

## بررسی اثر آنتی اکسیدان اسانس میوه و سرشاخه *Juniperus excelsa* subsp. *excelsa* بر روی سیستم‌های اکسیداتیو

صدیقه عسگری<sup>۱</sup>، احمد امامی<sup>۲</sup>، محمد رضا شمس اردکانی<sup>۳</sup>، غلامعلی نادری<sup>۱</sup>، ساناز اصلانی<sup>۴</sup>، تقی کشر<sup>۴</sup> و آتوسا آیرین<sup>۴</sup>

۱- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات قلب و عروق، پست الکترونیک: s\_asgari@crc.mui.ac.ir

۲- استادیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده داروسازی

۳- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی

۴- دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی

### چکیده

امروزه عدم تعادل سیستم آنتی اکسیدان و اکسیدان به عنوان عامل ایجاد بسیاری از بیماریها از جمله آترواسکلروز، سرطانها و پیری شناخته شده است. در این مطالعه اثرات آنتی اکسیدان سه غلظت متفاوت از هر یک از اسانس‌های بدست آمده از میوه و سرشاخه *Juniperus excelsa* subsp. *excelsa* بر روی چند سیستم اکسیداتیو (همولیز گلبولهای قرمز، اکسیداسیون LDL، گلیکوزیلاسیون انسولین و هموگلوبین و نیز پراکسیداسیون لینولئیک اسید) مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان می‌دهد که: (۱) اسانس‌های مورد بررسی به خوبی گلیکوزیلاسیون انسولین و هموگلوبین را مهار نموده است. (۲) اکسیداسیون LDL در حضور غلظتهای مختلف اسانس سرشاخه گیاه به خوبی مهار شده است، در صورتیکه اسانس میوه در غلظتهای مورد مطالعه تأثیری بر اکسیداسیون LDL نداشته است. (۳) اکسیداسیون لینولئیک اسید در حضور اسانس‌های بدست آمده از میوه و سرشاخه به خوبی مهار گردیده و میزان مهار با افزایش زمان انکوباسیون رابطه مستقیم نشان داد. (۴) اسانس‌های مورد مطالعه، در غلظت کم، همولیز گلبولهای قرمز را مهار و در غلظتهای بیشتر تسریع نموده و در مورد این سیستم بیشتر خاصیت پراکسیدان داشته‌اند. به طور خلاصه نتایج نشان می‌دهد که اسانس‌های بدست آمده از میوه و سرشاخه گیاه در غلظتهای اندک به خوبی توانسته است بر چند سیستم اکسیداتیو مؤثر و خاصیت آنتی اکسیدان بروز دهد، هرچند موجب همولیز برون تن (*in vitro*) گلبولهای قرمز شده است. بنابراین مطالعه بر روی تأثیر این گیاه بر برخی از بیماریها از جمله آترواسکلروز و دیابت می‌تواند حائز اهمیت باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی اکسیدان، *Juniperus*، همولیز گلبول قرمز، اکسیداسیون LDL، انسولین، هموگلوبین.

### مقدمه

چنین رادیکال‌های آزاد در مکانیسم عمل برخی از آنزیم‌های هم دار سیتوکروم شرکت می‌کنند.

در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدها، اسیدهای چرب غیر اشباع تغییر شکل می‌دهند و سیالیت و پتانسیل غشای لیپیدی کاهش یافته و منجر به تغییر نفوذپذیری غشاهای سلولی می‌شود. همچنین پراکسیداسیون لیپیدها بر آنزیم‌های غشایی تأثیر

خسارت‌های ناشی از واکنش‌های اکسیداتیو به DNA، پروتئین و سایر مولکول‌ها می‌تواند باعث پیشرفت و تشدید بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان، پیری، کاتاراکت، خونریزی کبدی و ایدز گردد (Cross & Jones, 1991; Leuke & Rankin, 1990). هم

شناسایی در هر بار یوم باغ ملی گیاه شناسی ایران (واقع در تهران) نگهداری گردیدند. جهت جلوگیری از بروز تغییرات نامطلوب نمونه‌های جمع‌آوری شده تا هنگام اجرای آزمایش‌ها در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - قرار داده شدند (Adams et al., 1984).

### استخراج اسانس

اسانس موجود در برگ و میوه گیاه به طور جداگانه و با استفاده از روش تقطیر با بخار آب و طی مدت ۴ ساعت استخراج گردید. جهت استخراج اسانس از ۵۰۰ گرم برگ و ۵۰۰ گرم میوه گیاه استفاده شد. در مرحله بعد روغن‌های استخراج شده توسط سدیم سولفات ایندر، آبگیری شد و میزان اسانس موجود در هر نمونه محاسبه گردید.

### تجزیه اسانس با استفاده از روش گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS)

جهت این امر از دستگاه GC/MS مدل Hewlett Packard 6890 و اجاد ستون HP-5 با مشخصات (30m X 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness, Agilent HP, USA) متصل به طیف سنج جرمی مدل Hewlett-Pakard 8890 مجهز به کتابخانه طیف‌های جرمی Wiley-275 استفاده گردید. دمای ستون بین ۶۰ تا ۲۷۵ درجه سانتی‌گراد متغیر بوده که در هر دقیقه هم ۱۴ درجه سانتی‌گراد به دمای آن افزوده می‌شد. دمای انژکتور ۲۵۵ درجه سانتی‌گراد، حجم تزریق ۰/۱ میکرولیتر، نسبت split ۱ به ۵۰، گاز حامل هلیوم دارای سرعت ۲ میلی‌لیتر در دقیقه بوده، پتانسیل یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، دمای منبع یون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و حیطه جرم ۳۰۰-۳۰ بود (Adams, 1995).

گذاشته و در روند انتقال یونها و رهاسازی مواد داخل سلولی تغییر بوجود می‌آورد و متابولیت‌های سیتوتوکسیک بدست آمده از پراکسیداسیون لیپیدی موجب اکسیداسیون LDL می‌گردد که این امر در پاتوژنز آترواسکلروز نقش مهمی دارد. روغن‌های فراری که خاصیت آنتی‌اکسیدان داشته باشند به دلیل لیپوفیل بودن نقش ویژه‌ای در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها داشته که می‌توانند در درمان و پیشگیری از آترواسکلروز مؤثر باشند. تاکنون تأثیر آنتی‌اکسیدان بسیاری از اسانس‌ها مشخص شده است (Agric & Bucar, 2000; Burtis & Asres, 2001; Burtis & Bucar, 2000).

*Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* درختی تک پایه می‌باشد که در کشورهای ناحیه بالکان، ترکیه، سوریه، لبنان، گرجستان، ارمنستان، آذربایجان، ترکمنستان، ایران و کناره‌های واقع در نواحی شمال شرقی دریای سیاه از قفقاز تا کریمه به صورت خودرو یافت می‌گردد (Farjon, 1992). این گیاه در زبان فارسی به نام اردوج خوانده می‌شود (ثابتی، ۱۳۵۵؛ اسدی، ۱۳۷۶؛ Parsa, 1949).

درخت مذکور گیاهی دارویی است و جهت درمان دیسمنوره (Hooper & Field, 1937)، سرفه (Yesilada et al., 1995)، برونشیت و سرماخوردگی (Fujita et al., 1995) یرقان و سل (Muhammad et al., 1992) و نیز به عنوان قاعده‌آور (Jochile, 1979) مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مورد گیاه مذکور برخی بررسیها منتشر گردیده است (Adams, 1990; Topcu et al., 2005). در این مطالعه اثرات اسانس گیاه *Juniperus excelsa* بر روی سیستم‌های اکسیداتیو مورد بررسی قرار گرفته است.

### مواد و روشها

نمونه‌های گیاهی در تاریخ ۲۶ آبان ۱۳۷۹ از جزیره اسلامی (استان آذربایجان شرقی) جمع‌آوری شده پس از

## آزمایش‌های برون تن (in vitro) بر روی لینولئیک اسید

### تهیه امولسیون لینولئیک اسید

جهت انجام آزمایش بر روی لینولئیک اسید ابتدا امولسیون ۰/۰۱ مولار از آن تهیه شد. برای این کار مقدار ۱۵۵ میکرولیتر لینولئیک اسید همراه با ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۲٪ توپین ۲۰، با آب دیونیزه به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و ۱۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک ۴۰ kHz قرار داده شد. امولسیون تهیه شده تا ۴۵ روز پایدار است (Farag et al., 1989).

### خنثی سازی امولسیون لینولئیک اسید

امولسیون تهیه شده به وسیله محلول ۱ نرمال KOH به pH=۷ رسانده شد و توسط بافر پتاسیم فسفات دارای pH=۷ به حجم ۷۵ میلی‌لیتر رسید (Valenzual et al., 1986).

### تعیین میزان مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید توسط اسانس‌ها

آزمایش‌های مربوط به تأثیر اسانس میوه و سرشاخه گیاه بر اکسیداسیون لینولئیک اسید در مورد هر یک از اندامها در سه غلظت انجام شده است. بدین منظور در ابتدا استوک ۲۰۰۰ ppm هر یک از اسانس‌ها ساخته شد و سپس مقادیر ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میکرولیتر از آن در لوله‌های آزمایش ریخته شد. همچنین در هر مورد آزمایش‌ها مقابل گروه کنترل که فاقد اسانس بود انجام پذیرفت.

ابتدا در تمام لوله‌ها ۱/۵ میلی‌لیتر از امولسیون لینولئیک اسید خنثی شده و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات با pH=۷ ریخته شد. لوله‌های آزمایش شامل مقادیر مشخصی از اسانس مورد نظر بود. به تمام لوله‌ها مقداری از محلول FeSO<sub>4</sub> افزوده شد تا

حدی که غلظت نهایی Fe<sup>2+</sup> در هر لوله به ۵۰۰ میکرومولار رسید. FeSO<sub>4</sub> سبب پراکسیداسیون لینولئیک اسید می‌شود.

لوله‌های آزمایش به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ ° C انکوبه گردیدند. میزان پراکسیداسیون لینولئیک اسید از طریق اندازه‌گیری میزان تشکیل دی ان کونژوگه در طول موج ۲۳۳ نانومتر تعیین گردید (Valenzual et al., 1986). برای این کار ۰/۵ میلی‌لیتر از محتویات هر لوله با ۱ میلی‌لیتر اتانل ۶۰° رقیق شده و جذب آن در طول موج ۲۳۳ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. این کار هر ۱ ساعت یکبار انجام شد.

### تعیین اثر بر میزان گلیکوزیلاسیون انسولین و هموگلوبین

خون از افراد داوطلب سالم تهیه و از EDTA به عنوان ماده ضد انعقاد استفاده گردید. گلبول‌های قرمز سه بار با محلول NaCl (۰/۱۴ M) شسته شد و سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون گلبول‌های قرمز لیز شده با ۲ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۰/۰۱۸ مولار دارای pH=۷/۴ و نیز ۰/۵ میلی‌لیتر CCl<sub>4</sub> مخلوط گردیده و قسمت لیز شده با استفاده از سانتریفیوژ جدا گشت و لایه فوقانی جدا و غلظت هموگلوبین با روش Drabkin تعیین گردید (Burtis & Ashwood, 1994; Vankampen & Zijlstra, 1965).

انسولین گاوی نرمال (۱۰۰ Iu/ml) از کارخانه Lilly خریداری گردید. سپس با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH=۷/۴ به صورت محلول آماده شد. درصد گلیکوزیلاسیون هموگلوبین و انسولین در حضور غلظت‌های مختلف از هر اسانس بررسی شد. کلیه آزمایش‌ها به صورت سه تایی در برابر گروه شاهد

روش لوری تعیین مقدار گردید. سپس جذب نوری بدست آمده از پراکسیداسیون لیپیدی (conjugated dienes) در زمان‌های مختلف و در طول ۲۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-3100 در حضور  $Cu^{2+}$  در طول موج ۲۳۴nm بدست آمد (Regnstrom *et al.*, 1992).

تأثیر غلظت‌های مختلف از هر اسانس و نیز ویتامین C بر میزان تغییرات این جذب در حضور  $Cu^{2+}$  در همان طول موج مورد ارزیابی قرار گرفت.

### نتایج

سرشاخه‌های گیاه حاوی ۱/۳۲ درصد (حجمی/وزنی) و میوه آن واجد ۱/۱۶ درصد (حجمی/وزنی) اسانس بود. در اسانس بدست آمده از سرشاخه‌های گیاه ۵۷ و در میوه آن ۲۸ ترکیب شناسایی گردید.

همان گونه که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است مهمترین ترکیب موجود در اسانس‌های بدست آمده از سرشاخه‌ها و میوه گیاه آلفا-پی‌ن بود که مقدار آن در اسانس‌های بدست آمده از سرشاخه‌ها و میوه به ترتیب ۳۲/۳ و ۴۷/۶ درصد بود. مونوترپن‌های هیدروکربنی موجود در اسانس بدست آمده از سرشاخه‌ها و میوه گیاه به ترتیب ۴۷/۸ و ۶۱ درصد و میزان مونوترپن‌های اکسیژنه موجود در آنها به ترتیب ۳/۸ و ۱/۴ درصد بود. میزان سزکویی‌ترین‌های هیدروکربن در اسانس‌های بدست آمده از سرشاخه و میوه گیاه به ترتیب ۲۲/۲ و ۱۰/۵ درصد بود، حال آنکه مقدار سزکویی‌ترین‌های اکسیژنه در اندامهای مذکور به ترتیب ۱۴/۸ و ۱۳/۶ درصد بودند. اسانس بدست آمده از سرشاخه‌ها واجد ۲/۴ درصد ترکیبهای متفرقه بود، حال آنکه اسانس بدست آمده از

که فاقد هرگونه اسانس بود انجام شد (Buriis & Ashwood, 1994; Asgary *et al.*, 2002)

### آزمایش‌های برون تن بر گلبول‌های قرمز (الف) تهیه سوسپانسیون گلبولی

خون افراد داوطلب سالم در لوله هیپارینه جمع‌آوری و بعد گلبول‌های قرمز موجود در آنها توسط سانتریفیوژ از پلاسما جدا گشته و سه بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد، در طی آخرین مرحله شستشو، سلولها با دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سلولهای متراکم به دست آمد. از هر اسانس امولسیون ۲۰۰۰ ppm در توئین ۲/۰٪ و آب دیونیزه با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (۴۰ kHz) تهیه شد.

### (ب) همولیز گلبول‌های قرمز

در ابتدا حجم‌های ۵۰، ۴۰ و ۶۰ میکرولیتر از هر اسانس در غلظت ۲۰۰۰ ppm در لوله‌های آزمایش ریخته شد و سپس به هر لوله ۰/۹ میلی‌لیتر بافر فسفات سالیین و ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون گلبول اضافه شد. پس از مخلوط کردن با یک میلی‌لیتر AAPH (۲۵ میلی‌مولار) لوله‌ها ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (۳۰۰۰ Rpm) گردید و جذب محلول فوقانی در ۵۴۰ نانومتر که بیانگر میزان همولیز است با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر شیمادزو قرائت گردید (Koga *et al.*, 1998).

### تعیین مهار اکسیداسیون LDL

LDL موجود در سرم افراد سالم با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ جدا گردید و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در بافر فسفات سالیین (pH=۷/۴) و ۱/۰ مولار) دیالیز گردید و پس از دیالیز میزان پروتئین آن با

ولی اسانس میوه این گیاه تأثیری بر اکسیداسیون LDL نداشته است. - تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس بدست آمده از میوه و سرشاخه گیاه بر روی اکسیداسیون لینولئیک اسید در ساعت‌های مختلف در شکل ۶ آمده است. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد اسانس بدست آمده از سرشاخه این گیاه در حجم ۵۰ میکرولیتر بیشترین تأثیر را بر اکسیداسیون لینولئیک اسید داشته است. می‌توان گفت میزان مهار با مدت زمان انکوباسیون رابطه مستقیم داشته است. اسانس بدست آمده از میوه گیاه نیز در حجم ۵۰ میکرولیتر بیشترین تأثیر را داشته است و با افزایش زمان انکوباسیون درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک افزایش یافته است.

### بحث

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داده است که اسانس بدست آمده از میوه و سرشاخه گیاه دارای اثرات آنتی‌اکسیدان قابل ملاحظه‌ای بر اکسیداسیون LDL و اکسیداسیون لینولئیک اسید و گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های انسولین و هموگلوبین داشته، در حالی که به صورت برون‌تن موجب تسریع همولیز گلبول‌های قرمز شده و در این سیستم خاصیت پراکسیدان داشته است.

در مطالعه‌ای که بر روی *Juniperus procera* انجام شده است خواص آنتی‌اکسیدان آن به اثبات رسیده است (Burtis et al., 2001). مطالعه بررسی اثر آنتی‌اکسیدان *Juniperus chinensis* با روش اندازه‌گیری ایجاد پراکسیداسیون توسط ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH) نیز نشان داده است که این گیاه دارای خواص آنتی‌اکسیدان بسیار قوی است (Lim et al., 2002). در صورتی که *Juniperus osteosperma* در همین سیستم

میوه گیاه عاری از مواد مذکور بود. به طور کلی ۹۰ درصد ترکیب‌های موجود در اسانس سرشاخه و ۸۶/۵ درصد ترکیب‌های موجود در اسانس میوه مورد شناسایی قرار گرفتند.

- همان طور که در شکل ۱ دیده می‌شود اسانس‌های بدست آمده از قسمت‌های مختلف میوه و سرشاخه گیاه اردوج به خوبی توانسته است گلیکوزیلاسیون هموگلوبین را حتی تا مقادیر بیش از ۶۰٪ مهار نماید.

- گلیکوزیلاسیون انسولین نیز توسط غلظت‌های مختلف اسانس میوه و سرشاخه اردوج تقریباً ۵۰٪ کاهش یافته است (شکل ۲).

- شکل ۳ اثر غلظت‌های مختلف اسانس‌های بدست آمده از میوه و سرشاخه گیاه اردوج را بر همولیز گلبول‌های قرمز نشان می‌دهد. مقادیر ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میکرولیتر از استوک ۲۰۰۰ ppm مورد مطالعه قرار گرفته است. اسانس میوه اردوج در حجم ۵۰ میکرولیتر به میزان ۵۱/۸۳٪ همولیز گلبول‌های قرمز را مهار نموده است در صورتی که اسانس میوه در دو غلظت دیگر و اسانس سرشاخه در تمامی غلظت‌ها همولیز گلبول‌های قرمز را تسریع کرده است و اثر پراکسیدان بسیار قوی داشته است.

- شکل‌های ۴ و ۵ اثرات حجم‌های مختلف (۴۰، ۵۰ و ۶۰ میکرولیتر) از استوک ۲۰۰۰ ppm اسانس بدست آمده از سرشاخه و میوه گیاه اردوج را بر اکسیداسیون LDL در مقابل ویتامین C نشان داده است. اسانس بدست آمده از سرشاخه در تمامی غلظت‌های مورد مطالعه خاصیت آنتی‌اکسیدان داشته است و میزان آن بیش از ویتامین C بوده است،

اسانس همین گیاه که در یونان رویش داشته است سدروول (۲۸/۱ درصد) و آلفا-پینن (۲۲/۵ درصد) و لیمونن (۲۲/۷ درصد) بوده است (Ruberto & Baratta, 2000). محققین هندی در برگ گیاه ۶۳ ترکیب یافتند که مهمترین آنها سابینن (۳۶/۱ درصد) و سدروول (۲۶/۸ درصد) بوده است. بر اساس بررسی های محققان ترک، مهمترین ترکیبات موجود در اسانس بدست آمده از میوه گیاه مذکور آلفا-پینن (۳۴/۰ درصد) و سدروول (۱۲/۳ درصد) بوده است. در اسانس برگ گیاه نیز همین امر صادق بوده و مهمترین اجزاء آن شامل آلفا پینن (۲۹/۷ درصد) و سدروول (۲۵/۳ درصد) بوده اند (Topcu et al., 2005).

با توجه به مطالعات محققان ایتالیایی در مورد اثر آنتی اکسیدان برخی از مونوترپن ها، سزکویی ترپن ها و دیگر ترکیبات تشکیل دهنده اسانس ها به نظر می رسد که عمده ترکیب موجود در اسانس های مورد بررسی در مقاله حاضر یعنی آلفا-پینن جزء آنتی اکسیدان های ضعیف به شمار می آید و میزان آنتی اکسیدان های قوی یعنی ترکیباتی از قبیل آلفا-ترپینن، گاما-ترپینن و ترپینثول در اسانس های مورد بررسی چندان زیاد نمی باشد. این در حالی است که میزان دیگر آنتی اکسیدان های ضعیف یعنی ترکیباتی از قبیل فنشول، کامفر، بورنتول و کاریوفیلین نیز در اسانس های مورد بررسی پایین است (جدول ۱).

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می دهد اسانس گیاه مورد نظر در بیشتر سیستم ها توانسته است خاصیت آنتی اکسیدان داشته باشد و در مورد سیستم گلوبول قرمز بایستی این اثر در غلظت های دیگر نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

دارای خاصیت آنتی اکسیدان نبوده است (Acuna et al., 2002). همچنین مطالعه انجام شده بر روی عصاره آبکی و اتانولی بدست آمده از میوه *Juniperus Communis* نشان داده است که غلظت های متفاوت هر دو عصاره به خوبی توانسته است خاصیت آنتی اکسیدانی بر روی سیستم لینولئیک اسید داشته باشد (Mahfuz et al., 2005).

آنچه مشخص است آنتی اکسیدانها در شرایط مختلف و غلظت های مختلف می توانند اثرات متفاوت آنتی اکسیدان و پراکسیدان داشته باشند. مطالعات نشان می دهد ویتامین E می تواند در حضور پراکسیدازها یک پراکسیدان در اکسیداسیون LDL باشد (Parthasarathy et al., 1999). همچنین ویتامین E در بعضی غلظت ها اثر آنتی اکسیدان و در بعضی غلظت های دیگر اثرات پراکسیدان دارد. یعنی در غلظت های بالا نقش آنتی اکسیدان داشته و در غلظت های پایین به عنوان پراکسیدان عمل می کند (Machlin & Bendich, 1987; Mohr et al., 1992). ویتامین C نیز خواص آنتی اکسیدان خود را در غلظت های ۱۰۰-۶۰ میکرومولار بروز می دهد و در کمتر یا بیشتر از این مقادیر خواص پراکسیدان دارد (Stait & Leake, 1994). به نظر می رسد بین میزان خاصیت آنتی اکسیدان اسانس، اجزاء شیمیایی و غلظت آنها رابطه وجود دارد (Farag et al., 1989).

در روغن های فرار بدست آمده از سرشاخه و میوه *J. excelsa subsp excelsa* به ترتیب ۵۷ و ۲۸ ترکیب شناسایی شده است و در هر دو مورد مهمترین جزء آلفا پینن (به ترتیب ۳۲/۳ و ۴۷/۶ درصد در اسانس سرشاخه و میوه) بوده است. در حالی که مهمترین جزء

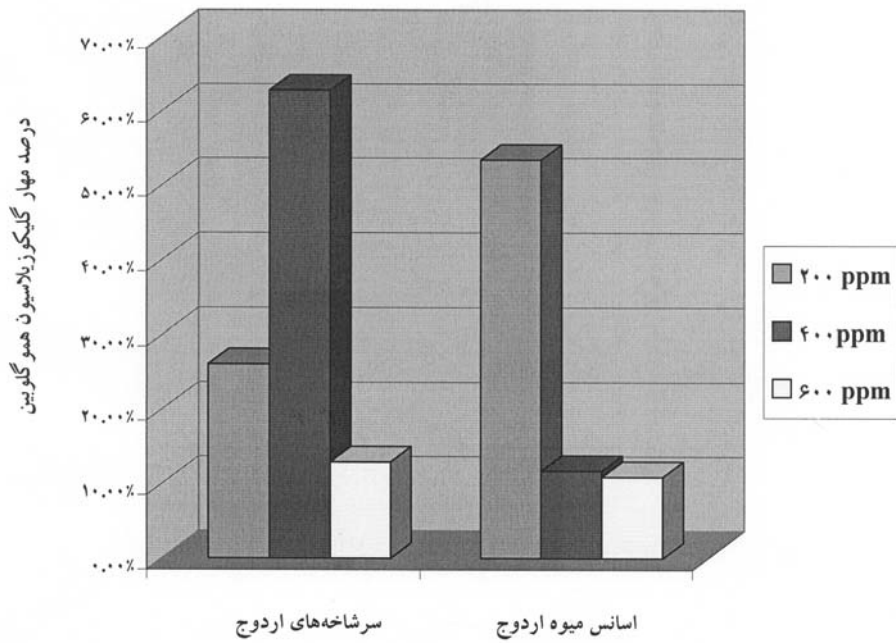
جدول ۱- درصد اجزاء موجود در اسانس بدست آمده از سرشاخه و میوه *Juniperus excelsa subsp excelsa*

ردیف	ترکیب	*RI	اسانس میوه (%)	اسانس برگ (%)
۱	tricyclene	۹۲۷	۰/۲	-
۲	$\alpha$ -pinene	۹۳۹	۳۲/۳	۴۷/۶
۳	camphene	۹۵۳	۰/۹	-
۴	verbenene	۹۶۷	۰/۱	-
۵	sabinene	۹۷۶	۰/۴	-
۶	$\beta$ -pinene	۹۸۰	۲/۲	۲/۷
۷	myrcene	۹۹۱	۳/۰	۵/۱
۸	$\delta$ -3-carene	۱۰۱۱	۱/۷	-
۹	$\alpha$ -terpinene	۱۰۲۰	۰/۱	۰/۱
۱۰	p-cymene	۱۰۲۶	۰/۴	-
۱۱	limonene	۱۰۳۱	۲/۸	۲/۶
۱۲	(Z)- $\beta$ -ocimene	۱۰۴۱	۰/۱	-
۱۳	$\gamma$ -terpinene	۱۰۶۳	۰/۹	۱/۱
۱۴	terpinolene	۱۰۸۸	۱/۷	۱/۸
۱۵	isoamyl-2-methylbutyrate	۱۱۰۵	۰/۱	-
۱۶	fenchol	۱۱۱۴	۰/۱	-
۱۷	3-methyl-3-butenyl isovalerate	۱۱۱۷	۰/۲	-
۱۸	$\alpha$ -campholenal	۱۱۲۵	۰/۳	-
۱۹	trans-pinocarveol	۱۱۳۸	۰/۲	-
۲۰	trans-verbenol	۱۱۴۰	۰/۱	-
۲۱	camphor	۱۱۴۳	۰/۷	۰/۲
۲۲	pinocarvone	۱۱۶۴	۰/۱	-
۲۳	borneol	۱۱۶۷	۰/۱	-
۲۴	isopinocampone	۱۱۷۵	۰/۲	۰/۲
۲۵	terpinen-4-ol	۱۱۷۷	-	۰/۱
۲۶	myrtenol	۱۱۹۴	۰/۱	-
۲۷	verbenone	۱۲۰۴	۱/۰	-
۲۸	hexyl pentanoate	۱۲۴۳	۱/۰	-
۲۹	bornyl acetate	۱۲۸۶	-	۰/۹
۳۰	(2E,4Z)-decadienal	۱۲۹۱	۰/۸	-
۳۱	(2E,4E)-decadienal	۱۳۱۴	۰/۳	-
۳۲	delta-elemene	۱۳۳۹	۰/۸	۰/۵

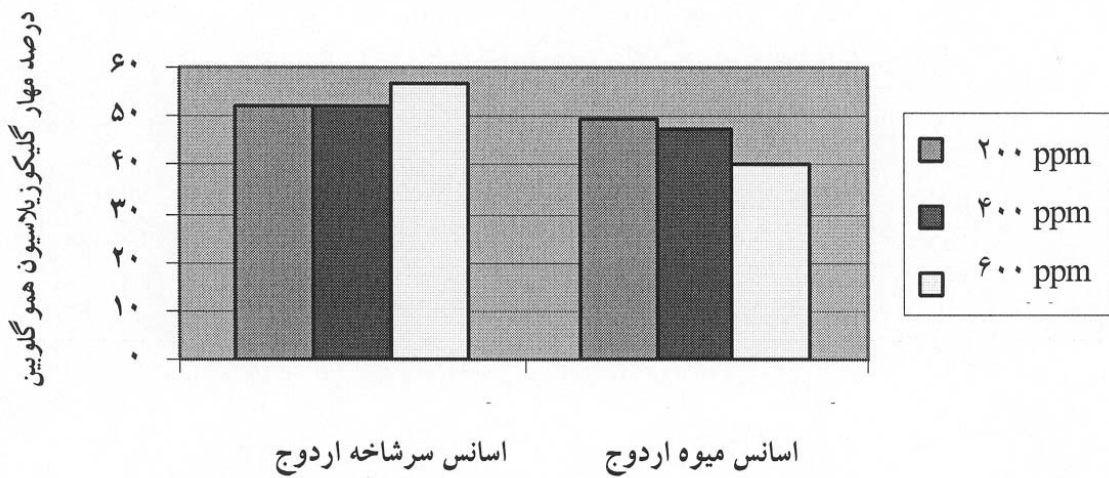
-	۰/۱	۱۳۷۵	$\alpha$ -copaene	۳۳
۰/۴	۳/۷	۱۳۹۱	$\beta$ -elemene	۳۴
۰/۱	۲/۶	۱۴۰۴	isocaryophyllene	۳۵
۱/۵	۱/۴	۱۴۱۵	$\alpha$ -amorphene	۳۶
۱/۰	۰/۲	۱۴۲۱	$\beta$ -caryophyllene	۳۷
-	۱/۰	۱۴۳۲	widdrene	۳۸
۰/۸	۰/۳	۱۴۳۴	$\gamma$ -elemene	۳۹
-	۰/۷	۱۴۵۴	$\alpha$ -humulene	۴۰
۰/۴	۰/۳	۱۴۵۸	(E)- $\beta$ -farnesene	۴۱
-	۰/۴	۱۴۷۷	$\gamma$ -muurolene	۴۲
۰/۹	۰/۴	۱۴۸۰	germacrene D	۴۳
-	۰/۴	۱۴۸۵	$\beta$ -selinene	۴۴
-	۱/۰	۱۴۹۱	$\delta$ -selinene	۴۵
۰/۲	۰/۴	۱۴۹۹	$\alpha$ -muurolene	۴۶
-	۰/۶	۱۵۰۲	cuparene	۴۷
۰/۲	۲/۹	۱۵۱۰	$\beta$ -bisabolene	۴۸
-	۲/۲	۱۵۱۴	$\gamma$ -cadinene	۴۹
۰/۷	۰/۸	۱۵۲۴	$\delta$ -cadinene	۵۰
۰/۶	۰/۶	۱۵۳۳	(E)- $\gamma$ -bisabolene	۵۱
-	۰/۴	۱۵۳۹	$\alpha$ -cadinene	۵۲
-	۰/۵	۱۵۴۳	selina-3, 7(11) diene	۵۳
۰/۵	۰/۳	۱۵۴۹	elemol	۵۴
۳/۲	۰/۴	۱۵۵۶	germacrene b	۵۵
۱۲/۰	۱۳/۱	۱۶۰۱	cedrol	۵۶
۰/۵	۰/۶	۱۶۴۲	T-cadinol	۵۷
-	۰/۲	۱۶۵۱	$\beta$ -eudecmol	۵۸
۰/۶	۰/۶	۱۶۵۳	$\alpha$ -cadinol	۵۹
۶۱/۰	۴۷/۸		Monoterpene hydrocarbons	
۱/۴	۳/۸		Oxygenated monoterpenes	
۱۰/۵	۲۲/۲		Sesquiterpene hydrocarbons	
۱۳/۶	۱۴/۸		Oxygenated sesquiterpenes	
-	۲/۴		Miscellaneous compounds	
۸۶/۵	۹۰/۰		Total identified	

\* شاخص بازداری با استفاده از ستون موئین HP-5 تعیین شده است.

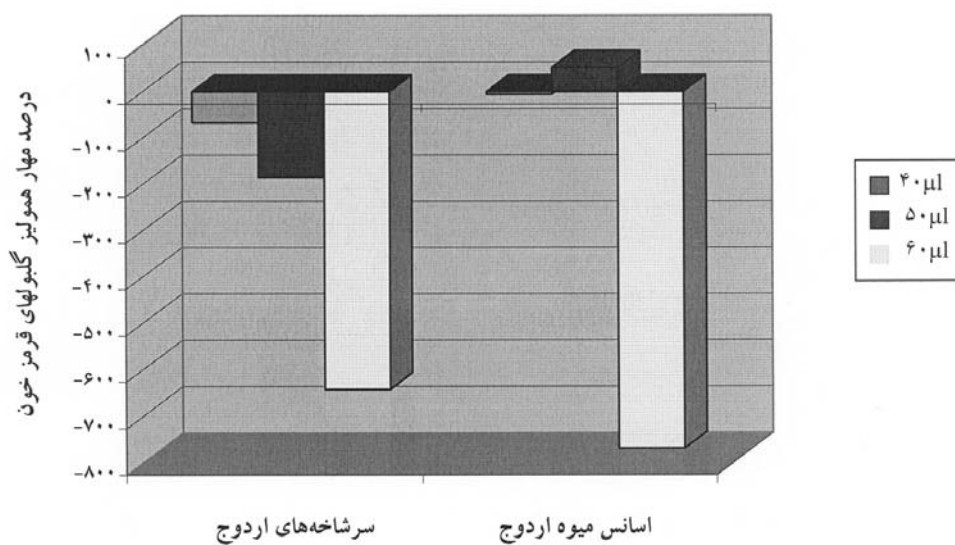




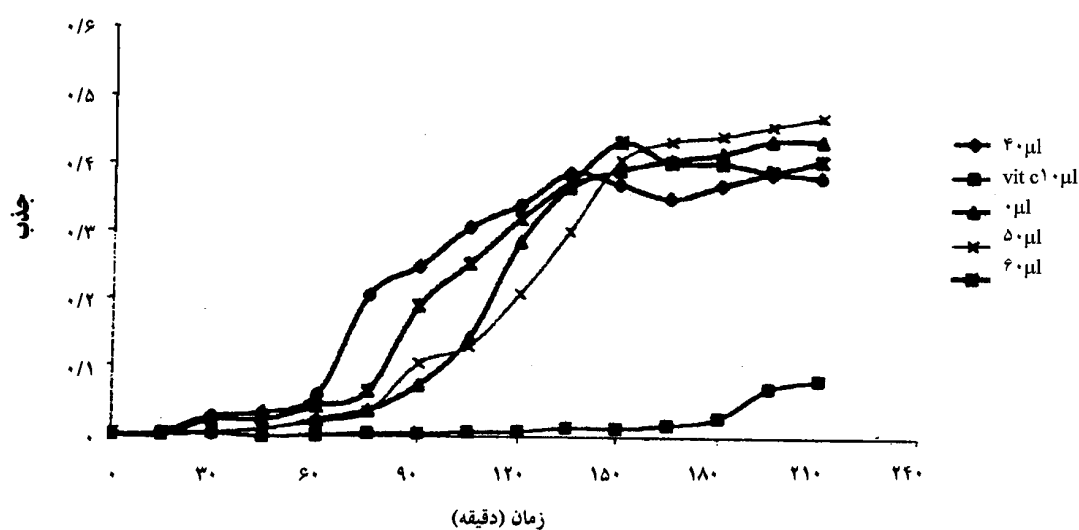
شکل ۱- اثر اسانس میوه و سرشاخه اردوج بر میزان مهار گلیکوزیلاسیون هموگلوبین



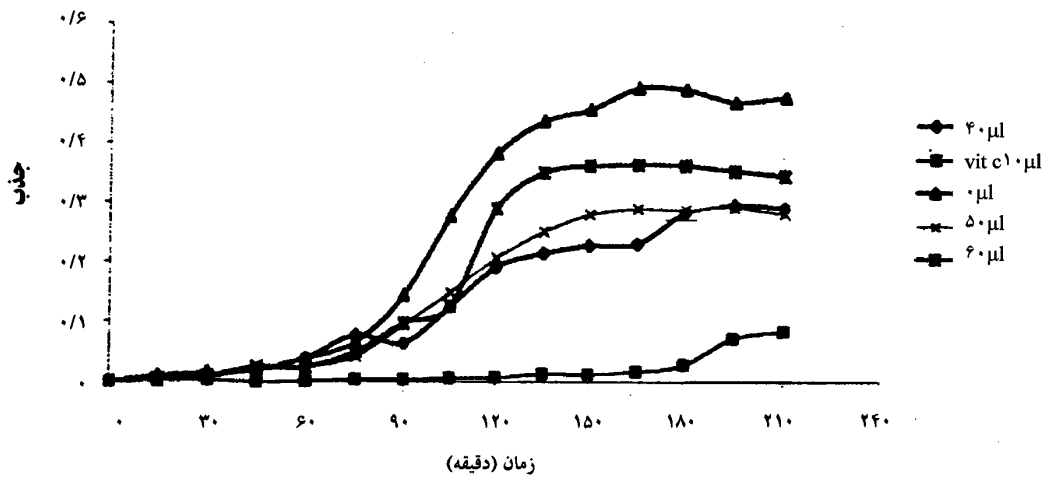
شکل ۲- اثر اسانس میوه و سرشاخه اردوج بر میزان مهار گلیکوزیلاسیون انسولین



شکل ۳- اثر حجمهای مختلف از اسانس میوه و سرشاخه اردوج در غلظت ۲۰۰۰ ppm بر همولیز گلبولهای قرمز خون

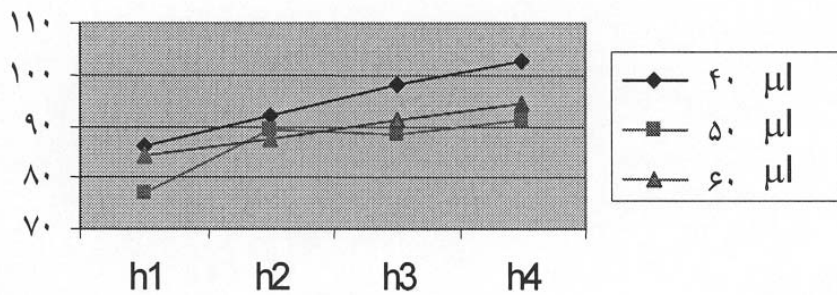


شکل ۴- اثر مقادیر مختلف اسانس سرشاخه اردوج در غلظت ۲۰۰۰ ppm و ویتامین C (غلظت نهایی 100 μl) بر اکسیداسیون LDL



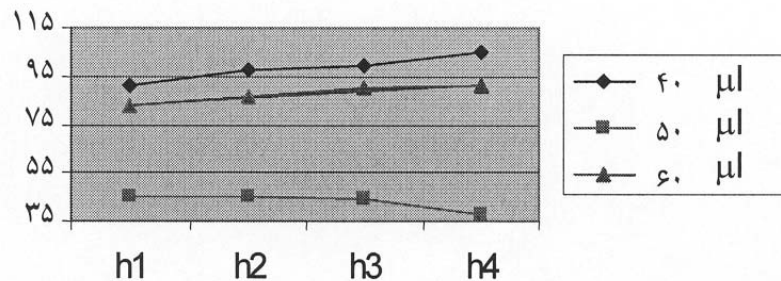
شکل ۵- اثر مقادیر مختلف اسانس میوه اردوج در غلظت ۲۰۰۰ ppm و ویتامین C (غلظت نهایی ۱۰۰ μl) بر اکسیداسیون LDL

درصد مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید



شکل ۶- اثر حجمهای مختلف از غلظت ۲۰۰۰ ppm اسانس میوه و سرشاخه اردوج بر میزان پراکسیداسیون لینولئیک اسید در ساعتهای مختلف

درصد مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید



شکل ۷- اثر حجمهای مختلف از غلظت ۲۰۰۰ ppm اسانس میوه و سرشاخه اردوج بر میزان پراکسیداسیون لینولئیک اسید در ساعتهای مختلف

## منابع مورد استفاده

- gynecology and birth control. *Contraception*, 10: 425-439.
- Koga, T., Moro, K. and Terao, J., 1998. Protective effect of a vitamin E analog, phosphatidylcholine, against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Lipids*, 33: 589-95.
  - Leuke, D.S. and Rankin, S.M., 1990. The oxidative modification. *Biochemistry Journal*, 270: 741-748.
  - Lim, J.P., Song, Y.C., Kim, J.W., Ku, H., Eun, J.S., Leem, K.H. and Kim, D.K., 2002. Free radical scavengers from the heartwood of *Juniperus chinensis*. *Archives Pharmaceutical Research*, 25(4): 44-52.
  - Machlin, L.J. and Bendich, A., 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB Journal*, 1: 441-446.
  - Mahfuz, E., Ilhami, G., Sukru, B., Kufrevioglu, I. and Enein, A., 2005. A study on the *in vitro* antioxidant activity of *Juniper* (*Juniperus Communis L.*) fruit extracts. *Analytical letters*, 39(1): 47-65.
  - Mohr, D., Bowry, V.W. and Stocker, R., 1992. Dietary supplementation with COQ10 results in increased levels of ubiquinol-10 within circulating lipoproteins and increased resistance of human LDL. *Biochemistry and Biophysics Acta*, 1126: 247-254.
  - Muhammad, I., Mossa, J.S. and El-Ferally, F.S., 1992. Antibacterial Diterpenes from the Leaves and Seeds of *Juniperus excelsa*. M. Bieb., *Phytotherapy Research*, 6: 261-264.
  - Parsa, A., 1949. *Flora de l'Iran*, Tome 5 Coniferea, Publication du Ministère de l'Education, Museum d'Histoire Naturelle de Téhéran, 1024 p.
  - Parthasarathy, S., Santhnam, N. and Ramachandran, S., 1999. Oxidant and antioxidant in atherogenesis: An appraisal. *Journal of Lipid Research*, 40:2143-2157.
  - Regnstrom, J., Nilsson, J., Tornvall, P., Landon, C. and Hamsten, A., 1992. Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet*, 339: 1183-1186.
  - Ruberto, G. and Baratta, M.T., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69: 167-174.
  - Stait, S.E. and Leake, D.S., 1994. Ascorbic acid can either increase or decrease LDL- modification. *FEBS Letter*, 341: 263-269.
  - Topcu, G., Goren, A.C., Bilsel, G., Bilsel, M., Cakmak, O., Schilling, G. and Kingston, G.I., 2005. Cytotoxic activity and essential oil composition of leaves and berries of *Juniperus excelsa*. *Pharmaceutical Biology*, 43: 125-128.
  - ثابتي، ح.، ۱۳۵۵. جنگلها، درختان و درختچه‌های ایران. انتشارات وزارت کشاورزی و منابع طبیعی، تهران، ۸۱۰ صفحه.
  - اسدی، م.، ۱۳۷۶. فلورایران، شماره ۲۱، انتشارات مؤسسه جنگلها و مراتع کشور، تهران، ۵۸ صفحه.
  - Acuna, U.M., Atha, D.E., Ma, J., Nee, M.H. and Kennelly, E.J., 2002. Antioxidant capacities of ten edible North American plants. *Phytother Res*, 16(1): 63-5.
  - Adams, R.P., 1990. The Chemical Composition of Leaf Oils of *Juniperus excelsa* M. Bieb., *Journal of Essential Oil Research*, 2: 45-48.
  - Adams, R.P., 1995. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Allured, Carol Stream, USA, 456.
  - Adams, R.P., Zandoni, T.A. and Hogge, L., 1984. Oil of *Juniperus flaccida* var. *flaccida*. *Journal of Natural Products*, 47: 1064-1065.
  - Agric, J. and Bucar, F., 2000. Antioxidant effect of some essential oils. *Food Chemistry*, 4: 156-161.
  - Asgary, S., Naderi, G.A., Sarrafzadegan, N. and Vakili, R., 2002. The inhibitory effects of pure flavonoids on *in vitro* protein glycosylation. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 2(2): 47-55.
  - Burtis, M., and Bucar, F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil phytotherapy *Research*, 14: 323-328.
  - Burtis, M., Asres, K. and Bucar, F., 2001. The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*. *Phytother Research*, 15: 103-108.
  - Cross, A.R. and Jones, O.T.G. 1991. Enzymatic mechanism of super oxide production. *Biochemical et Biophysica Acta*, 1057: 281-298.
  - Farag, R.S., Badei, A.Z. Hewedi, F.M. and El-Baroty, G.S., 1989. Antioxidant activity of some essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *Journal of American Oil Chemist Society*, 66: 792-99.
  - Farjon, A., 1992. The Taxonomy of Multiseed Junipers (*Juniperus* Sect. *Sabina*) in Southwest Asia and East Africa (Taxonomic Notes on Cupressaceae), *Edinbourg Botany journal*, 49: 251-283.
  - Hooper, D. and Field, H., 1937. Useful Plants and Drugs of Iran and Iraq. Field Museum of Natural History Publication Botany Serial, 9(3): 73-241.
  - Jochile, W., 1979. Mense-Inducing Drugs: Their role in antique, medieval and renaissance

- Valenzual, A., Guerra, R. and Videla, L.A., 1986. Antioxidant properties of the flavonoids silybin and (+)-cyanidanol-3: comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxy toloen. *Planta Medica*, 8: 438-440.
- Vankampen, E.J., Zijlstra, W.G., 1965. Determination of hemoglobin and its derivatives. *Advance Clinical Chemistry*, 8: 141-187.
- Yesilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y. and Takaishi, Y., 1995. Traditional Medicine in Turkey, V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *Journal of Ethnopharmacology*, 46: 133-152.

## Antioxidant effects of the essential oils from the fruits and twigs of *Juniperus excelsa* subsp. *excelsa* on several oxidative systems

S. Asgari<sup>1</sup>, S.A. Emami<sup>2</sup>, M.R. Shams Ardekani<sup>3</sup>, Gh. Naderi<sup>1</sup>, S. Aslani<sup>4</sup>, T. Kasher<sup>4</sup> and A. Airin<sup>4</sup>

1- Associate Professor, Isfahan Cardiovascular Research Center, Email:s\_asgari@crc.mui.ac.ir

2- Assistant Professor, Mashhad University of Medical Sciences, Faculty of Pharmacy

3- Associate Professor, Tehran University of Medical Sciences, Faculty of Pharmacy

4- Isfahan University of Medical Sciences, Faculty of Pharmacy

### Abstract

Free radicals especially reactive oxygen species damage biomolecules such as DNA, proteins, enzymes and membrane lipids. Nowadays, it is believed that antioxidant and oxidant systems play an important role in the pathogenesis of many diseases such as atherosclerosis, cancers, aging, etc. In the present study, antioxidant effects of essential oils from the fruits and twigs of *Juniperus excelsa* subsp. *Excelsa* on several oxidative systems (red blood cells haemolysis, LDL oxidation, insulin and haemoglobin glycosylation and linoleic acid peroxidation) were studied. Plant specimens were identified after collection and essential oils from the fruits and twigs were separately extracted by steam distillation method. Three different concentration of each extracts from the fruits and twigs of plant were used. Experiments were carried out in the presence and in the absence of each concentration by  $\text{Cu}^{2+}$  and spectroscopic method for LDL oxidation. 2, 2'-Azobis- (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was used to hemolysis of red blood cells and the amount of haemolysis was measured by spectroscopic method in 540 nm. Total conjugated dienes (CDs) formation from linoleic acid was determined at the presence of  $\text{FeSO}_4$  in 234 nm. The results of this study show that insulin and haemoglobin glycosylation were effectively inhibited by the examined essential oil, also LDL oxidation was inhibited in the presence of different concentration of these oils. Inhibitory effect of twigs on LDL oxidation was greater than vitamin C. No anti-oxidation activity on LDL oxidation was observed when the experiments run with examined-concentrations of fruit. Linoleic acid oxidation in the presence of examined-oils was efficiently inhibited and a direct correlation was observed between the level of inhibition and incubation time. The obtained essential oils inhibited red blood cells haemolysis in low concentration and accelerate red blood cells haemolysis by peroxidant properties in high concentration. These results demonstrate that the essential oils prepared from the fruit and twigs of the *Juniperus excelsa subsp. excelsa* possess antioxidant activity in low concentration in several oxidative systems even they caused red blood cells haemolysis in vitro. Hence, more studies are called to examine the effect of this plant for treatment of some disease including atherosclerosis, diabetes, cancer, etc.

**Key words:** Antioxidant, *Juniperus*, Red blood cell hemolysis, LDL oxidation, insulin, haemoglobin.