

زیست‌شناسی گیاهی، سال پنجم، شماره شانزدهم، تابستان ۱۳۹۲، صفحه ۹۳-۱۰۲

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۸/۰۹

تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۰۲/۰۵

تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۰۹/۲۰

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۱۰/۰۲

مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره متانولی سه گونه از جنس *Trigonella* L. از ایران

رؤیا کرمان*، مصطفی اسدبگی و زهرا حاج‌مرادی
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

چکیده

جنس *Trigonella* L. یکی از جنس‌های مهم تیره Fabaceae است که اغلب گونه‌های آن ارزش غذایی و دارویی دارند. در این بررسی، فعالیت پاد اکسایشی (آنتی‌اکسیدانی) عصاره‌های متانولی سه گونه از این جنس (*T. disperma*، *T. subenervis* و *T. teheranica*) به روش مهار رادیکال آزاد DPPH ارزیابی شد. محتوای فنل و فلاونوئید کل به ترتیب به روش‌های فولن-سیوکالتو و کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری شد. همچنین، فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های متانولی به روش انتشار دیسک در برابر شش سویه باکتری گرم مثبت و منفی مطالعه و مقایسه شد. نتایج نشان داد که محتوای فنل کل در سه گونه مطالعه شده از 0.28 ± 8 تا 1.4 ± 22.2 میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و محتوای فلاونوئید کل از 0.33 ± 5.23 تا 1.2 ± 10.48 میلی‌گرم بر گرم وزن خشک متغیر است. به علاوه، عصاره‌های گونه‌های مطالعه شده فعالیت آنتی‌اکسیدانی در خور توجهی نشان دادند. با وجود این، تفاوت معنی‌داری میان مقادیر غلظت مهار بیشینه ۵۰ درصد (IC_{50}) آنها مشاهده نشد. بیشترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در گونه *T. subenervis* با مقدار IC_{50} معادل 0.06 ± 0.123 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. گونه‌های مطالعه شده به ویژه *T. teheranica* فعالیت ضد میکروبی خوبی در برابر باکتری‌های مورد مطالعه نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضد میکروبی، فلاونوئید، فنل، *Trigonella* L.

مقدمه

تغذیه‌ای دارند. *T. foenum-graecum* یکی از گونه‌های معروف این جنس است که معمولاً به عنوان سبزی کشت می‌شود. این گونه دارای ویژگی گرم‌کشی در برابر نماتودهاست و در طب سنتی هند به عنوان ماده تب‌بر و مدرّ و نیز برای درمان ورم،

جنس شنبلیله (*Trigonella* L.) متعلق به تیره بزرگ باقلائیان (Fabaceae) متشکل از حدود ۶۵۰ جنس و ۱۸۰۰۰ گونه در دنیا است (Rakhee et al., 2004). گونه‌های مختلف این جنس مصارف دارویی و

در داروسازی، پزشکی و درمان‌های طبیعی است (Abiy et al., 2005).

تنوع گسترده‌ای از مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی مانند ترکیبات فنلی (اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها، کوئینون‌ها و تانن‌ها)، توکوفرول‌ها، کاروتنوئیدها و آسکوربیک اسید در گیاهان حضور دارند. این آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در بخش‌های مختلف گیاه مانند چوب، پوست، ساقه، میوه، برگ، ریشه، گل، دانه‌گرده و بذر توزیع شده‌اند (Chanwitheesuk et al., 2005). ترکیبات فنلی آنتی‌اکسیدانی ممکن است به عنوان اجزای مهارکننده رادیکال‌های آزاد یا کلات‌کننده یون‌های فلزی فعال در واکنش‌های احیا که قادر به کاتالیز پراکسیداسیون لیپیدها هستند، به کار روند (Schroeter et al., 2002). این ترکیبات در کموتاکسونومی نیز کاربرد وسیعی دارند. فلاونوئیدها مهم‌ترین ترکیبات فنلی از نظر تاکسونومیکی هستند که واجد هسته مشترک با تنوع وسیعی از گروه‌های جانبی هستند. در گونه‌های گیاهی مختلف تنوع چشمگیری از فلاونوئیدها مشاهده می‌شود. باقلائیان، فلاونوئیدهایی مانند ایزوفلاونوئیدها و ۵-داکسی ایزوفلاونوئیدها با ساختار شیمیایی ویژه تولید می‌کنند. این فلاونوئیدها به عنوان ترکیبات دفاعی در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و یا سیگنال‌های شیمیایی در هم‌زیستی برای تثبیت ازت نقش مهمی ایفا می‌کنند. از سوی دیگر، به عنوان ترکیبات غذایی و علوفه‌ای اهمیت زیستی فراوانی برای انسان و دام دارند (Aoki et al., 2000).

اغلب مطالعاتی که تاکنون در جنس *Trigonella* پیرامون شناسایی ترکیبات شیمیایی، خواص دارویی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها صورت گرفته است، روی

بیماری‌های قلبی، گرفتگی عروق و بزرگ‌شدگی طحال و کبد به کار می‌رود. از این گونه همچنین، به عنوان عامل ضد دیابت و پایین آورنده گلوکز و کلسترول خون نیز به طور گسترده استفاده می‌شود (Dangi et al., 2004). گونه دیگری از این جنس است که از دانه‌رست‌های جوان آن به عنوان غذا و نیز در صنعت تهیه پنیر استفاده می‌شود (Grossheim, 1945). *T. elliptica* یا شنبلیله شیرازی از بقولات انحصاری و بسیار ارزشمند مرتعی در ایران است که با پراکندگی نسبتاً زیاد، به صورت گونه همراه در ترکیب گیاهی موجود در تیپ‌های مرتعی عرصه‌های کوهستانی دیده می‌شود (مقیمی، ۱۳۸۴).

رادیکال‌های آزاد باعث ایجاد بیش از صد گونه بیماری در انسان مانند آترواسکلروزیز، دیابت، آرتریت، کم‌خونی، صدمات جبران‌ناپذیر بافتی، آسیب به سیستم عصبی مرکزی، گاستریت و سرطان می‌شوند (Kumpulainen and Cook and Samman, 1996). فرآیند اکسیداسیون، عامل اصلی تولید رادیکال‌های آزاد در مواد غذایی، داروها و موجودات زنده است (Halliwell, 2000). عدم توازن بین تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی می‌تواند باعث آسیب به ماکرومولکول‌های زیستی مهم مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شود (Poulson et al., 1998). در حال حاضر، آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در غذاها و گیاهان توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند، زیرا دارای آثار جانبی کمتری هستند (Maxwell, 1995). فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی اساس کاربرد وسیع آنها

این گونه‌ها، گیاهانی چندساله و انحصاری ایران بوده، متعلق به بخش *Ellipticae* هستند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

گونه‌های مطالعه شده از زیستگاه‌های طبیعی خود جمع‌آوری شده، در هرباریوم دانشگاه بوعلی سینا (BASU) نگهداری شده‌اند که مشخصات آنها در جدول ۱ مشاهده می‌شود.

گونه خوراکی *T. foenuem-greacum* متمرکز است (Girardon et al., 1985؛ Sood, 1975) (Girardon et al., 1989؛ Ahmadiani et al., 2004؛ al., 1989). همچنین، اجزا مختلف تشکیل دهنده اسانس گونه *T. disperma* بررسی و با اجزا اسانس گونه *T. foenuem-greacum* مقایسه شد (Ranjbar et al., 2009). در این مطالعه، برای نخستین بار محتوای فنل و فلاونوئید کل، فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی سه گونه *T. disperma*، *T. teheranica* و *T. subenervis* بررسی شده است.

جدول ۱- مشخصات سه گونه مطالعه شده از جنس *Trigonella*

شماره هرباریومی	ارتفاع (متر)	تاریخ جمع‌آوری	جمع‌آوری کننده	محل جمع‌آوری	گونه مطالعه شده
BASU14486	۱۷۳۲	۳/۸/۱۳۸۷	رنجبر و حاج‌مرادی	قزوین: آوج به آبگرم، آبگرم	<i>T. disperma</i>
BASU29401	۱۵۶۰	۱۳۸۶/۳/۹	رنجبر و حاج‌مرادی	تهران: تهران به هراز، ۲۰ کیلومتر به بومهن	<i>T. teheranica</i>
BASU27614	۱۶۲۰	۱۳۸۶/۳/۱۴	رنجبر و حاج‌مرادی	خراسان: کاشمر به نیشابور، کوه سرخ، قبل از ریوش	<i>T. subenervis</i>

شرایط خلأ توسط دستگاه روتاری Lab Tech مدل Ev311 خارج و سپس خشک شد.

تعیین محتوای فنل کل

محتوای فنل کل در عصاره‌ها توسط شناساگر فولین-سیوکالتو (Folin-Ciocalteu) سنجش شد. بدین منظور ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره رقیق شده (۰/۵) میلی‌لیتر از عصاره (۱:۱۰) از هر عصاره گیاهی یا گالیک اسید (استاندارد فنل) با ۵ میلی‌لیتر شناساگر فولین-سیوکالتو مخلوط شد. سپس ۴ میلی‌لیتر کربنات سدیم یک مولار به مخلوط اضافه و در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شد. سپس، جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin Elmer مدل

مواد شیمیایی

همه مواد شیمیایی و حلال‌های استفاده شده در این پژوهش از شرکت مرک (آلمان) و ۱۰۱-دی فنیل ۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH) از شرکت سیگما (آمریکا) با درصد خلوص بالا تهیه شده است.

روش عصاره‌گیری

گونه‌های مطالعه از زیستگاه‌های طبیعی خود جمع‌آوری شده، پس از خشک شدن در دمای اتاق تا زمان استفاده در ظرف‌های دربسته و دور از نور نگهداری شدند. برای تهیه عصاره، ۲۵ گرم پودر گیاه خشک شده از هر گونه با ۲۵۰ میلی‌لیتر متانول به وسیله سوکسله عصاره‌گیری شد. سپس، حلال عصاره‌ها تحت

اسپکتروفتومتر Perkin Elmer مدل UV/Visible Lambda 45 اندازه‌گیری شد و از آسکوربیک اسید به عنوان شاهد استاندارد استفاده شد. سپس، IC_{50} عصاره‌ها و آسکوربیک اسید محاسبه شد. نمونه‌ها در سه تکرار بررسی شدند. درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH هر عصاره با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$A_S = \text{جذب محلول واکنشی (DPPH و عصاره)},$$

$$A_B = \text{جذب محلول واجد عصاره و فاقد DPPH و}$$

$$A_C = \text{جذب محلول واجد DPPH و فاقد عصاره}.$$

$$DPPH = 100[1 - (A_S - A_B / A_C)]$$

سویه‌های باکتری مورد مطالعه

باکتری‌های مطالعه شده عبارتند از: *Proteus*، *Bacillus megaterium vulgaris* (PTCC 1079)، *Serratia marcescens* (PTCC 1017)، *Staphylococcus*، *Eshershia coli* (Wild)، 1111، *Bacillus cereus* (PTCC 1247) و *aureus* (Wild).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی

برای تعیین حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به عصاره متانولی گیاهان مورد مطالعه از روش انتشار دیسک استفاده شد (Awoyinka et al., 2007). بدین منظور، ابتدا از همه سویه‌های باکتری، سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$) تهیه شد. سپس، با ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده بر سطح محیط مولر هیتون آگار، کشت یکنواخت انجام شد. پس از آن، دیسک‌های بلانک استریل (ساخت ایران، شرکت پادتن طب) در غلظت‌های مختلف عصاره متانولی (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) غوطه‌ور شد و در نهایت، دیسک‌های تهیه شده با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی سطح

UV/Visible Lambda 45 در طول موج ۷۶۵ نانومتر ثبت شد. محتوای فنل کل در عصاره‌های مطالعه شده به صورت معادل میلی گرم گالیک اسید (GAE) بر گرم وزن خشک ارایه شد. نمونه‌ها در سه تکرار بررسی شدند (McDonald et al., 2001).

تعیین محتوای فلاونوئید کل

سنجش محتوای فلاونوئید کل به روش کلرید آلومینیوم انجام شد. بدین منظور ۰/۵ میلی لیتر از هر عصاره (۱:۱۰ g/ml) با ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس، جذب مخلوط واکنشی در ۴۱۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر Perkin Elmer مدل UV/Visible Lambda 45 ثبت شد. مقدار فلاونوئید کل عصاره‌ها به صورت معادل میلی گرم کوئرستین (QE) بر گرم وزن خشک بیان شد. نمونه‌ها در سه تکرار بررسی شدند (McDonald et al., 2001).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با بررسی فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره گیاهان مورد مطالعه سنجش شد (Stojicevic et al., 2008). بدین منظور، محلول متانولی از هر عصاره در غلظت‌های مختلف ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر تهیه شد. سپس، ۲/۵ میلی لیتر از هر عصاره با یک میلی لیتر محلول متانولی DPPH با غلظت $10^{-4} \times 3/0$ مولار مخلوط و پس از بهم زدن شدید به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد. سپس، جذب مخلوط واکنشی در ۵۱۷ نانومتر توسط

فلاونوئید کل در دو گونه *T. subenervis* و *T. teheranica* تفاوت معنی داری نشان نمی‌دهد. جدول ۲- محتوای فنل و فلاونوئید کل در سه گونه *Trigonella*. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

گونه	محتوای فلاونوئید کل (mg/g)	محتوای فنل کل (mg/g)
<i>T. disperma</i>	۵/۲۳±۰/۳۳ ^a	۸±۰/۲۸ ^a
<i>T. subenervis</i>	۱۰/۴۸±۱/۲ ^b	۲۲/۲±۱/۴ ^b
<i>T. teheranica</i>	۹/۱۷±۰/۱۶ ^b	۲۱/۳۶±۰/۹ ^b

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره سه گونه مطالعه شده با روش پتانسیل مهارکنندگی رادیکال DPPH در شکل‌های ۱ و ۲ و جدول ۳ ارائه شده است. هر سه گونه فعالیت آنتی‌اکسیدانی درخور توجهی را نشان می‌دهند، با وجود این، تفاوت معنی داری میان مقادیر IC_{50} آنها مشاهده نمی‌شود.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی

نتایج مربوط به ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره سه گونه *T. disperma*، *T. subenervis* و *T. teheranica* در برابر شش سویه باکتری گرم مثبت و منفی، به ترتیب در جدول‌های ۴ تا ۶ ارائه شده است. عصاره حاصل از گونه *T. disperma* در برابر باکتری‌های *Bacillus megaterium*، *Staphylococcus aureus* و *Serratia marcescens* و به ویژه *Proteus vulgaris* مؤثر بوده است. غلظت‌های مهارکننده حاصل بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در عصاره متانولی حل شده در محلول DMSO در جدول‌های ۴ تا ۶ ارائه شده است. عصاره گونه

آگار قرار داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری و سپس قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های حاوی عصاره اندازه‌گیری شد. قطر هاله ۷ میلی‌متری به عنوان مقاوم در نظر گرفته شد. همچنین، از دیسک حاوی DMSO (رقیق‌کننده عصاره‌ها) به عنوان شاهد منفی و از دیسک حاوی ۳۰ میکروگرم جنتامایسین و پنی‌سیلین به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. برای اطمینان، این آزمایش برای هر سویه باکتری سه بار تکرار شد و میانگین قطر هاله‌ها در سه تکرار به عنوان قطر نهایی ثبت شد.

تحلیل داده‌ها

همه آزمایش‌ها در قالب سه تکرار انجام شد. داده‌های حاصل از هر آزمایش با نرم‌افزارهای Excel و SPSS نسخه ۱۲/۰ تحلیل شد. سپس، مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح $P < 0.05$ انجام شد. نتایج حاصل از این بررسی به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شد.

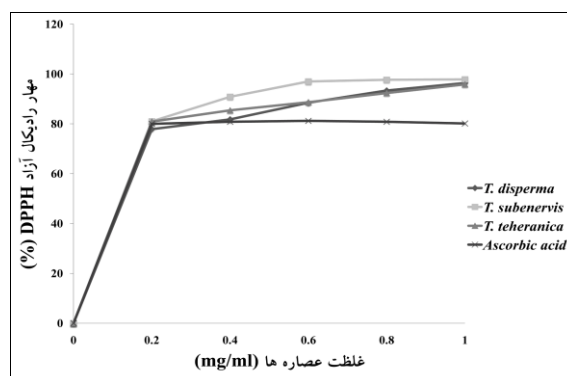
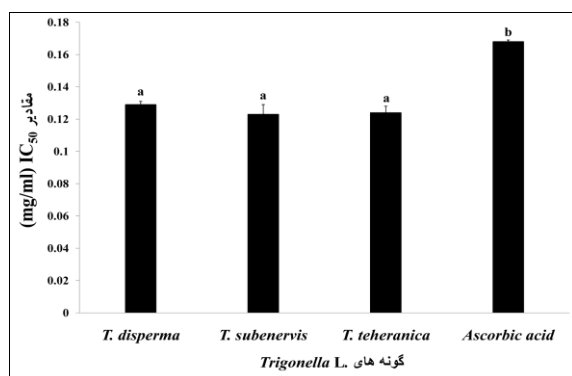
نتایج

تعیین محتوای فنل و فلاونوئید کل

نتایج حاصل از سنجش محتوای فنل کل با معرف فولین-سیوکالتو نشان می‌دهد که محتوای فنل کل در نمونه‌ها بین ۸ تا ۲۲/۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک متغیر است. گونه *T. subenervis* با مقدار ۲۲/۲، بیشترین و گونه *T. disperma* با مقدار ۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک کم‌ترین محتوای فنل را نشان داد (جدول ۲). همچنین، گونه *T. subenervis* بیشترین (۱۰/۴۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و گونه *T. disperma* کمترین (۵/۲۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) محتوای فلاونوئید کل را داراست (جدول ۲). محتوای فنل و

باکتری‌های *Basillus*، *Proteus vulgaris*، *Eshershia*، *Serratia marcescens*، *megaterium* *Bacillus coli* و *Staphylococcus aureus* و به ویژه *cereus* مؤثر بوده است.

T. subenervis بر روی باکتری‌های *Eshershia coli*، *Bacillus cereus*، *Proteus vulgaris*، *Saphylococcus aureus* و به ویژه *Serratia marcescens* و عصاره گونه *T. teheranica* بر روی



شکل ۲- مقایسه مقادیر IC₅₀ عصاره سه گونه *Trigonella* در مقایسه با آسکوربیک اسید. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± SD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح P≤0.05 است.

شکل ۱- مقایسه فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره سه گونه *Trigonella*

جدول ۳- درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH توسط عصاره سه گونه *Trigonella*. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± SD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار برای میانگین‌ها و مقادیر IC₅₀ در هر ستون و در مورد غلظت‌های مختلف در هر سطر در سطح P≤0.05 است.

IC ₅₀	میانگین	غلظت (mg/ml)					گونه
		۱	۰/۸	۰/۶	۰/۴	۰/۲	
۰/۱۲۹±۰/۰۰۲ ^a	۸۷/۵۴ ^b	۹۶/۳۸±۱/۵ ^b	۹۳/۳۸±۲/۸ ^b	۸۸/۴۸±۱/۲ ^b	۸۱/۸۰±۲/۲ ^a	۷۷/۶۶±۱/۸ ^a	<i>T. disperma</i>
۰/۱۲۳±۰/۰۰۶ ^a	۹۲/۸۷ ^c	۸۳/۹۷±۲/۲ ^c	۹۷/۶۹±۱/۳ ^c	۹۷/۰۰±۰/۹ ^c	۹۰/۸۶±۲/۸ ^b	۸۱/۰۰±۳/۳ ^a	<i>T. subenervis</i>
۰/۱۲۴±۰/۰۰۴ ^a	۸۸/۶۳ ^b	۹۵/۸۲±۲/۹ ^b	۹۲/۳۵±۲/۲ ^b	۸۸/۶۷±۱/۷ ^{ab}	۸۵/۴۱±۰/۸ ^a	۸۰/۹۰±۲/۸ ^a	<i>T. teheranica</i>
۰/۱۶۸±۰/۰۰۱ ^b	۸۰/۶۱ ^a	۸۰/۱۶±۱/۱ ^a	۸۰/۸۴±۰/۶ ^a	۸۱/۲۱±۱/۷ ^a	۸۰/۸۴±۱/۵ ^a	۸۰/۰۰±۳/۴ ^a	Ascorbic acid

جدول ۴- فعالیت ضد میکروبی عصاره *T. disperma* در برابر شش سویه باکتری گرم مثبت و منفی. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± SD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح P≤0.05 است. na=غیرفعال در برابر باکتری مطالعه شده.

سویه باکتری	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵	شاهد منفی (DMSO)
<i>Proteus vulgaris</i>	۱۰ ± ۰/۳۳ ^c	۹ ± ۰/۱۸ ^b	۷ ± ۰/۰۰ ^a	na	na
<i>Eshershia coli</i>	na	na	na	na	na
<i>Bacillus cereus</i>	۸ ± ۰/۱۲	na	na	na	na
<i>Staphylococcus aureus</i>	۸ ± ۰/۰۰ ^b	۷ ± ۰/۱۸ ^a	na	na	na
<i>Bacillus megaterium</i>	۷ ± ۰/۱۴	na	na	na	na
<i>Serratia marcescens</i>	۷ ± ۰/۰۰	na	na	na	na

جدول ۵- فعالیت ضد میکروبی عصاره *T. subenervis* در برابر شش سویه باکتری گرم مثبت و منفی. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است. na= غیرفعال در برابر باکتری مطالعه شده.

ناحیه ممانعت بر حسب (mm) در غلظت‌های مختلف عصاره (mg/ml)					سویه باکتری
۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵	شاهد منفی (DMSO)	
۱۰±۰/۲۴ ^b	۸±۰/۲۶ ^a	na	na	na	<i>Proteus vulgaris</i>
۷±۰/۰۰	na	na	na	na	<i>Eshershia coli</i>
۸±۰/۱۶ ^b	۷±۰/۱۲ ^a	na	na	na	<i>Bacillus cereus</i>
۸±۰/۲۸	na	na	na	na	<i>Staphylococcus aureus</i>
na	na	na	na	na	<i>Bacillus megaterium</i>
۱۲±۰/۳۴ ^c	۱۰±۰/۱۸ ^b	۸±۰/۰۰ ^a	na	na	<i>Serratia marcescens</i>

جدول ۶- فعالیت ضد میکروبی عصاره *T. teheranica* در برابر شش سویه باکتری گرم مثبت و منفی. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است. na= غیرفعال در برابر باکتری مطالعه شده.

ناحیه ممانعت بر حسب (mm) در غلظت‌های مختلف عصاره (mg/ml)					سویه باکتری
۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵	شاهد منفی (DMSO)	
۱۰±۰/۳۳ ^b	۸±۰/۰۰ ^a	na	na	na	<i>Proteus vulgaris</i>
۹±۰/۳۳ ^b	۷±۰/۱۵ ^a	na	na	na	<i>Eshershia coli</i>
۱۵±۰/۴۵ ^d	۱۲±۰/۱۸ ^c	۱۰±۰/۲۴ ^b	۷±۰/۱۴ ^a	na	<i>Bacillus cereus</i>
۸±۰/۲۴ ^b	۷±۰/۰۰ ^a	na	na	na	<i>Staphylococcus aureus</i>
۱۱±۰/۲۸ ^d	۱۰±۰/۳۴ ^c	۸±۰/۲۲ ^b	۷±۰/۱۱ ^a	na	<i>Bacillus megaterium</i>
۹±۰/۱۶ ^c	۸±۰/۲۴ ^b	۷±۰/۰۰ ^a	na	na	<i>Serratia marcescens</i>

بحث

داده‌اند که فعالیت زیستی این ترکیبات با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آنها در ارتباط است (Gryglewski *et al.*, 1987). فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان اغلب با در نظر گرفتن محتوای ترکیبات فنلی آنها ارزیابی می‌شود (Wojdyło *et al.*, 1992؛ Shahidi *et al.*, 1992). Lapornik *et al.* (2007) و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که متانول، حلالی مؤثر برای تخریب دیواره سلولی و آزادسازی ترکیبات فنلی از سلول است و آنزیم پلی فنل اکسیداز مخرب پلی فنل‌ها، در این محیط خنثی می‌شود. بنابراین، عصاره متانولی گیاهان بیشترین پتانسیل مهارکنندگی رادیکال DPPH را در مقایسه با بسیاری از حلال‌ها دارد (Miliauskasa *et al.*, 2004).

اغلب مطالعاتی که تاکنون پیرامون ترکیبات شیمیایی، خواص دارویی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در جنس *Trigonella L.* انجام شده است، بر روی گونه خوراکی *T. foenuem-greacum* متمرکز بوده است. در این مطالعه، محتوای فنل و فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و نیز فعالیت ضد میکروبی سه گونه *T. subenervis*، *T. teheranica*، *T. disperma* بررسی شد. ترکیبات فنلی با ویژگی مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد، ممانعت از فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو و هیدرولیتیک و نیز فعالیت ضد التهابی شناخته شده‌اند (Frankel, 1995). برخی شواهد نشان

تحقیقات جامع‌تر در زمینه گیاهان دارویی را نشان داده، افزایش روزافزون مقالات منتشر شده در زمینه خواص ضد میکروبی گیاهان را توجیه می‌کند (Cecchini, 1995). گونه‌های مطالعه شده به ویژه گونه *T. teheranica* خاصیت ضد میکروبی خوبی در برابر برخی از باکتری‌های مطالعه شده نشان دادند. تفاوت در محتوای ترکیبات مؤثر و فعالیت‌های زیستی عصاره‌های گیاهی به تفاوت‌های گونه‌ای و شرایط اقلیمی حاکم بر مکان جمع‌آوری آنها مربوط می‌شود. بررسی خواص ضد میکروبی با مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری را در رقت‌های به کار برده شده از عصاره برای هر باکتری نشان داد که گویای آن است که با افزایش غلظت ماده مؤثر در عصاره، ممانعت از رشد باکتری نیز افزایش می‌یابد. به هر حال، کاربرد بالینی گیاهان مطالعه شده نیازمند مطالعات بیشتر و وسیع‌تر است و در صورت موفقیت‌آمیز بودن و استاندارد نمودن نتایج حاصل می‌توان از این گیاهان به عنوان جایگزینی برای داروهای آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی کم اثر فعلی استفاده نمود.

جمع‌بندی

نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که عصاره سه گونه *Trigonella L.* مطالعه شده دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی درخور توجهی هستند. در صورت انجام مطالعات تکمیلی و بررسی آثار جانبی و نیز بهینه‌سازی کاربرد عصاره گونه‌های مطالعه شده می‌توان از این عصاره‌ها در صنایع غذایی و داروسازی استفاده کرد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای ترکیبات فنلی در گونه‌های مطالعه شده رابطه مستقیمی وجود دارد و با افزایش محتوای ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد. این ترکیبات می‌توانند مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج شده باشند. رابطه خطی میان محتوای ترکیبات فنلی و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش شده است (Al-Mustafa et al., 2008). مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن نشان می‌دهد که پتانسیل مهارکنندگی رادیکال DPPH توسط رقت‌های مختلف عصاره حاصل از دو گونه *T. disperma* و *T. subnervis* اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد نشان می‌دهد که با افزایش غلظت ماده مؤثر عصاره در دو گونه فوق، توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH نیز افزایش می‌یابد. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد گونه‌های مطالعه شده فعالیت آنتی‌اکسیدانی درخور توجهی نشان می‌دهند، با وجود این، تفاوت معنی‌داری میان مقادیر IC_{50} آنها مشاهده نمی‌شود. هر سه گونه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری در مقایسه با آسکوربیک اسید به عنوان شاهد مثبت نشان می‌دهند. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که قادرند از اکسیداسیون لیپیدها یا مولکول‌های دیگر توسط جلوگیری از آغاز یا گسترش زنجیره واکنش اکسیداتیو ممانعت کرده، یا آن را به تأخیر بیاورند (McCall and Frei, 1999). گیاهانی که خواص ضد میکروبی دارند، با مکانیسم‌های مختلف از آنتی‌بیوتیک‌ها برای مهار رشد باکتری‌ها استفاده می‌کنند و این امر لزوم

سپاسگزاری

نگارندگان، از همکاری کارشناسان آزمایشگاه‌های فیزیولوژی گیاهی و میکروبی‌شناسی گروه زیست‌شناسی دانشگاه بوعلی سینا قدردانی می‌کنند.

همچنین، ترکیبات موجود در عصاره سه گونه مطالعه شده در این تحقیق می‌توانند در آینده به عنوان منابعی امیدبخش برای تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی طبیعی با اثربخشی بیشتر باشند.

منابع

- مقیم، ج. (۱۳۸۴) معرفی برخی گونه‌های مهم مرتعی. انتشارات آرون. تهران.
- Abiy, Y., Solomon, D., Jacob, O. M., Christine, C. B., Matthias, H. and Martin, G. P. (2005) Antimicrobial flavonoids from the stem bark of *Erythrina burtii*. *Fitoterapia* 96: 496-499.
- Ahmadiani, A., Rustaiyan, A., Karimian, M. and Kamalinejad, M. J. (2004) The leaf oil of *Daniellia ogea* L. *Journal of Essential Oil Research* 16 (4): 282-283.
- Al-Mustafa, A. H. and Al-Thunibat, O. S. (2008) Antioxidant activity of some Jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes. *Pakistan Journal of Biological Science* 11 (3): 351-358.
- Aoki, T., Akashi, T. and Ayabe, S. I. (2000) Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. *Journal of Plant Research* 113 (4): 475-488.
- Awoyinka, O. A., Balogun, I. O. and Ogunnowo, A. A. (2007) Photochemical screening and *in vitro* bioactivity of *Cnidocolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). *Journal of Medicinal Plants Research* 1(3): 63-65.
- Cecchini, T. (1995) *Encyclopedie des plantes medicinales*. De Vecchi, Baron.
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgularg, A. and Rakariyatham, N. (2005) Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chemistry* 92: 491-497.
- Cook, N. C. and Samman, S. (1996) Flavonoids: chemistry, metabolism, cardio protective effects and dietary sources. *Nutritional Biochemistry* 7: 66-76.
- Dangi, R. S., Lagu, M. D., Choudhary, L. B., Ranjekar, P. K. and Gupta, V. S. (2004) Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. *Biomed Central Plant Biology* 4: 13-23.
- Frankel, E. (1995) Nutritional benefits of flavonoids. In: *International Conference on Food Factors*, Hamamatsu, Japan.
- Girardon, P., Bessiere, J. M., Baccou, J. C. and Sauvaire, Y. (1985) Volatile constituents of fenugreek seeds. *Planta Medica* 6: 533-534.
- Girardon, P., Sauvaire, Y., Baccou, U. C. and Bessiere, J. M. (1989) Identification de la 3-hydroxy-4, 5-dimethyl-2(5H)-furanone dans l'arôme des graines de fenugrec (*Trigonella foenum graecum* L.). *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie* 19: 44-46.
- Grossheim, A. A. (1945) Fenugreek-*Trigonella* L. In: *Flora URSS* (Ed. Shishkin, B. K.) 102-129. Nauka, Moscow.
- Gryglewski, R. J., Korbut, R. and Robak, J. (1987) On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochemical Pharmacology* 32: 661-667.
- Halliwell, B. (2000) The antioxidant paradox. *The Lancet* 355: 1179-1180.
- Kumpulainen, J. T. and Salonen, J. T. (1999) Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease. *The Royal Society of Chemistry* 3: 178-187.
- Lapornik, B., Prosek, M. and Wondra, A. G.

- (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* 71: 214-222.
- Maxwell, S. R. J. (1995) Prospects for the use of antioxidants therapies. *Drugs* 49(3): 345-61.
- McCall, M. R. and Frei, B. (1999) Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biology Medicine* 26: 1034-1053.
- McDonald, S., Prenzler, P. D., Autolovich, M. and Robards, K. (2001) Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry* 73: 73-84.
- Miliauskasa, G., Venskutonisa, P. and Van Beek, T. (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85: 231-237.
- Poulson, H. E., Prieme, H. and Loft, S. (1998) Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *European Journal of Cancer Prevention* 7: 9-16.
- Rakhee, S. D., Meena, D. L., Lal, B. C., Prabhakar, K. R. and Vidya, S. G. (2004) Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. *Biomed Central Plant Biology* 4: 1-11.
- Ranjbar, M., Karamian, R. and Hajmoradi, Z. (2009) Composition of the essential oil of *Trigonella disperma* from Iran. *Chemistry of Natural Compound* 45 (1): 116-117.
- Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J. P. E., Williams, R. J., Cadenas, E. and Rice-Evans, C. (2002) MAPK signaling in neurodegeneration: influence of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiology of Aging* 23: 861-880.
- Shahidi, F. and Janitha, P. K. and Wanasundara, P. D. (1992) Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32: 67-103.
- Sood, A. (1975) Chemical compounds from the leaves of *Trigonella foenum-graecum* L. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 37: 100-101.
- Stojicevic, S., Stanisavljevic, I., Velickovic, D., Veljkovic, V. and Lazic, M. (2008) Comparative screening of the anti-oxidant and antimicrobial activities of *Sempervivum marmoreum* L. extracts obtained by various extraction techniques. *Journal of the Serbian Chemical Society* 73(6): 597-607.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J. and Telser, J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry* 266: 37-56.
- Wojdyło, A., Oszmian´ski, J. and Czemerys, R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105: 940-949.

Antioxidant and antimicrobial activities of the methanolic extracts of three *Trigonella* species from Iran

Roya Karamian *, Mostafa Asadbegy and Zahra Hajmoradi

Department of Biology, Faculty of Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Abstract

This paper represents a comparative study of total phenol and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of the methanolic extracts of three *Trigonella* species, namely *T. disperma*, *T. teheranica* and *T. subnervis*. Total phenol and flavonoid contents were determined by Folin Ciocalteu and Aluminum chloride colorimetric methods, respectively. DPPH free radical scavenging assay was used to evaluate antioxidant activity. In addition, antibacterial activities of the extracts against six gram positive and negative bacteria were studied by disc diffusion method. Total phenol and flavonoid contents varied from respectively 8 ± 0.28 to 22.2 ± 1.4 mg/g dw and 5.23 ± 0.33 to 10.48 ± 1.2 mg/g dw, in the studied species. In addition, the species showed high antioxidant capacities. However, there were no significant differences between their IC₅₀ values. The highest scavenging potency of DPPH free radical was observed in *T. subnervis* with IC₅₀ = 0.123 ± 0.006 mg/ml. All three species, especially *T. teheranica* showed remarkable antimicrobial activity against some studied bacteria.

Key words: Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Flavonoid, Phenol, *Trigonella*

* Corresponding Author: r_karamian@basu.ac.ir