فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۵، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۱۲۸-۱۲۰ (۱۳۸۸)

بررسی فعالیت مهارکنندگی رادیکالهای نیتریک اکسید توسط عصاره آنتوسیانینی میوه‌های شاه‌توت (*Morus nigra* L.)، توت‌فرنگی (Fragaria vesca L.) و توت‌سیاه (*Morus alba* L. Var. *Nigra*)

الهام نیکخواه[1*]، مسعود خیامی[2] و رضا حیدری[3]

۱*- نویسنده مسئول، مربی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، پست الکترونیک: tu8084@yahoo.com
۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه
۳- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۸۷ تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۸۷

چکیده

گونه‌های اکسیژن فعال ROS و نیتروژن فعال RNS اشکال مولکولهای فعالی هستند که می‌توانند موجب آسیب به DNA شده و در نهایت منجر به جهش گردند. در واقع رادیکالهای آزاد نقش عمده‌ای در ایجاد اختلال در سلامتی انسان دارند که شامل فرایندهای پیری، سرطان و آترواسکلروزیس می‌باشد. به‌عکس، آنتی‌اکسیدانها به روشهای مختلف می‌توانند رادیکالهای آزاد را مهار نمایند. مهار آزادسازی رادیکالهای آزاد به‌خصوص رادیکالهای نیتریک اکسید که جزء RNSها می‌باشند، یک راهبرد بالقوه جهت کنترل التهاب می‌باشد. بسیاری از داروهای ضد التهابی، گوارشی و حفاظت‌کننده عصبی، مکانیسمهای آنتی‌اکسیدانی و یا جمع‌کنندگی رادیکال را دارند. مطالعات بسیاری فعالیتهای آنتی‌اکسیدانی و فواید سلامتی آنتوسیانین‌های موجود در میوه‌ها و سبزیجات را شرح می‌دهند. آنتوسیانین‌ها مشتقات گلیکوزیله پلی‌هیدروکسی و پلی‌متوکسی از نمکهای فلاویلیوم بوده و به‌عنوان رنگهای طبیعی از خانواده فلاونوئیدها می‌باشند و به‌طور گسترده‌ای در گلها، میوه‌ها و سبزیجات وجود دارند. انگورها و توتها منابع غذایی اصلی آنتوسیانین‌ها هستند. توتها غنی از آنتوسیانین هستند که این ترکیبها موجب ایجاد رنگ در میوه شده و همچنین به‌عنوان آنتی‌اکسیدانهای طبیعی محسوب می‌شوند. مطالعات اولیه نشان داده که آنتوسیانین‌ها در کاهش پیری همراه با آسیبهای اکسیداتیو مفیدند. هدف از این مطالعه، سنجش میزان فعالیت مهاری آنتوسیانین‌های سه گونه توت در برابر رادیکالهای نیتریت بود. برای این کار عصاره آنتوسیانینی با استفاده از روش Francis و Cribago استخراج شده و سپس این عصاره آنتوسیانینی جهت سنجش مهار رادیکالهای نیتریت توسط واکنش Griess Illosvoy بکار گرفته شد. در کل نمونه‌ها مشاهده شد که ظرفیت مهار نیتریت توسط عصاره آنتوسیانینی توتها همزمان با افزایش غلظت عصاره افزایش می‌یابد. این نتایج تأییدی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنتوسیانین‌ها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، رادیکال نیتریک اکسید، شاه‌توت، توت‌فرنگی، توت‌سیاه.

مقدمه

رادیکالهای آزاد، مولکولهای ناپایدار و بسیار واکنش‌پذیری هستند که شامل انواع اکسیژن فعال (ROS) و نیتروژن فعال (RNS) هستند که شامل رادیکالهای آزاد مثل آنیون سوپر اکسید، هیدروکسیل و رادیکالهای نیتریک اکساید و گونه‌های غیر رادیکالی مثل پراکسید هیدروژن و نیتروز اسید می‌باشند (Squadrito & Pryor, 1998؛ Çakir *et al.*, 2006). انواع اکسیژن فعال می‌توانند موجب آسیب DNA شوند که این امر در نهایت منجر به جهش می‌گردد (Çakir *et al.*, 2006). رادیکالهای آزاد جهت پایداری

خود به سایر مولکولها در بدن حمله می‌کنند که در نهایت منجر به آسیب سلولی و تشکیل رادیکالهای آزاد دیگری در نتیجه یک واکنش زنجیره‌ای می‌شود. این گونه‌های واکنش‌پذیر در بیماریهای عروقی خاص و پیری شامل: التهاب، مالاریا، آرتریت روماتوئید، آب مروارید، بیماریهای قلبی، سکته، تصلب‌شرایین، دیابت، ایدز، سرطان و بیماریهای تحلیل برنده سیستم عصبی (آلزایمر و پارکینسون) نقش دارند (Szollosi & Varga, 2002؛ Pourmorad *et al*., 2006؛ Odukoya *et al*., 2005). در مقابل این عوامل، آنتی‌اکسیدانها ترکیب‌هایی هستند که به مهار بسیاری از واکنشهای اکسیداسیون که توسط رادیکالهای آزاد ایجاد می‌شوند، کمک نموده و بدین وسیله آسیب وارده به سلولها و بافتها را مهار کرده یا به تأخیر می‌اندازند. ازجمله مکانیسمهای عملکردی آنها واکنش جمع‌آوری گونه‌های رادیکال آزاد اکسیژن و نیتروژن می‌باشد. آنتی‌اکسیدانها می‌توانند آسیب رادیکالهای آزاد حاصل از اکسیداسیون LDL کلسترول که می‌تواند موجب تصلب شرایین شود و نیز پیشبرد چسبندگی پلاکت‌ها که منجر به ترومبوزیس شده و به این وسیله موجب افزایش خطر بیماریهای قلبی یا سکته می‌شود را مهار نمایند. همچنین رادیکالهای آزادی را که موجب آسیب به DNA سلول می‌شوند جمع‌آوری کرده و با این روش پیشرفت سرطان را مهار می‌کنند. همچنین می‌توانند پیشرفت التهاب و اختلال در عملکرد سیستم ایمنی را محدود نمایند (Lakenbrink *et al*., 2000). ارزش پتانسیلی آنتی‌اکسیدانها، محققان را وادار به جستجوی ترکیبهای طبیعی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا و سمیت کم نموده است. مطالعات اخیر نشان داده که تعدادی از محصولات گیاهی شامل: پلی‌فنل‌ها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، کورکومین‌ها، ترپن‌ها و انواع عصاره‌های گیاهی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهند (Roussis *et al*., 2005). در جستجو برای یافت آنتی‌اکسیدانهای طبیعی جدید، بعضی گیاهان در سالهای اخیر از لحاظ ترکیبهای آنتی‌اکسیدانی و جمع‌کنندگی رادیکالا به‌طور گسترده‌ای مطالعه شده‌اند که ازجمله آنها می‌توان به آنتوسیانین‌ها (Espin *et al*., 2000) و ترکیبهای فنلی (Rice-Evans *et al*., 1997) اشاره داشت.

همه اندامهای هوازی دارای دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی و مکانیسمهایی جهت جابجایی یا تعمیر مولکولهای آسیب دیده می‌باشند (Davies, 2000). با وجود این، گاهی این مکانیسم آنتی‌اکسیدانی طبیعی ناکافی بوده و بنابراین داشتن رژیم غذایی حاوی ترکیبهای آنتی‌اکسیدانی مهم است (Halliwell, 1994). بنابراین تحقیق در مورد تعیین منابع آنتی‌اکسیدانی طبیعی و پتانسیل‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان مهم است. توتها یکی از مهمترین منابع ترکیبهای فنلی هستند (Mazza & Miniati, 1993). سیانیدین۳-گلوکوزید که به‌طور عمده در شاه‌توت و توت‌سیاه وجود دارد به اندازه آنتی‌اکسیدانهای موجود تجاری مثل هیدروکسی تولوئن بوتیله شده و α-توکوفرول مؤثر است (Fukumoto & Mazza, 2000). سایر ترکیبهای موجود در توتها، شامل فلاونولها و هیدروکسی سینامیک اسید نیز اثر آنتی‌اکسیدانی مهمی دارند (Heinonen *et al*., 1996). بنا به دلایل ذکر شده، ما نیز در این بررسی از سه گونه توت استفاده کردیم که به میزان فراوان در کشور ما وجود دارند و منابع غنی از آنتوسیانین هستند. ازجمله شاه‌توت که آن را بومی ایران و ترکیه می‌دانند و در ایران در آذربایجان‌غربی و حوالی دره قاسملوی ارومیه به‌صورت وحشی دیده می‌شود (عزیزیان،

۲۰۰۱). توت‌سیاه یکی از واریته‌های توت‌سفید است که مخلوط با گونه اصلی در جنگلهای شمال کشور پراکنده است (ثابتی، ۱۳۷۳) و هر دوی این گونه‌ها حاوی سیانیدین۳-گلوکوزید به‌عنوان آنتوسیانین غالب هستند و نیز توت‌فرنگی که در کشور ما هم به صورت خودرو وجود دارد و هم به میزان بالایی کشت و پرورش داده می‌شود و دارای پلارگونیدین ۳-گلوکوزید به‌عنوان آنتوسیانین غالب می‌باشد و بنابراین منابع سرشار از آنتی‌اکسیدانهای طبیعی محسوب می‌شوند. هدف از این کار نیز بررسی یکی از خواص آنتی‌اکسیدانی این گونه‌ها یعنی ظرفیت مهارکنندگی رادیکالهای نیتریک اکسید می‌باشد.

مواد و روشها

نمونه‌ها به‌طور محلی از شهرستان ارومیه جمع‌آوری شدند و تا زمان آزمایش در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در زمان آزمایش عصاره آنتوسیانینی نمونه‌ها استخراج شد که برای این کار از روش Chiriboga و Francis (۱۹۷۰) استفاده شد. طبق این روش از اتانول ۰/۱ درصد اسیدی برای استخراج آنتوسیانین استفاده شد. به این ترتیب که یک کیلوگرم از هر کدام از توتها را وزن کرده و در مخلوط‌کن ریخته و همراه با آن مقداری از حلال استخراجی را که از قبل آماده شده بود به آن اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه بهم زده شد. بعد از یکنواخت شدن، مخلوط حاصل تحت شرایط خلأ توسط قیف بوخنر شیشه‌ای با کاغذ واتمن شماره ۱ صاف شد. تفاله توتها که روی کاغذ ماند کاملاً رنگی بود که می‌تواند ناشی از وجود آنتوسیانین‌ها باشد. حلال استخراجی روی تفاله ریخته شد، تا جایی که رنگ از تفاله‌ها جدا شده و تفاله حاصل بی‌رنگ شد. محلول رنگی حاصل دوباره با کاغذ واتمن شماره ۱ دو لایه صاف شد. محلول رنگی شفاف حاصل در بالن دستگاه تبخیر در خلأ و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و حلال آن جداسازی شد. بعد از جداسازی حلال، ماده غلیظی که در ته بالن باقی مانده بود تقریباً آنتوسیانین‌های خالص توتها بود. بعد از جدا کردن بالن از دستگاه، مقداری آب مقطر در آن ریخته شد تا عصاره غلیظ باقی مانده در ته بالن را در خود حل نماید. محلول حاصل به داخل یک بالن ۱۰۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد و حجم نهایی محلول حاصل توسط آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل حدود نیم ساعت با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و محلول شفاف بالایی برای انجام آزمایشها جدا شد.

تعیین غلظت آنتوسیانین‌ها

محتوی کل آنتوسیانین‌های منومری در عصاره‌ها با استفاده از روش اختلاف pH اندازه‌گیری شد (Jungmin *et al.*, 2005). میزان جذب توسط اسپکتروفتومتر در طول موجهای ۵۱۰ و ۷۰۰ نانومتر، در دو pH متفاوت (۱ و ٤/٥) اندازه‌گیری شد و از فرمول زیر برای محاسبه مقدار آنتوسیانین استفاده شد:

نتایج بر حسب میلی‌گرم اکی والان سیانیدین-۳-گلوکوزید (CGE) برای شاه‌توت و توت‌سیاه و میلی‌گرم اکی والان پلارگونیدین-۳- گلوکوزید (PGE) برای توت‌فرنگی در هر گرم از وزن تَر میوه محاسبه شد.

$$A= (A520nm-A700nm)pH\ 1-(A520nm-A700nm)pH\ 4.5$$

$$\text{میزان آنتوسیانین} = A \times MW \times DF \times 103 / \varepsilon \times l$$

ε = ضریب جذب مولار که برای سیانیدین-۳-گلوکوزید برابر با ۲٦۹۰۰ و برای پلارگونیدین-۳-گلوکوزید مساوی با ۱٥٦۰۰ می‌باشد (واحد آن بر حسب Lmol-1cm-1 است).

MW = وزن ملکولی که برای سیانیدین-۳-گلوکوزید برابر با 449.2 g/mol و برای پلارگونیدین-۳-گلوکوزید

مساوی با 433.39 g/mol می‌باشد.

DF = فاکتور رقت

l = ضخامت سل

10-3 = جهت تبدیل از g به mg

ظرفیت مهاری رادیکالهای نیتریت

برای این آزمایش از روش Garrat DC استفاده کردیم. به این منظور مخلوط واکنش (۳ml) حاوی سدیم نیترو پروسید (۲mM,۱۰ml) و بافر فسفات سالین (۰/۵ml) به همراه عصاره آنتوسیانینی مورد نظر (۰/۵ ml)، در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از انکوباسیون ۰/۵ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش با ۱ میلی‌لیتر از عامل سولفانیلیک اسید مخلوط شد (۰/۳۳٪ در گلاسیال استیک اسید ۲۰٪) و اجازه داده شد تا به مدت ۵ دقیقه جهت تکمیل diazotization باقی بماند. سپس ۱ میلی‌لیتر از نفتیل اتیلن دی‌آمین دی‌هیدروکلراید اضافه و مخلوط شد و بعد به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. یک رنگ صورتی پخش شده در محلول تشکیل شد. جذب این محلول در ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهار از فرمول زیر بدست آمد:

نتایج، حاصل سه بار تکرار هستند (A= جذب).

درصد مهار = A Blank – A sample × 100 / A sample

تجزیه آماری داده‌ها

تجزیه واریانس داده‌ها (ANOVA) در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

تعیین غلظت آنتوسیانین

محتوی کل آنتوسیانین‌های منومری در نمونه‌های مختلف که توسط روش اختلاف pH بدست آمد مطابق با شکل ۱ می‌باشد:

شکل ۱- محتوی کل آنتوسیانین‌های منومری بر حسب میلی‌گرم از انواع توت

(نتایج بر حسب میلی‌گرم اکی والان سیانیدین-۳- گلوکوزید (CGE) برای شاه‌توت و توت‌سیاه و میلی‌گرم اکی والان پلارگونیدین-۳- گلوکوزید (PGE) برای توت‌فرنگی در هر گرم از وزن تَر میوه می‌باشد.)

ظرفیت مهاری رادیکال‌های نیتریت

ظرفیت مهاری رادیکالهای نیتریت توسط عصاره‌های شاه‌توت، توت‌سیاه و توت‌فرنگی در یک روش وابسته به دوز افزایش می‌یابد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، همزمان با افزایش غلظت عصاره‌ها، قدرت مهارکنندگی رادیکالهای نیتریت نیز افزایش می‌یابد. مطابق داده‌های آماری در تمامی نمونه‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۱٪ وجود دارد. در غلظتهای مشابه، بیشترین درصد مهار رادیکالهای نیتریت در مورد شاه‌توت، یعنی ۷٤ درصد، توت‌سیاه، ٦٥/٣٦ درصد و در مورد توت‌فرنگی، ۵۸/۳۳ درصد می‌باشد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، بیشترین درصد جذب در بین سه گونه مربوط به عصاره آنتوسیانینی شاه‌توت می‌باشد.

شکل ۲- درصد مهار رادیکالهای نیتریت توسط غلظتهای متفاوت عصاره آنتوسیانینی شاه‌توت، توت‌سیاه و توت‌فرنگی (خطوط عمودی نمایانگر SD می‌باشند)

بحث

نیتریت در فرایندهای تولید فراورده‌های گوشتی به‌عنوان یک عامل نگهدارنده و رنگ به مدت طولانی استفاده شده است. نیترات موجود در بسیاری از سبزیجات نیز می‌تواند توسط واکنشهای احیایی با عملکرد باکتریهای موجود در بدن انسان به نیتریت تبدیل شود. این نیتریت‌ها می‌توانند به نیتروزآمین تبدیل شوند. نیتروزآمین‌ها مواد پروکارسینوژنیک هستند (Bartsch & Montesano, 1984). بنابراین اگر برخی مواد بتوانند نیتروزآمین یا پیش‌سازهای آنها مثل نیتریت را جمع‌آوری نمایند، شاید بتوانند عملکرد حفاظتی در برابر سرطان ایفا نمایند. نیتریک اکسید نیز یکی از رادیکالهای آزاد در محیط In vivo است و نقش مهمی در عملکردهای فیزیولوژیکی ایفا می‌نماید، اما می‌تواند در بیماری‌زایی بیماریهای التهابی نیز نقش داشته باشد. نیتریک اکسید می‌تواند با رادیکال سوپراکسید واکنش داده و تولید پروکسی نیتریت نماید که یک اکسیدان قوی بوده و موجب آسیبهای اکسیداتیو مختلف می‌شود (Tsuda *et al*., 2000). مطالعه مهار رادیکالهای نیتریک اکسید نشان می‌دهد که عصاره‌های آنتوسیانینی انواع مختلف توت، جمع‌کننده‌های بالقوه نیتریک اکسید می‌باشند. در آزمایشهای انجام شده این نیتریک اکسید از سدیم نیتروپروسید حاصل شد که این

ماده با اکسیژن جهت تشکیل نیتریت واکنش می‌دهد. عصاره‌های آنتوسیانینی توتهای مورد آزمایش، نقش مهاری در تشکیل نیتریت ایفا می‌کنند که این عمل را با رقابت با اکسیژن انجام داده و موجب مهار مستقیم نیتریت می‌شوند. رقابت عصاره‌های آنتوسیانینی به‌عنوان جمع‌کننده‌های نیتریک اکسید با اکسیژن، منجر به محصولات احیایی نیتریک اکسید می‌شوند که این امر در مطالعات دیگر نیز نشان داده شده است (Marcocci *et al.*, 1994). در این آزمایش، رادیکالهای نیتریت توسط واکنش Griess Illosvoy بدست آمد (Garrat, 1964) و در مقابل ظرفیت مهارکنندگی عصاره آنتوسیانینی توتها در برابر این رادیکالا سنجیده شد. مطابق با نتایج بدست آمده مشاهده شد که همزمان با افزایش در غلظت آنتوسیانین‌ها این ظرفیت مهاری نیز بیشتر می‌شود که این امر دلیلی بر نقش مؤثر آنتوسیانین‌ها در مهار رادیکالهای آزاد نیتریک اکسید است. البته این خاصیت مهاری آنتوسیانین‌ها تنها مربوط به رادیکال‌های یاد شده نبوده و در مورد سایر رادیکالها نیز بررسی شده و نتایج قابل‌قبولی بدست آمده که در مقالات دیگری ارائه شده‌اند. در کارهای دیگری که توسط سایر دانشمندان انجام شده و در زیر به آنها اشاره می‌گردد، این ظرفیت مهاری عمدتاً توسط سیانیدین ۳-گلوکوزید بررسی شده بود که ما علاوه بر آن در مورد پلارگونیدین ۳-گلوکوزید نیز نتایج مشابهی بدست آوردیم. در کل، نتایجی که بدست آمد مطابق با کارهای دیگری است که در زیر به مواردی از آنها اشاره می‌گردد، ازجمله Zhonggao و همکاران (۲۰۰۵) ظرفیت جمع‌آوری رادیکالهای نیتریت را در عصاره شاه‌توت بررسی کردند و نشان دادند که ظرفیت جمع‌آوری رادیکالهای نیتریت در غلظتهای پایین ناچیز بوده و بتدریج با افزایش غلظت عصاره، قدرت آن بیشتر شده و یک رفتار وابسته به دوز از خود نشان می‌دهد که ما نیز در مطالعات خود به نتایج مشابهی دست یافتیم. Pergola و همکاران (۲۰۰۶) مهار بیوسنتز نیتریک اکسید را توسط عصاره آنتوسیانینی شاه‌توت نشان دادند. مطالعات آنها نیز نشان داد که قسمتی از فعالیت ضد التهابی عصاره شاه‌توت در رابطه با مهار تولید نیتریک اکسید توسط سیانیدین-۳-گلوکوزید است که آنتوسیانین اصلی و عمده در عصاره شاه‌توت می‌باشد. به نظر می‌رسد مکانیسم این مهار در ارتباط با عملکرد بیان و فعالیت آنزیمها باشد. Tsuda و همکاران (۲۰۰۰) مکانیسم فعالیت جمع‌آوری پروکسی نیتریت را توسط آنتوسیانین‌ها شرح دادند. آنها نشان دادند که آنتوسیانین می‌تواند به‌عنوان یک مهارکننده بالقوه تشکیل تیروزین نیتراته در محیط *In Vitro* باشد و نشان دهد که چگونه پلارگونیدین که یک گروه هیدروکسیل روی حلقه B دارد، پروکسی نیتریت را توسط ردیابی محصول واکنش نیتراته (٤-هیدروکسی-۳-نیتروبنزوئیک) جمع‌آوری می‌نماید. آنها همچنین نشان دادند که سیانیدین-۳- گلوکوزید که یکی از آنتوسیانین‌های تیپیک است دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثر حفاظتی در برابر آسیبهای کبدی است (Tsuda *et al.*, 1998). نتایج بدست آمده از مطالعات دانشمندان دیگر که همسو و هم جهت با نتایج بدست آمده در این تحقیق می‌باشد و به تعدادی از آنها اشاره شد، در حقیقت تأییدی بر وجود فعالیتهای آنتی‌اکسیدانی آنتوسیانین‌ها ازجمله مهار رادیکالهای نیتریت است که یکی از عوامل اکسیدان و بوجود آورنده التهاب می‌باشند که ما به‌طور عمده این امر را در مورد دو نوع آنتوسیانین بارز یعنی سیانیدین۳- گلوکوزید و پلارگونیدین۳- گلوکوزید بررسی کرده و در مقایسه با

تحقیقات دیگر نیز نتایج مشابهی بدست آوردیم. روشی که در این مطالعه برای سنجش مهار رادیکالهای نیتریت بکار رفته یکی از روشهای مقبول و استاندارد است که از آن در مورد عصاره‌های گیاهان دیگر و مواد مؤثر دیگر نیز استفاده شده است. ازجمله، Kumaran و همکاران (۲۰۰۷) میزان فعالیت جمع‌آوری نیتریک اکسید را به‌صورت *In Vitro* در مورد عصاره متانولی ۵ گونه فیلانتوس اندازه‌گیری کردند و نشان دادند که میزان این فعالیت بستگی به غلظت عصاره دارد. Yu و همکاران (۲۰۰۷) فعالیت سنجش جمع‌آوری رادیکالهای نیتریت را در مورد عصاره فنلی پوست نوعی کاج انجام دادند و مشاهده کردند که عصاره میزان فعالیت بالایی دارد و مقدار آن با افزایش غلظت افزایش می‌یابد. در کل و با توجه به نتایج بدست آمده مشاهده می‌شود که آنتوسیانین‌ها که ازجمله رنگیزه‌های مهم در بسیاری از میوه‌ها و سبزیجات هستند، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالقوه‌ای دارند که همان‌گونه که اشاره شد این خاصیت نه‌تنها در مورد رادیکالهای نیتریک اکسید بلکه در مورد سایر رادیکالهای آزاد از جمله سوپر اکسید نیز می‌باشد. همچنین با توجه به نقش روزافزون خطر آسیبهای اکسیداتیو، اهمیت مقابله با آنها امری ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین داشتن یک رژیم غذایی غنی از میوه‌ها و سبزیجات که دارای مواد طبیعی از جمله آنتوسیانین‌ها و سایر ترکیبهای فنلی به میزان بالایی می‌باشند، جهت جلوگیری از این آسیبها امری ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین مصرف انواع مختلف توت می‌تواند نقش مهمی در مهار بیماریهای انسانی وابسته به آسیبهای اکسیداتیو ایفا نمایند. این عصاره‌ها فعالیت جمع‌آوری‌کننده قوی را نسبت به نیتریت و بنابراین مهار شکل‌گیری نیتروز آمین و کاهش سرطان‌زایی ایجاد شده توسط نیتروز آمین از خود نشان می‌دهند. در کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها قابل توجه بوده و نقش مهمی در جلوگیری از بروز بیماریهای مختلف ایفا می‌نمایند. بنابراین، توتها به‌ویژه آنهایی که دارای رنگ تیره‌تری بوده و در نتیجه میزان آنتوسیانین آنها بیشتر است، به‌عنوان یک رنگ طبیعی با خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و فواید سلامتی بوده و بنابراین به نظر می‌رسد هم در سلامت صنایع غذایی و هم در پزشکی کاربرد داشته باشند.

منابع مورد استفاده

- ثابتی، ح.، ۱۳۷۳. درختان و درختچه‌های ایران. انتشارات دانشگاه یزد، ۸٥٤ صفحه.
- عزیزیان، د.، ۲۰۰۱. فلور ایران. شماره ۳۵، تیره توت (Moraceae). انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، ۸٤ صفحه.
- Bartsch, H. and Montesano, R., 1984. Relevance of nitrosamines to human cancer. Carcinogenesis, 5: 1381-1393.
- Çakir, A., Mavi, A., Kazaz, C., Yildirim, A. and Kufrevio Glu, O.I., 2006. Antioxidant activities of the extracts and components of *Teucrium orientale* L. var. *orientale*. Turkish Journal of Chemistry, 30: 1-12.
- Chiriboga, C. and Francis, F.J., 1970. An anthocyanin recovery system from cranberry pomace. Journal of American Society Horticulteral Science, 9: 223-236.
- Davies, K.J.A., 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. IUBMB Life, 50: 279-289.
- Espin, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J. and Viguera-Garcia, C., 2000. Anthocyanine based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. Journal of Agriculteral Food Chemistry, 48: 1588-1592.
- Fukumoto, L.R. and Mazza, G., 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds. Journal of Agriculteral Food Chemistry, 48: 3597-3604.
- Garrat, D.C., 1964. The Quantitative Analysis of Drugs. Chapman and Hall ltd, Japan, 3: 456-458.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals, antioxidants, and human diseases: curiosity, cause, or consequence. The Lancet, 344: 721-724.
- Halliwell, B., 1995. How to characterize an antioxidant: An update. Biochemistry Society Symposium, 61: 73-101.

- Heinonen, I.M., Meyer, A.S. and Frankel, E.N., 1996. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. Journal of Agricultural Food Chemistry, 44: 4107-4112.
- Jungmin, L., Durst, R.W. and Wrolstad, R.E., 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential Method: collaborative study. Journal of AOAC International, 88(5): 1269-1278.
- Kumaran, A. and Karunakaran, R.J., 2007. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. Food Science and Technology, 40: 344-352.
- Lakenbrink, C., Lapczynski, S., Maiwald, B. and Engelhardt, U.H., 2000. Journal of Agriculteral Food Chemistry, 48: 2848-2852.
- Marcocci, L., Packer, L., Droy-Lefai, MT., Sekaki, A. and Gardes-Albert, M. 1994. Antioxidant action of Ginkgo biloba extracts EGb 761. Methods of Enzymology, 234:462-475.
- Mazza, G. and Miniati, E., 1993. Small Fruits. 85-130. In: Boca Raton, F.L., Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains; CRC Press: Boca Raton, FL, 362p.
- Odukoya, A.O., Ilori, O.O., Sofidiya, M.O., Aniunoh, O.A., Lawal, B.M. and Tade, I.O., 2005. Antioxidant activity of Nigerian dietary spices. Electron. Journal of Environmental and Agricultural Food Chemistry, 4(6): 1086-1093.
- Pergola, C., Rossi, A., Dugo, P., Cuzzocrea, S. and Sautebin, L., 2006. Inhibition of nitric oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract. Nitric Oxide, 15(1):c30-39.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J. and Shahabimajd, N., 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology, 5(11): 1142-1145.
- Rice-Evans, C.A., Miller, U.H. and Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Science, 2: 152-159.
- Roussis, I.G., Lambropoulos, I. and Soulti, K., 2005. Scavenging capacities of some wines and wine phenolic extracts food technol. Biotechnology, 43(4): 351-358.
- Squadrito, G.L. and Pryor, W.A., 1998. Oxidative chemistry of NO.: The roles of superoxide, ONOO-, and carbon dioxide. Free Radical Biology & Medicine, 25:392-403.
- Szôllôsi, R. and Varga, I.S., 2002. Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method). Acta Biologica Szegediensis, 46(3-4): 125-127.
- Tsuda, T., Horio, F. and Osawa, T., 1998. Dietary cyanidin 3-O-β-D-glucoside increases ex vivo oxidation resistance of serum in rats. Lipids, 33: 583-588.
- Tsuda, T., Kato, Y. and Osawa, T., 2000. Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins. Federation of European Biochemical Societies Letters, 484: 207-210.
- Yu, L., Zhao, M., Wang, J.S., Cui, C.h., Yang, B., Jiang, Y. and Zhao, Q., 2007. Antioxidant, immunomodulatory and anti-breast cancer activities of phenolic extract from pine (*Pinus massoniana* Lamb.) bark. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9: 122-125.
- Zhonggao, C., Felgines, O., Texier, C., Besson, D.J., Liu, J. and Wang, S., 2005. Antioxidant activities of total pigment extract from blackberries. Food Technology and Biotechnology, 43(1): 97-102.

Evaluation of nitric oxide scavenging activity of anthocyanins from black berry (*Morus nigra* L.), strawberry (Fragaria vesca L.) and berry (*Morus alba* L. Var. *nigra*) extracts

E. Nikkhah[1*], M. Khayami[2] and M. Heidari[2]

1***-** Correspondent author, Faculty of Science, Maragheh University, Maragheh, Iran**,**
E-mail: tu8084@yahoo.com
2- Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

Received: May 2008 Revised: January 2009 Accepted: January 2009

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are various forms of activated oxygen and nitrogen that cause DNA damage that may lead to mutation 3. In fact, free radicals are believed to play important roles in different health conditions, including the aging process, cancer and atherosclerosis. Several anti-inflammatory, digestive, anti-necrotic, neuroprotective, and hepatoprotective drugs, have recently been shown to have an antioxidant and/or radical scavenging mechanism as part of their activity. Many studies have demonstrated the antioxidant activities and health benefits of the anthocyanins occurring in various fruits and vegetables. Anthocyanins are a group of naturally occurring phenolic compounds, which are responsible for the attractive colors of many flowers, fruits (particularly in berries), vegetables and related products derived from them. These polyphenolic substances are glycosides of poly hydroxy and poly methoxy-derivatives of 2-phenylbenzopyrylium or flavilium salts. Grapes and berries are the chief dietary sources of anthocyanins. Berries are rich in anthocyanins, compounds that provide pigmentation to fruits and serve as natural antioxidants. Earlier studies have shown that berry anthocyanins are beneficial in reducing age_associated oxidative stress. The aim of this study was evaluation of inhibitory effect of anthocyanins from three spicies of berries. In this study, anthocyanin pigments were extracted from berries with Cribago & Francis method. Nitric oxide radical inhibition assay of berries' extracts have been done by the use of Griess Illosvoy reaction. The scavenging of nitric oxide by berries extract was increased in a dose-dependent manner.

Key words: Anthocyanin, nitric oxide radicals, berry, strawberry, black berry.