداشتن سطحی‌ترین لایه خاک از عمق ۰ تا ۳۰ سانتی‌متری جهت شناسایی و آنالیز مهم‌ترین فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی خاک به آزمایشگاه خاک‌شناسی انتقال یافت.

عملیات عصاره‌گیری: برای تهیه عصاره، مقدار ۱۰۰ گرم از پودر هر یک از نمونه‌های گیاهی در ۳۰۰ میلی‌لیتر متانول خالص حل و به‌مدت ۲٤ ساعت با دور ۲۵۰ شیک شد. سپس محلول صاف شد و عصاره صاف شده درون بشر ریخته شد. پس از آن در بن ماری در دمای ٤۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. ۰/۱ گرم از وزن عصاره خشک با ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول به حجم رسانده شد و از آن غلظت‌های مختلف (۱۲/۵،

۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد (Arabshahi and Delouee, 2007).

بررسی عملکرد آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش DPPH: برای تعیین میزان عملکرد آنتی اکسیدانی به روش DPPH از رادیکال آزاد DPPH (2,2-Diphenyl- Picryl- Hydrazyl) مطابق با روش عربشاهی و یوروج (Arabshahi and Urooj, 2007) استفاده شد. به ۳ میلی‌لیتر از هر یک از غلظت‌های تهیه شده از عصاره‌ها، مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH (۱ mM) اضافه شد و در تاریکی قرار داده شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر اندازگیری شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌ها با استفاده از رابطه زیر بدست آمد:

$$R\% = [(AD - AS)/AD] \times 100$$

R%= درصد مهار رادیکال آزاد DPPH

AD= جذب محلول DPPH در ۵۱۷ نانومتر

AS= جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر

برای مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها از پارامتر IC_{50} استفاده شد (IC_{50} غلظتی از عصاره است که ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد را مهار می‌کند).

روش RP[1] (قدرت احیا): به ۱ میلی‌لیتر از هر یک از غلظت‌های تهیه شده از عصاره‌ها، ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH=٦/٦ و ۲/۵ میلی‌لیتر فروسیانید پتاسیم اضافه و هم زده شد و درب لوله‌ها بسته و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری در ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به هر یک مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید اضافه شد و درون لوله‌های پلاستیکی درب‌دار فالکوم ریخته شد. پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۷۰ سانتریفیوژ و سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی درون لوله‌ها، داخل لوله آزمایش ریخته و مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن III اضافه شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت IC_{50} مربوط به نمونه‌های گیاهی با استفاده از معادله خط به‌دست آمده محاسبه گردید (Arabshahi and Urooj, 2007).

سه روش TAC[2] (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل): مقدار ۰/۳ میلی‌لیتر از هر یک از غلظت‌های تهیه شده از عصاره‌ها داخل لوله آزمایش ریخته شد و به هر کدام ۳ میلی‌لیتر معرف TAC اضافه شد و سر لوله‌ها با فویل بسته شد و به‌مدت یک ساعت و نیم در بن‌ماری تحت دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ٦۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. شاهد شامل ۰/۳ میلی‌لیتر متانول و ۳ میلی‌لیتر معرف TAC می‌باشد. میزان IC_{50} برای هر نمونه با معادله خط مربوطه محاسبه گردید. مراحل ساخت معرف TAC، مقدار ۱۵/۹۸۵ میلی‌لیتر از اسید سولفوریک ۰/٦ مولار با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و با مگنت هم زده شد. در مرحله دوم مقدار ۱/۲۳۵ گرم از آمونیوم مولیبدات با ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/٦ مولار، در بشر اضافه و هم زده شد و در بشر دیگر مقدار ۲/٦٦ گرم از تری‌فسفات سدیم ریخته و ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/٦ مولار به آن اضافه و هم زده شد. محتویات این دو بشر در یک بالن ۲۵۰ میلی‌لیتر دیگر ریخته شد (Arabshahi and Urooj, 2007).

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آنالیزها با ٤ تکرار انجام گردید و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن و تجزیه واریانس چند عاملی تحت نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ در سطح ۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. رسم نمودارها با کمک نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۰۷ انجام

1. Reducing power

2. Total antioxidant capacity

شد. نمودارها نشانگر میانگین ± انحراف معیار (SD) می‌باشند.

نتایج

نتایج خاک‌شناسی نشان داد pH خاک هر دو منطقه در محدوده قلیایی (pH=۸) قرار دارد و نوع بافت خاک در رویشگاه ۱۲۰۰ متر (دشت مغان به سمت قره آغاج) سیلتی- لومی و در رویشگاه مرتفع (۲۲۰۰ متر- روستای فتح مقصود) لومی- شنی می‌باشد.

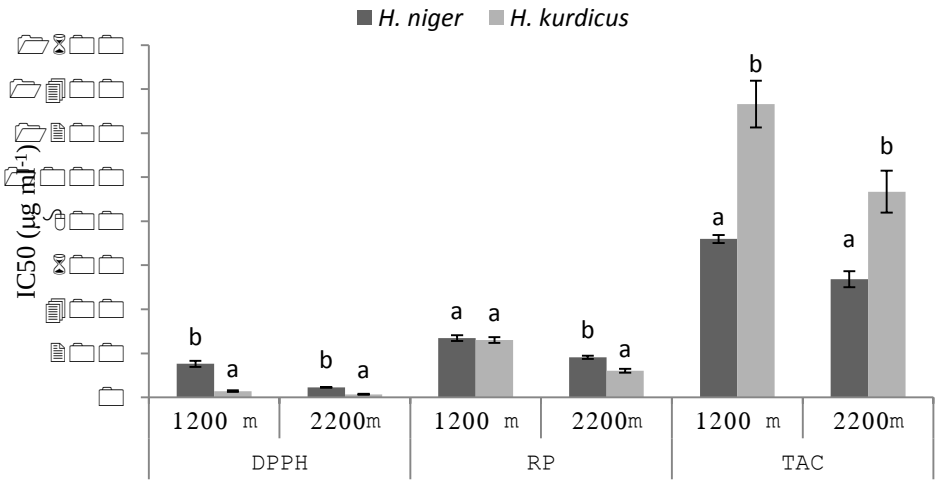
در جدول (۱) نتایج تجزیه واریانس اثر گونه، اندام، ارتفاع و اثرات متقابل این‌ها بر فعالیت آنتی اکسیدانی در سه روش DPPH، RP و TAC ارائه شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، عامل گونه و ارتفاع بر هر سه روش آنتی اکسیدانی اثر معنی‌دار در سطح ۱ درصد داشت. نوع اندام نیز بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روش‌های DPPH و RP به ترتیب اثر معنی‌دار در سطح ۱ درصد و ۵ درصد گذاشت اما در روش TAC فاقد اثر معنی‌دار بود. اثر متقابل گونه× اندام و اندام × ارتفاع بر عملکرد آنتی اکسیدانی در روش‌های RP و TAC اثر معنی‌دار (به‌ترتیب در سطح ۵ و ۱ درصد) داشت اما بر عملکرد آنتی اکسیدانی در روش DPPH فاقد اثر معنی‌دار بود. اثر متقابل گونه× ارتفاع بر عملکرد آنتی‌اکسیدانی در روش‌های DPPH و TAC اثر معنی‌دار در سطح ۱ درصد داشت اما در روش RP اثر معنی‌دار مشاهده نشد. اثر متقابل سه عامل گونه× اندام × ارتفاع نیز بر عملکرد آنتی‌اکسیدانی در روش‌های RP و TAC در سطح ۱ درصد اثر معنی‌دار داشت اما در روش DPPH اثر معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۱: تجزیه واریانس اثر گونه، اندام و ارتفاع محل برداشت بر فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه

منابع تغییر	درجه آزادی	DPPH	RP	TAC
تکرار	۷	۱٤۰۲۷/۳۹٦ **	۱۵۹۷٦/۳٤۷ **	٤۰۹۲٦۳/۰۷۸ **
گونه	۱	٤۷٦۰۹/۱۱۰ **	۲۰٤۷۷/۸۲۰ **	۱٤۸٦۷٤/٤٦٤ **
اندام	۱	٤۱۹۸/۵۷۸ **	۱۱۲۲/۱۹۵ *	۲۱٦۲٤/۵۹٦ ns
ارتفاع	۱	۳۰۷۷۵/۳۱۷ **	۸۳۸۹٦/۳۲۰ **	۱۲۲۱۹۳۰/٦۲۱ **
گونه × اندام	۱	٤/۰۰۷ ns	۱۹٦۰/۹٤۵ *	۱۰۸۸٦۹٤/۵۸۱ **
گونه × ارتفاع	۱	۱۵۵۵۸/٤۸۰ **	٤۳۸/۸۲۰ ns	۲٦۰٤۱۱/۸۰۵ **
اندام × ارتفاع	۱	۷/۰۰۷ ns	۱۰٤۰/۸۲۰ *	۸۰۷٤۱/۰٦۸ **
گونه × اندام × ارتفاع	۱	۳۹/۲۷۲ ns	۲۸۹۷/۵۰۸ **	٤۲۷٦٤/٤۰۸ **
خطای آزمایشی	۲٤	۷۲/۹٤۱	۱۹۱/۲۳۱	۵۱۵۹/۲۲۹
ضریب تغییرات (درصد)	-	۷۹/٤۸۷	۲۸/٦۱۸	۳٤/۲٦۳

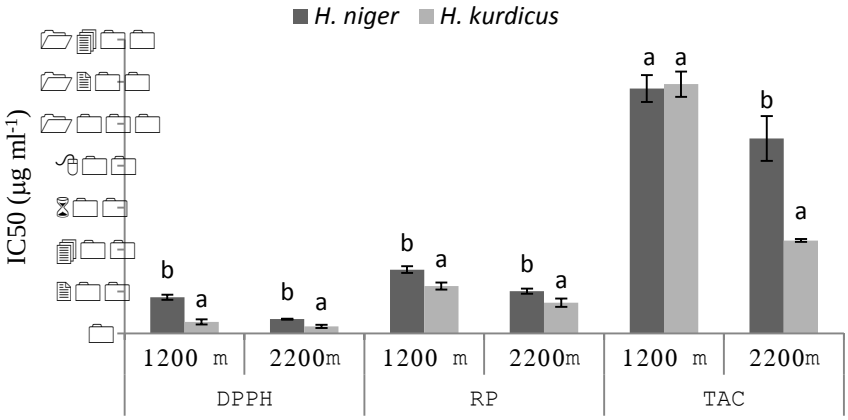
علامت‌های **، * و ns به‌ترتیب به مفهوم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱، ۵ درصد و عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشند

در شکل (۱) مقایسه عملکرد آنتی اکسیدانی اندام هوایی بین دو گونه *H. niger* و *H. kurdicus* در رویشگاه‌های مورد مطالعه ارائه شده است. نتایج نشان داد که عملکرد آنتی اکسیدانی در روش DPPH در هر دو رویشگاه در گونه *H. kurdicus* نسبت به *H. niger*، در روش RP در رویشگاه مرتفع (۲۲۰۰ متر) در گونه *H. kurdicus* نسبت به *H. niger* و در روش TAC در هر دو رویشگاه در گونه *H. niger* نسبت به *H. kurdicus* به صورت معنی‌داری در سطح ۵ درصد بیشتر بود.



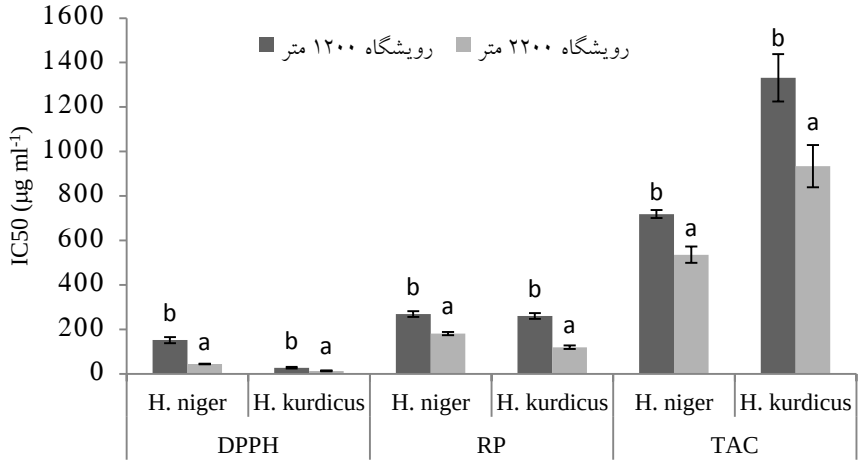
شکل ۱: مقایسه عملکرد آنتی‌اکسیدانی اندام هوایی بین دو گونه *H. niger* و *H. kurdicus* (P<۰/۰۵).

در شکل (۲) مقایسه عملکرد آنتی اکسیدانی ریشه بین دو گونه *H. niger* و *H. kurdicus* در رویشگاه‌های مورد مطالعه ارائه شده است. نتایج نشان داد که عملکرد آنتی‌اکسیدانی در روش DPPH در هر دو رویشگاه در گونه *H. kurdicus* نسبت به *H. niger*، در روش RP در هر دو رویشگاه – همانند روش DPPH– در گونه *H. kurdicus* نسبت به *H. niger* و در روش TAC در رویشگاه مرتفع (۲۲۰۰ متر) در گونه *H. kurdicus* نسبت به *H. niger* به صورت معنی‌داری در سطح ۵ درصد بیشتر بود.



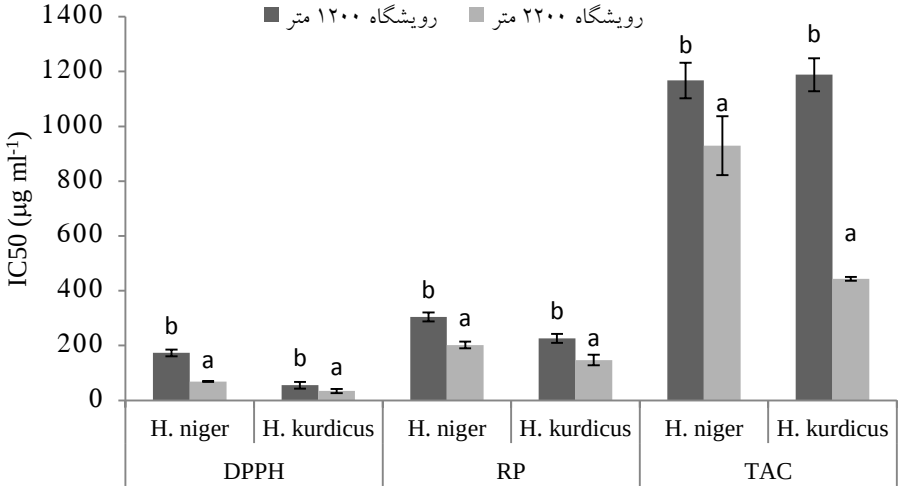
شکل ۲: مقایسه عملکرد آنتی اکسیدانی ریشه بین دو گونه *H. niger* و *H. kurdicus* (P<۰/۰۵)

در شکل (۳) مقایسه عملکرد آنتی اکسیدانی اندام هوایی دو گونه مورد مطالعه بین دو رویشگاه ۱۲۰۰ متر (دشت مغان– قره آغاج) و ۲۲۰۰ متر (روستای فتح مقصود) ارائه شده است. نتایج نشان داد که عملکرد آنتی اکسیدانی در هر سه روش آنتی اکسیدانی (DPPH، RP و TAC) و در هر دو گونه مورد مطالعه، در رویشگاه مرتفع (۲۲۰۰ متر) نسبت به رویشگاه ۱۲۰۰ متر به‌صورت معنی‌داری در سطح ۵ درصد بیشتر بود. به عبارت دیگر با بالا رفتن ارتفاع، میزان عملکرد آنتی‌اکسیدانی به صورت قابل توجهی افزایش یافت.



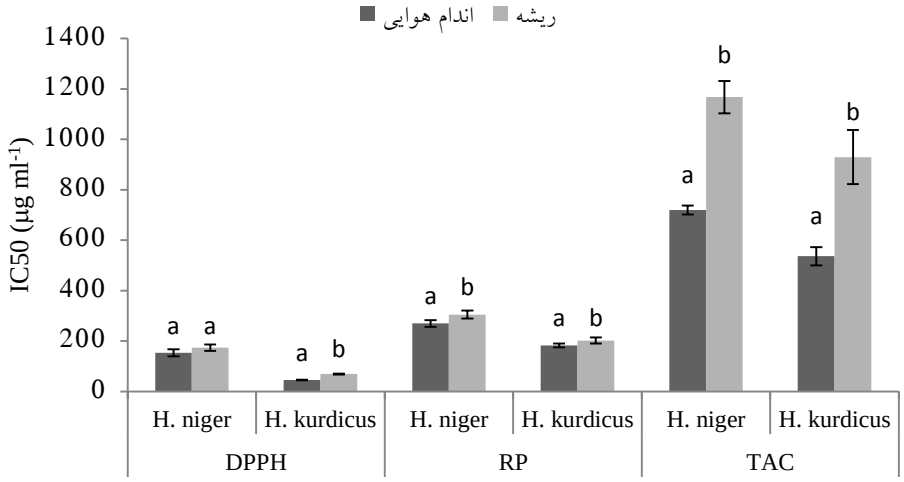
شکل ۳: مقایسه عملکرد آنتی اکسیدانی اندام هوایی بین دو رویشگاه مورد مطالعه (P<0.05).

در شکل (٤) مقایسه عملکرد آنتی اکسیدانی ریشه دو گونه مورد مطالعه بین دو رویشگاه ۱۲۰۰ متر (دشت مغان-قره آغاج) و ۲۲۰۰ متر (روستای فتح مقصود) ارائه شده است. نتایج نشان داد که عملکرد آنتی‌اکسیدانی در هر سه روش آنتی‌اکسیدانی (DPPH، RP و TAC) و در هر دو گونه مورد مطالعه، در رویشگاه مرتفع (۲۲۰۰ متر) نسبت به رویشگاه ۱۲۰۰ متر به‌صورت معنی‌داری در سطح ۵ درصد بیشتر بود. به عبارت دیگر با بالا رفتن ارتفاع، میزان عملکرد آنتی اکسیدانی به‌صورت قابل توجهی افزایش یافت.



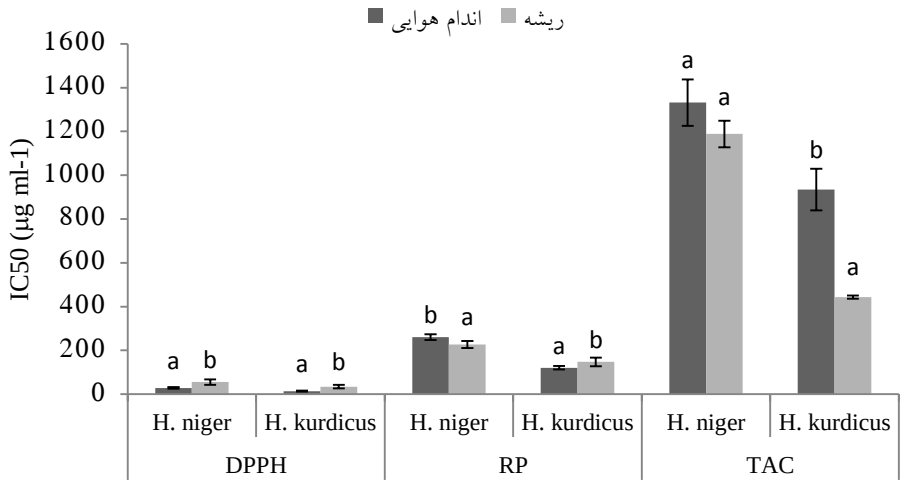
شکل ٤: مقایسه عملکرد آنتی اکسیدانی ریشه بین دو رویشگاه مورد مطالعه (P<۰/۰۵)

در شکل (۵) مقایسه عملکرد آنتی‌اکسیدانی بین اندام هوایی و ریشه گونه *H. niger* در رویشگاه‌های مورد مطالعه ارائه شده است. نتایج نشان داد که عملکرد آنتی‌اکسیدانی در روش DPPH در رویشگاه مرتفع (۲۲۰۰ متر) در اندام هوایی نسبت به ریشه، در روش RP و TAC در هر دو رویشگاه در اندام هوایی نسبت به ریشه به‌صورت معنی‌داری در سطح ۵ درصد بیشتر بود.



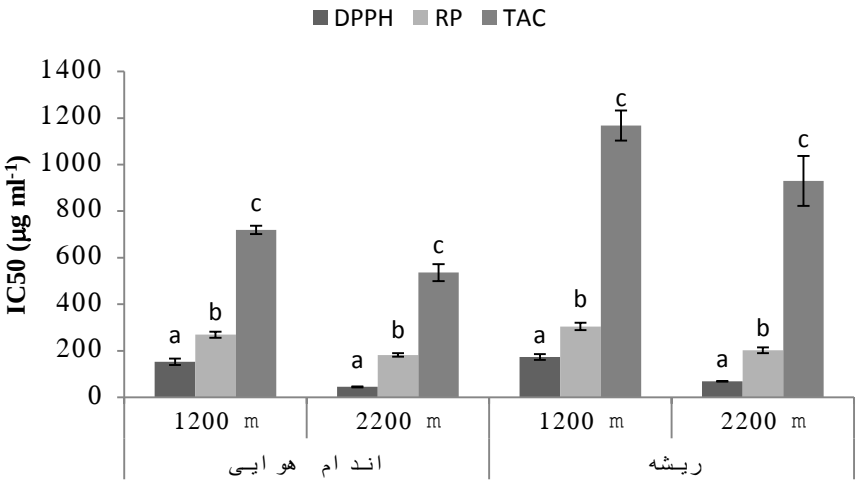
شکل ۵: مقایسه عملکرد آنتی اکسیدانی بین اندام هوایی و ریشه در گیاه *H. niger* (P<۰/۰۵)

در شکل (٦) مقایسه عملکرد آنتی اکسیدانی بین اندام هوایی و ریشه گونه *H. niger* در رویشگاه‌های مورد مطالعه ارائه شده است. نتایج نشان داد که عملکرد آنتی اکسیدانی در روش DPPH در هر دو رویشگاه در اندام هوایی نسبت به ریشه، در روش RP در رویشگاه مرتفع (۲۲۰۰ متر) در اندام هوایی نسبت به ریشه و برخلاف آن در ارتفاع پایین‌تر (۱۲۰۰ متر) در ریشه نسبت به اندام هوایی و در روش TAC در رویشگاه مرتفع (۲۲۰۰ متر) در ریشه نسبت به اندام هوایی به صورت معنی‌داری در سطح ۵ درصد بیشتر بود.

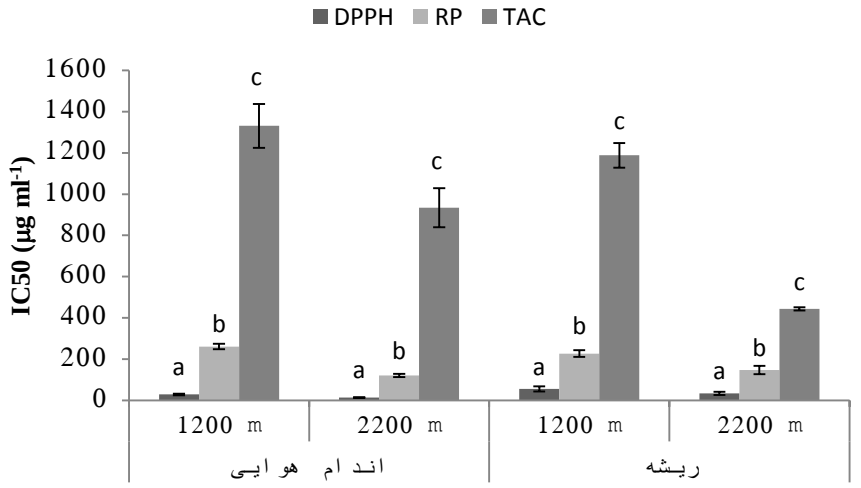


شکل ٦: مقایسه عملکرد آنتی اکسیدانی بین اندام هوایی و ریشه در گیاه *H. kurdicus* (P<۰/۰۵)

مقایسه عملکرد آنتی اکسیدانی از نظر روش‌های به کار برده شده (DPPH، RP و TAC) در گونه *H. niger* (شکل ۷) و گونه *H. kurdicus* (شکل ۸) نشان داد که در هر دو رویشگاه، هم در اندام هوایی و هم در ریشه عملکرد آنتی اکسیدانی در روش DPPH نسبت به دو روش دیگر بیشتر بود (در سطح ۵ درصد). به بیان دیگر در روش DPPH کمترین میزان IC_{50} یا بیشترین عملکرد آنتی اکسیدانی و سپس در روش RP و به دنبال آن در روش TAC کمترین عملکرد آنتی اکسیدانی مشاهده شد.



شکل ۷: مقایسه سه روش آنتی‌اکسیدانی در گونه *H. niger* (P<۰/۰۵)



شکل ۸: مقایسه سه روش آنتی‌اکسیدانی در گونه *H. kurdicus* (P<۰/۰۵)

بحث

نتایج بررسی و مقایسه عملکرد آنتی اکسیدانی بین دو گونه نشان داد که در روش DPPH عملکرد آنتی‌اکسیدانی در گونه *H. kurdicus* نسبت به *H. niger* در هر دو اندام و در هر دو رویشگاه به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود. در روش RP عملکرد آنتی‌اکسیدانی در گونه *H. kurdicus* نسبت به *H. niger* در اندام هوایی در رویشگاه مرتفع و در ریشه در هر دو رویشگاه به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود. در روش TAC عملکرد آنتی‌اکسیدانی در گونه *H. kurdicus* نسبت به *H. niger* در ریشه و در رویشگاه مرتفع (۲۲۰۰ متر) به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود. اما عملکرد آنتی‌اکسیدانی در اندام هوایی در هر دو رویشگاه مورد مطالعه در گیاه *H. niger* نسبت به *H. kurdicus* بیشتر بود (P<۰/۰۵) (شکل‌های ۱ و ۲). نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر که پتانسیل بالای آنتی اکسیدانی عصاره گیاهان مورد مطالعه به ویژه گیاه *H. kurdicus* را نشان داد تایید کننده استفاده سنتی و دارویی از این گیاهان می‌باشد. همچنین با توجه به بیشتر بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی (به‌ویژه در زمینه مهار رادیکال آزاد و قدرت احیایی) گونه *H. kurticus* جهت تحقیقات

بیشتر در آینده در زمینه استفاده‌های دارویی از این گیاه پیشنهاد می‌گردد.

در دو تحقیق مشابه که توسط القزیر و همکاران (Alghazeer et al., 2012) انجام شده نشان دادند که میزان IC_{50} عصاره گیاه *Hyoscyamus albus* در روش DPPH در محدوده ٦٠ و در روش RP در محدوده ٥٠٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده که نشان دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتر این گیاه نسبت به دو گونه مورد مطالعه ما در این تحقیق می‌باشد و در تحقیق دیگر که توسط اسماعیل (Ismeel, 2011) در غلظت ١٠٠٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه *H. niger* (جمع‌آوری شده از عراق) تنها ١/٥١٥ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی بروز داد که میزان عملکرد آنتی‌اکسیدانی آن در مقایسه با نتایج تحقیق حاضر، بسیار کمتر بود. تحلیل یافته های دیگران و نتایج این تحقیق حاکی از آن است که اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره ها علاوه بر کمیت و کیفیت مواد موثره ثانوی مثل فنل، فلاونویید و ترپنوییدها (Sokol-Letowska et al., 2007)، بلکه ژنوتیپ گیاه، منطقه جغرافیایی، زمان و مکان جمع‌آوری، شرایط نگهداری و مراحل قبل از عصاره‌گیری نیز وابسته است (Ismeel, 2011). در تحلیل این قسمت یافته های این بررسی مورد بحث است که نشان داد در عصاره اندام هوایی هر دو گونه با افزایش ارتفاع محل و احتمالاً بروز استرس و سنتز بیشتر متابولیت‌های ثانوی، عملکرد آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته و اینکه در روش‌های مختلف بررسی، میزان مهار رادیکال‌های آزد نیز تغیر یافته است به‌طوری‌که در روش DPPH نسبت به دو روش دیگر میزان مهار افزایش یافته است (شکل‌های ٣ و ٤).

در تحقیقات مشابه که در مورد سایر گونه‌های دارویی مثل گلپرو هواچوبه نشان دادند یک رابطه مستقیم میان افزایش ارتفاع و متعاقب آن اثر استرس‌های اکولوژیکی با میزان مواد موثره و از همه مهمتر ارتقای توان مهار رادیکال‌های آزاد و خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره آن گیاهان دارد (Mazandarani et al., 2011 a, b; Zarghami et al., 2012).

در میان موجودات زنده، گیاهان به دلیل اجتناب ناپذیری‌شان به نور برای فتوسنتز، بیشتر تحت تاثیر UV و سایر استرس‌های اکولوژیکی قرار می‌گیرند و آسیب‌پذیرتر هستند (Nasibi et al., 2004) و از آنجایی که شدت نور، دوره‌های نوری و دما بر سنتز کمی و کیفی بسیاری از متابولیت‌های ثانویه گیاهان تاثیر می‌گذارند. محققین بیان داشتند که در ارتفاعات بالاتر از ١٥٠٠ متر، مقادیر بالاتری از ترکیب‌های آنتی اکسیدانی مثل فنل‌ها، فلاونوییدها و آلکالوییدها وجود دارد (Jaakola and Hohtola, 2010). طی تحقیقی لیوانی (Livani, 2014) بیان داشت که عامل ارتفاع و دما بر مقدار ترکیبات آنتی اکسیدانی گیاه آلو و ازگیل اثر معنی‌دار داشت. به‌طوری‌که در رویشگاه مرتفع با دمای پایین‌تر، مقدار این ترکیب‌ها در گونه‌های ذکر شده افزایش یافت که مشابه با نتایج تحقیق حاضر بود.

محققین نتیجه گرفتند دما، مسیر بیوسنتز ترکیب‌های فنلی را هم در دمای بالا و هم در دمای پایین تنظیم می‌کند. کاهش این ترکیب‌ها تحت دمای بالا می‌تواند هم به علت کاهش و هم ممانعت از رونویسی mRNA باشد (Jaakola and Hohtola, 2010). با توجه به مسائل ذکر شده و نتایج تحقیق حاضر می‌توان این‌طور استنباط کرد که احتمالاً به علت افزایش ارتفاع و کاهش دمای ناشی از آن و قرار گرفتن در معرض اشعه UV، اندام هوایی یا ریشه گیاه مسئول سنتز ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشند که در اثر آن منجر به بالا رفتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ارتفاعات می‌شوند.

همسو با موارد فوق نتایج این بررسی نیز نشان داد که عصاره اندام هوایی گونه *H. niger* با افزایش

میزان ارتفاع (۲۲۰۰ متر) در هر سه روش از عملکرد آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به ریشه برخوردار است (P<۰/۰۵) (شکل ۵). همچنین در مورد گونه *H. kurdicus* نیز فعالیت مهاری رادیکال آزاد DPPH در هر دو رویشگاه، در اندام هوایی از ریشه بیشتر بود. قدرت احیایی (RP) عصاره در رویشگاه ۱۲۰۰ متر در ریشه از اندام هوایی بیشتر و با افزایش ارتفاع به سمت اندام هوایی تمرکز پیدا کرد و یا به عبارت دیگر در ارتفاع بالاتر (۲۲۰۰ متر) در اندام هوایی از ریشه بیشتر بود. و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره (TAC) با افزایش ارتفاع (رویشگاه ۲۲۰۰ متر) به سمت ریشه متمرکز شد یا به عبارت دیگر در ریشه از اندام هوایی بیشتر بود (P<۰/۰۵) (شکل ٦).

حاجی بلند و همکاران (Hajiboland et al., 2009) بیشتر بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام هوایی نسبت به ریشه را به دلیل نقش احتمالی نور در بیوسنتز فنل‌ها بیان نمود، که ممکن است نقشی در سازگار نمودن گیاهان با شدت‌های نوری بالا داشته باشند. به عنوان مثال در گیاه شوید (*Anethum graveolens*) مقدار پلی فنل‌ها در اندام هوایی نسبت به ریشه بیشتر و به دنبال آن فعالیت آنتی اکسیدانی اندام هوایی نسبت به ریشه بیشتر بود (Setayesh Mehr et al., 2012). در تحقیق حاضر مقدار ترکیبات پلی فنلی تعیین نشده است اما نقش ترکیبات فنلی در محافظت از رادیکال‌های آزاد در سلول‌های جانوری اثبات شده و شواهدی برای ایفای نقش مشابه در گیاهان در تحقیقات گذشته ارائه شده است (Hajiboland et al., 2009). به‌عنوان مثال در *Hyoscyamus aureus* L. (Alali et al., 2011) و *Solanum guaraniticum* (Zadra et al., 2012) به‌دلیل بالا بودن ترکیبات پلی فنلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی در مهار رادیکال آزاد DPPH گزارش شد.

نتایج بررسی و مقایسه میزان IC_{50} در هر سه روش آنتی اکسیدانی نشان داد که در اندام هوایی هر دو گونه با افزایش میزان ارتفاع، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روش DPPH بیشتر از RP و بیشتر از TAC می‌باشد (P<۰/۰۵) (شکل‌های ۷ و ۸). یعنی در روش DPPH، غلظت کمتری از عصاره جهت مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد و در روش TAC غلظت بالاتری از عصاره نیاز بود. همسو با نتایج تحقیق حاضر، در تحقیق مومجی (Momeji, 2012) و رضاپور (Rezapour, 2014) به‌ترتیب مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه علف چشمه و گوش بره با سه روش DPPH، RP و TAC نشان داد که عصاره‌های گیاهی پتانسیل بالاتری برای مهار رادیکال آزاد به روش DPPH نسبت به دو روش دیگر داشتند.

نتیجه‌گیری نهایی

در پژوهش حاضر مشخص گردید که عامل گونه، ارتفاع و اندام و گاهی اثرات متقابل این‌ها می‌تواند بر عملکرد آنتی اکسیدانی گیاهان با روش‌های مختلف، تاثیر قابل توجهی داشته باشد. به‌طوری‌که مقایسه عملکرد آنتی‌اکسیدانی بین دو گونه *H. niger* و *H. kurdicus* جمع‌آوری شده از دو ارتفاع مختلف در استان اردبیل نشان داد که گونه *H. kurdicus* می‌تواند منبع بالقوه از ترکیبات آنتی اکسیدانی به ویژه در روش DPPH باشد (IC_{50}<200) که با بالا رفتن ارتفاع رویشگاه به ویژه در اندام هوایی عملکرد آنتی اکسیدانی عصاره آن تحت شرایط آزمایشگاهی نیز افزایش قابل توجهی یافت.

References

1. Alaghemand, A., Ghorbanpour, M. and Moghaddasian, B. 2013. Determination of atropine, hyoscine and rutin content of henbane seeds from Different

Regions in Iran. Advances in Environmental Biology, 7(4): 614-618.
2. Alali, F.Q., Tawaha, K., El-Elimat, T., Syouf, M., El-Fayad, M., Abulaila, K., Nielsen, S.J., Wheaton, W.D., Falkinham, J.O. and Oberlies, N.H. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project', Natural Product Research, 21: 1121-1131.
3. Alghazeer, R., El-Saltani, H., Saleh, N., Al-Najjar, A. and Hebail, F. 2012. Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts Natural Science, 4(5): 324-335.
4. Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chemistry, 102(4): 1233-1240.
5. Bazzaz, B.S., and Haririzadeh, G. 2003. Screening of Iranian plants for antimicrobial activity, Pharmaceutical Biology, 41(8): 573-583.
6. Dulger, B., Hacioğlu, N., Goncu B.S. and Gucin, F. 2010. Antifungal activity of seeds of *Hyoscyamus niger* L. (Henbane) against some clinically relevant fungal pathogens. Asian Journal of Chemistry, 22(8): 6321-6324.
7. Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.M., Nabavi, S.F., Eslami, B. and Ehsanifar, S. 2009. Antioxidant activity of *Hyoscyamus squarrosus* fruits. Pharmacology online, 2: 644-650. (In Persian).
8. Ganj Karimi, M. 1996. Comparison of morphological and anatomical of Species of *Hyoscyamus* genus from Iran, M.Sc. Thesis in Plant Science, Faculty of Sciences, Tehran University. (In Persian).
9. Ghafarzadegan, R., Khadiv-parsi, P., Khalighi-Sigaroodi, F., Pirali Hamedani, M., Kadkhoda, Z. and Rezazadeh, Sh. 2009 Optimization of extraction method of Hyoscine from *Hyoscyamus niger* L. Journal of Medicinal Plants, 9(36): 87-95. (In Persian).
10. Hajiboland, R., Pasbani, B. and Amirazad, H. 2009. Effect of low Zn supply on growth, leaf pigments and photosynthesis in red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata f. rubra*) plants grown under different light conditions. Iranian Journal of Plant Biology, 1(1-2): 25-36. (In Persian).
11. Ismeel, A.O. 2011. Cytogenetic and cytotoxic studies on the effect of phytoinvestigated active compounds of *Hyoscyamus niger* (*in vivo* and *ex vivo*), Ph.D. Thesis in Philosophy of Sciencein Biotechnology, University of Al-Nahrain, Iraq.
12. Jaakola, L. and Hohtola, A. 2010. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. Plant Cell and Environment, 33(8): 1239-1247.
13. Khatamsaz, M. 1998. Flora of Iran (Solanaceae), No. 24, Research Institute of. Forests and Rangelands, 504p. (In Persian).
14. Livani, F. 2014. Total phenol and anthocyanin variation in different parts of *Prunus spinosa* L. and *Mespilus germanica* L. in Golestan province. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 1(4): 68-88. (In Persian).
15. Mazandarani, M., Makari S. and Bajian, G.R. 2011b. Evaluation of phytochemical and antioxidant activity in different parts of *Heracleum gorganicum* Rech. F. in Golestan province, North of Iran. Iranian Journal of plant physiology, 2(2): 381-388.
16. Mazandarani, M., Zarghami Moghaddam, P., Baiat, H., Zolfaghari, M., Ghaemi, E. and Hemati, H. 2011a. Antioxidant activity, phenol, flavonoid and anthocyanin contents in various extracts of *Onosma dichroanthum* Boiss. In north of Iran, Iranian Journal of Plant Physiology, 1(3): 169-176.
17. Mirzadeh, S., Sanjarian, F. and Salimi, A. 2011. Comparison of production potential of scopolamine and hyoscyamine in capillary roots and whole plant of *Hyoscyamus kordicus*. 3rd National Conference on Agricultural Biotechnology of Iran, 13-15 September, Ferdowsi University, Mashhad. (In Persian).
18. Mohammadi, M., Kazemi tabar, K., Asili, J. and Kamali, H. 2014. Study of the antioxidant and antibacterial activity

in methanolic, dichloromethane and hexane extracts of aerial parts of *Cyperus longos*. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences, 6(1): 161-167. (In Persian).

19. Momeji, A. 2012. Investigation of ecological and phonological factors, and comparison of main secondary metabolites of watercress (*Nasturtium officinale* (L.) R.Br.) Extracts in two different habitats of Mazandaran province, M.Sc. Thesis in Islamic Azad University, Gorgan branch, Gorgan, Iran. (In Persian).
20. Nasibi, F., Kalantari, Kh. and Rashidi, M. 2004. Investigation of change in morphological and physiological parameter induced by UV-A, UV-B and UV-C of ultraviolet radiation in colza seedling (*Brassica napus*). Pajouhesh & Sazandegi, 60: 97-103. (In Persian).
21. Rezapour, F. 2014. Autecology, phenology and phytochemical of essential oil and extract from Lamb's ear (*Stachys byzantina* C. Koch.) inflorescences in one area from Golestan province, Iran, M.Sc. Thesis in Islamic Azad University, Gorgan branch, Gorgan, Iran. (In Persian).
22. Saliani, S. 2004. Study of primary phytochemical of *Hyoscyamus* plant and identify some of its alkaloids, Ph.D. Thesis in University of Medical Sciences and Healthcare Services, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Kerman. (In Persian).
23. Setayesh Mehr, Z., khajeh, H., Esmaeilzadeh Bahabadi, S. and Sabbagh, S.K. 2012. Changes on proline, phenolic compounds and activity of antioxidant enzymes in *Anethum graveolens* L. under salt stress International journal of Agronomy and Plant Production, 3: 710-715.
24. Sokol-letowska, A., Oszmianski, J. and Wojdylo, A. 2007. Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. Food Chemistry, 103: 853–859.
25. Zadra, M., Piana, M., de Brum, T.F., Boligon, A.A., de Freitas, R.B., Machado, M.M., Stefanello, S.T., Antunes Soares, F.A. and Athayde, M.L. 2012. Antioxidant activity and phytochemical composition of the leaves of *Solanum guaraniticum* A.St.-Hil. Molecules, 17: 12560-12574.
26. Zarghami Moghaddam, P., Mazandarani, M. and Zolfaghari, M.R. 2012. Antibacterial and antioxidant activities of root extract of *Onosma dichroanthum* Boiss. In North of Iran. Afri. J. Microbiology Research; 6(8): 1776-1781.
27. Zolfeghari, E., Adeli, I., Mozafarian, V., Babaiy, S. and Habibi Bibalan, Gh. 2012. Identification of Arasbaran medicinal plants and ethnobotanical study of rural people knowledge (Case Study: Arasbaran forest, Mardanaghom watershed). Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants, 28(3): 534-550. (In Persian).