

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئیدی و فنلی عصاره‌های اتانولی، آبی، استونی و متانولی سیزده گیاه دارویی

ایوب مزارعی، سید محسن موسوی نیک و لیلا فهمیده*

دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۳ / پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۰ / چاپ: ۱۳۹۶/۱۲/۲۸

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، زابل، ایران

*مسئول مکاتبات: l.fahmideh@uoz.ac.ir

چکیده. ترکیبات فنولیک، به‌ویژه آنهایی که منشأ گیاهی دارند به‌دلیل ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، بخش اساسی رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهند. آنتی‌اکسیدان‌ها قادرند سیستم‌های زیستی (اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها، لیپیدها و لیپوپروتئین‌ها) در برابر رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن محافظت کنند. برخی گیاهان دارویی حاوی مقادیر زیادی از آنتی‌اکسیدان‌ها هستند که مصرف آنها می‌تواند بر سلامتی انسان مؤثر باشد. هدف این تحقیق، بررسی تأثیر روش استخراج غرقابی بر میزان استخراج ترکیب‌های فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی سیزده گیاه دارویی (آویشن شیرازی، کلپوره همدانی، بومادران شیرازی، بومادران، آویشن کوهی، بنه، برنجاسف، کاکوتی، درمنه، بابونه، زعفران، زوفا و افسنتین) در چهار حلال استخراجی (آب، متانول، استون و اتانول) است. براساس نتایج این تحقیق حلال متانولی بیشترین و حلال آبی کمترین میزان ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی و قدرت مهار رادیکال‌های آزاد را نشان داد. براساس نتایج، میزان فنول و فلاونوئید در عصاره متانولی گیاه آویشن شیرازی بیشترین و در عصاره آبی گیاه افسنتین کمترین مقدار بوده است. نتایج آزمون به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) نشان داد که بیشترین و کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌ترتیب در عصاره متانولی گیاه آویشن شیرازی و عصاره آبی گیاه افسنتین بود؛ بنابراین، می‌توان گفت انتخاب نوع حلال تأثیر زیادی بر میزان استخراج ترکیب‌های فنلی، فلاونوئیدی و مهار رادیکال‌های آزاد دارد.

واژه‌های کلیدی. آویشن شیرازی، استخراج غرقابی، افسنتین، رادیکال‌های آزاد

Assessments of phenolic, flavonoid and antioxidant activity of aqueous, alcoholic, methanol and acetone extracts of thirteen medicinal plants

Ayoub Mazarie, Seyed Mohsen Mousavi-Nik & Leila Fahmideh*

Received 11.02.2017/ Accepted 31.12.2017/ Published 19.03.2018

Department of Plant Breeding and Biotechnology, Agriculture Faculty, University of Zabol, Zabol, Iran

*Correspondent author: l.fahmideh@uoz.ac.ir

Abstract. Phenolic compounds, especially those with plant origin, constitute an essential part of the human diet due to their antioxidant properties. Antioxidants protect biological systems (nucleic acids, proteins, lipids, lipoproteins) against free radicals and reactive oxygen species. Some medicinal plants contain so high amounts of antioxidants that their use can be considerably effective for human health. The aim of this study was to evaluate the effect of flooding extraction method on phenolic compounds, flavonoids and the level of free radical scavenging properties of medicinal plants including Thyme, Hamadani Yarrow, Shirazi mountain thyme, Yarrow, Chamomile, Saffron corm hyssop Sagebrush, wormwood, *Artemisia* and *Ziziphora clinopodioides*, in four extraction solvents including water, methanol, acetone and ethanol. The results showed that methanol and water solvents had the highest and the lowest total phenolic, flavonoid and antioxidant activity, respectively. The results also showed that methanol extraction of Shirazi thyme and water extraction of Wormwood plant had the highest and the lowest phenol and flavonoids contents, respectively. The results of trapping the free radicals of DPPH indicated that the methanol extract of Shirazi thyme and aqueous extract of wormwood had the highest and the lowest inhibition activities, respectively. Therefore, the selection of solvent type can affect the rate of the extraction of phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity.

Keywords *Artemisia absinthium*, flooding extraction, free radicals, *Zataria multiflora*

مقدمه

ترکیبات فنلی به فنل‌های ساده، اسیدهای فنلی، مشتقات هیدروکسی سینامیک و فلاونوئیدها طبقه بندی می‌شوند. محققان عملکرد بسیاری از ترکیبات فنلی به منزله ترکیبات آنتی‌اکسیدان قوی گزارش کرده‌اند (Serrano et al., 2006). به دلیل ویژگی‌های سلامتی بخش آنتی‌اکسیدان‌ها و نقش آنها در پیشگیری از بیماری‌ها، علاقه محققان به بررسی حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در محصولات کشاورزی به ویژه میوه‌ها و سبزیجات به طور چشمگیری افزایش یافته است. افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در برخی محصولات به منظور جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها باعث افزایش زمان ماندگاری آنها می‌شود و از فرایند اکسیداسیون، که از عوامل بیماری‌هایی همچون سرطان است، پیشگیری و از این طریق بر سلامت انسان تأثیر می‌گذارد (Shi et al., 2005).

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیب‌هایی هستند که با جذب رادیکال آزاد و مانع از ادامه اکسیداسیون، از فساد، تغییر رنگ یا تند شدن لیپیدها جلوگیری می‌کنند. به خصوص آنتی‌اکسیدان‌هایی که بنیان حلقوی فنلی حاوی گروه OH را دارا هستند، نقش مهمی در جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها دارند (Mahdavi et al., 1995). به عبارتی، آنتی‌اکسیدان‌ها در غلظت پایین اکسیداسیون لیپیدها را به تأخیر می‌اندازند یا مانع آن می‌شوند (Choe & Min, 2010; Kamkar et al., 2009). اخیراً عوارض نامطلوبی از مصرف آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی گزارش شده است، به طوری که در حیوانات آزمایشگاهی باعث سرطان‌زایی و آسیب کبدی شده است (Hwang et al., 2001)؛ بنابراین، جست‌وجو برای جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به بررسی آنتی‌اکسیدان‌های متعددی از منابع گیاهی منجر شده است. مطالعات نشان داده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بعضی از میوه‌ها و سبزیجات به مقدار کل ترکیب‌های فنلی آنها بستگی دارد (Mour et al., 2001). فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیب‌های فنلی در گیاهان عمدتاً به دلیل ویژگی‌های اکسایش-کاهش و ساختار شیمیایی آنهاست که نقش مهمی را در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، فلزات انتقالی و مولکول‌های اکسیژن‌یگانه و سه‌گانه بازی می‌کنند. این ویژگی‌ها با تأثیرات مفید آنتی‌اکسیدان‌های فنلی روی سلامت ارتباط دارند که به دلیل تأثیرات بازدارندگی‌شان در مقابل

پیشرفت بسیاری از بیماری‌های وابسته به تنش-اکسایش، همچون بیماری‌های قلبی-عروقی، سندرم روده التهابی و بیماری آلزایمر است (Ahmadi et al., 2007).

فرایندهای استخراج ترکیبات فنلی، عامل اصلی در ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان است و تغییرپذیری ناشی از فرایند استخراج به تفاوت در پیوندهای درونی این ترکیبات و به خصوص به قطبیت مولکول‌های تشکیل دهنده حلال بستگی دارد. به همین جهت در فرایند استخراج عواملی چون حلال و زمان استخراج بسیار مهم هستند (Hayouni et al., 2007)، اما دما، قدرت استخراج کنندگی حلال، زمان و روش استفاده شده برای استخراج عصاره را بسیار تحت تأثیر قرار می‌دهند (Betancourt, 2008). هدف از انجام این تحقیق بررسی تأثیر حلال‌های آبی، اتانولی، استونی و متانولی بر میزان فنل، فلاونوئید و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آویشن شیرازی، کلپوره همدانی، بومادران شیرازی، بومادران، آویشن کوهی، بنه، برنجاسف، کاکوتی، درمنه، بابونه، زعفران، زوفا و افسنتین در محیط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه نمونه‌های گیاهی مورد نظر (جدول ۱) از مناطق مختلف جمع‌آوری شد و برای انجام آزمایش‌های مورد نظر به پژوهشگاه زیست‌فناوری دانشگاه زابل منتقل شد. به منظور تهیه عصاره‌های آبی، اتانولی، استونی و متانولی (۷۶ درصد) قسمت‌های مطالعه گیاهان در سایه خشک و سپس با آسیاب به صورت پودر درآمد. عصاره‌گیری به روش خیساندن انجام شد. برای این منظور، ابتدا پنج گرم از تمام نمونه‌های گیاهی با ترازوی دیجیتالی وزن و به نسبت یک به ده در حلال‌های مورد نظر ریخته شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت در دمای محیط روی شیکر عمل فیلتراسیون با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک و قیف ۴۰ درجه سانتی-گراد منتقل شدند تا باقیمانده حلال حذف شود و رسوب خشک شده هریک از حلال‌ها بدست آمد. پس از خشک شدن، عصاره‌ها به وسیله تیغه فلزی از روی سطح پلیت‌های شیشه‌ای خراش داده شد و پودر حاصله در ظروف شیشه‌ای تیره‌رنگ تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Ebrahimzadeh et al., 2008).
تعیین میزان فنل کل: مقادیر فنل کل با روش فولین سیو کالتیو

جدول ۱- اسامی گیاهان مورد استفاده.

Table 1. List of the used plants.

ردیف Row	نام فارسی Persian name	قسمت مورد استفاده used parts	تیره Family	نام علمی scientific name	منطقه جمع آوری the region gather
۱	افسنطین	برگ، سرشاخه های گلدار	Asteraceae	<i>Artemisia absinthium</i> L.	خراسان جنوبی- قاین
۲	اویشن شیرازی	برگ	Lamiaceae	<i>Zataria multiflora</i> Boiss.	فارس- فراهبند
۳	اویشن کوهی	برگ	Lamiaceae	<i>Thymus vulgaris</i> L.	سیستان و بلوچستان- سراوان
۴	بابونه	گل	Asteraceae	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	خراسان جنوبی- قاین
۵	برنجاسف	اندم های هوایی	Asteraceae	<i>Artemisia vulgaris</i> L.	سیستان و بلوچستان- سراوان
۶	بنه	میوه	Anacardiaceae	<i>Pistacia atlantica</i> Desf.	کرمان- جیرفت
۷	بومادران	سرشاخه های گل دار	Asteraceae	<i>Achillea wilhelmsii</i> C. Koch	خراسان جنوبی- قاین
۸	بومادران شیرازی	سرشاخه های گل دار	Asteraceae	<i>Achillea eriophora</i> Boiss.	فارس- فراهبند
۹	درمنه	سرشاخه های برگ دار	Asteraceae	<i>Artemisia aucheri</i> L.	سیستان و بلوچستان- سراوان
۱۰	زعفران	گلبرگ	Iridaceae	<i>Crocus sativus</i> L.	خراسان رضوی- گناباد
۱۱	زوفا	برگ، سرشاخه های گلدار	Lamiaceae	<i>Hyssopus officinalis</i> L.	خراسان جنوبی- قاین
۱۲	کاکوتی	برگ و شاخه	Lamiaceae	<i>Ziziphora clinopodioides</i> Lam.	خراسان رضوی- کاشمر
۱۳	کلپوره همدانی	برگ	Lamiaceae	<i>Teucrium polium</i> L.	فارس- فراهبند

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی: ۲ و ۱- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) یک ترکیب رادیکالی پایدار با رنگ بنفش است که با احیاشدن توسط عناصر الکترون‌دهنده یا هیدروژن (ترکیبات آنتی‌اکسیدانی) به دی فنیل پیکرین هیدرازیل زرد رنگ تبدیل می‌شود. توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط ترکیبات و عصاره‌های مختلف در این آزمون با میزان بی‌رنگ- کردن یا کاهش میزان جذب نوری محلول بنفش DPPH در متانول سنجیده می‌شود. بدین ترتیب که ۵۰ میکرولیتر از عصاره، با ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۰۴ درصد DPPH حل شده در متانول مخلوط شد. بعد از ۳۰ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد.

$$Sc (\%) = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

A₀ = جذب کنترل (حاوی تمامی واکنشگرها به غیر از نمونه

آزمایش)

As = جذب نمونه آزمایش

Sc % = درصد مهار رادیکال آزاد (Burits & Bucar, 2000).

تجزیه و تحلیل آماری: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای این آزمایش شامل تعداد گیاه (۱۳ سطح) و انواع حلال (۴ سطح) بودند. پس از اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل، میزان به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد و میزان ترکیبات فلاونوئیدی کل، تجزیه

اندازه‌گیری شد (Ordone, et al., 2008). عصاره با غلظت ۱ به ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره با ۲۵ میلی‌لیتر واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیو کالتیو مخلوط و به مدت ۵ دقیقه هم زده شد. سپس، ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد (۲۰ گرم نمک کربنات سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب حل شد تا محلول ۲۰ درصد کربنات سدیم تهیه شود) اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت قراردادن نمونه‌ها در دمای اتاق با دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۷۶۰ نانومتر در مقابل بلانک (متانولی، اتانولی، آبی و استونی) اندازه‌گیری شد. مقادیر فنل کل عصاره با استفاده از منحنی استاندارد براساس میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره اندازه‌گیری شد.

تعیین محتوای فلاونوئیدی عصاره: میزان محتوای فلاونوئید عصاره با روش رنگ‌سنجی ارزیابی شد (Chang et al., 2002). عصاره با غلظت ۱۰ mg/ml تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل و ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد. سپس، ۰/۱ میلی‌لیتر محلول پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به این مخلوط اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. میزان فلاونوئید با استفاده از منحنی استاندارد براساس میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش شد.

واریانس و مقایسه میانگین (با روش دانکن) با استفاده از نرم-افزارهای EXCEL و SAS 9.1 انجام شد.

نتایج

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر نوع حلال، گیاه و اثر متقابل حلال در گیاه برای مقدار کل ترکیبات فنلی، فلاونوئید کل و مهار رادیکال‌های آزاد، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند (جدول ۲).

نتایج مقایسه میانگین

مقدار ترکیبات فنلی: با مقایسه میانگین مقدار ترکیبات فنلی عصاره‌های حاصل از حلال‌های مختلف، بیشترین مقدار ترکیبات فنلی به ترتیب در عصاره‌های متانولی (۷۶ درصد) و کمترین در حلال آبی مشاهده شد (شکل ۱A). نتایج مقایسه میانگین مقدار ترکیبات فنلی عصاره‌های حاصل از گیاهان مختلف در شکل ۱B نشان می‌دهد که نوع گیاه استفاده شد. جهت استخراج تأثیر معنی‌داری (در سطح یک درصد) بر مقدار ترکیبات فنلی دارد. در بین گیاهان بررسی شده، بیشترین مقدار ترکیبات فنلی به ترتیب در گیاهان آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، کلپوره همدانی (*Teucrium polium*)، بومادران شیرازی (*Achillea eriophora*)، بومادران (*Achillea wilhelmsii*)، آویشن کوهی (*Thymus vulgaris*)، بنه (*Pistacia atlantica*)، برنجاسف (*Artemisia vulgaris*)، کاکوتی (*Ziziphora clinopo*)، درمنه (*Artemisia aucheri*)، بابونه (*Atricaria dioids*)، زعفران (*Crocus sativus*)، زوفا (*Hyssopus officinalis*)، و افسنطین (*Artemisia absinthium*) به دست آمد و ترکیبات فنلی از این نظر اختلاف معنی‌داری داشتند. بیشترین و کمترین مقدار ترکیبات فنلی به ترتیب مربوط به گیاه آویشن شیرازی و افسنطین بود.

در بررسی اثر متقابل حلال و گیاه (شکل ۲)، تیمار متانولی گیاه آویشن با میانگین $0.57 \pm 0.48/52$ (میلی گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک) بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنلی را داشت و کمترین میزان استخراج ترکیبات فنلی نیز به تیمار حلال آبی گیاه افسنطین با میانگین $0.05 \pm 0.07/3$ (میلی گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک) مربوط بود.

ترکیبات فلاونوئیدی: اثر نوع حلال به کاررفته در استخراج ترکیبات فلاونوئیدی در سطح احتمال یک درصد مؤثر و معنی‌دار بود، به طوری که حلال متانولی با میزان استخراج $3.04 \pm 1.54/181$ (میلی گرم معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک) بیشترین قدرت استخراج‌کنندگی ترکیبات فلاونوئیدی را نسبت به بقیه حلال‌ها داشته است. همچنین، کمترین قدرت استخراج مربوط به استفاده از آب با میزان استخراج $2.48 \pm 0.15/44$ (میلی گرم معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک) برای استخراج این دسته از ترکیبات بوده است (شکل ۳-۳). نتایج بررسی‌ها نشان داد که میزان فلاونوئید در گیاهان تحت مطالعه $2.7 \pm 0.40/68-3.32 \pm 1.32/17$ بود. در این میان، گیاه افسنطین (*Artemisia absinthium*) کمترین و گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بیشترین میزان را داشتند (شکل ۳B).

اثر متقابل حلال و گیاه بر میزان استخراج فلاونوئید کل در شکل ۴ آمده است. عصاره آبی گیاه *Artemisia absinthium* به ترتیب کمترین میزان استخراج و عصاره متانولی گیاه *Zataria multiflora* بیشترین میزان استخراج را نسبت به بقیه گیاهان بررسی شده داشتند.

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی: نتایج مقایسه میانگین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی حلال‌های مختلف نشان داد که نوع حلال به کاررفته تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهان مختلف داشت. در شکل ۶ اثر متقابل نوع حلال و گیاه نشان داده شده است. حلال آبی گیاه افسنطین کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تیمار متانولی گیاه آویشن شیرازی بیشترین میزان فعالیت را نسبت به سایر گیاهان تحت بررسی داشتند. عصاره‌های گیاهان مختلف داشت. در حلال‌های مورد بررسی، بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب مربوط به حلال متانولی (۷۶٪) و حلال آبی بود (شکل ۵A). با توجه به نتایج مقایسه میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی شکل ۵B مشخص شد که گیاه افسنطین (*Artemisia absinthium*) کمترین میزان و گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بیشترین میزان به‌دام-اندازی رادیکال‌های آزاد را دارا بودند.

بحث

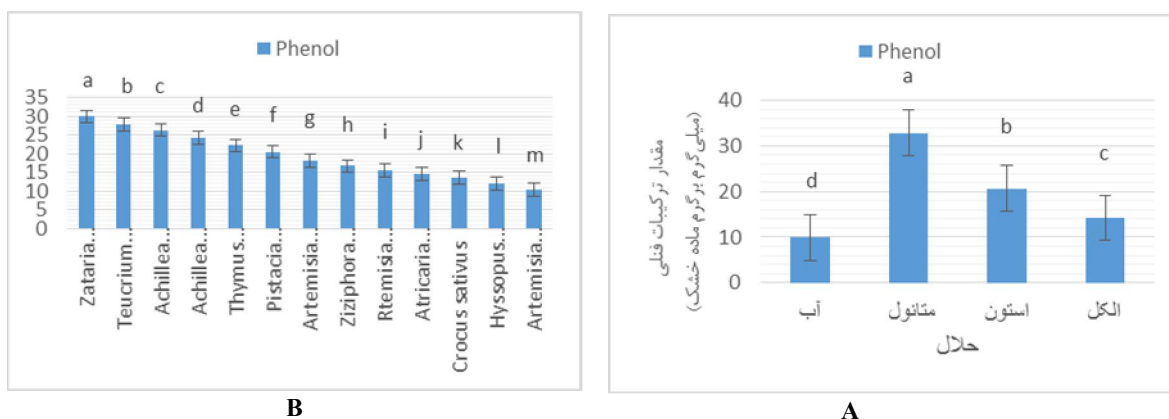
گیاهان ترکیبات متعددی دارند که ساختارهای گوناگونی را

جدول ۲- تجزیه واریانس مقدار فنل کل، فلاونوئید و مهار رادیکال های آزاد.

Table 2. Analysis of variance of total phenolics, flavonoids and free radical scavenging.

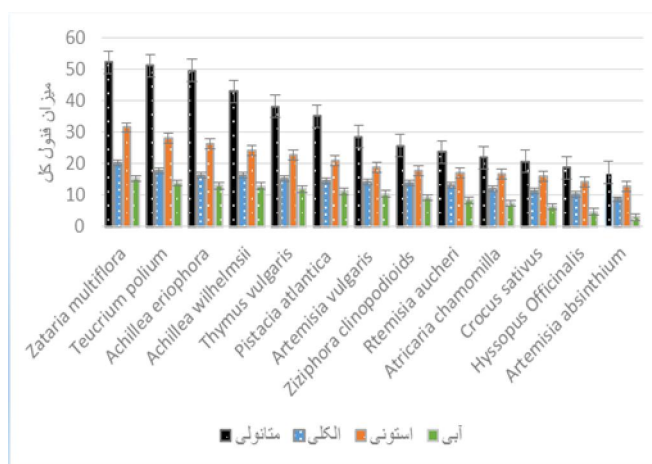
منابع تغییر	درجه آزادی	فنل کل	فلاونوئید	DPPH
حلال	۳	۳۸۹۶/۵۰**	۱۳۴۴۸۲/۹**	۲۹۲۵۶/۶**
گیاه	۱۲	۴۷۴/۶**	۱۶۲۶۰/۹**	۴۸۴/۳۴**
حلال * گیاه	۳۶	۶۴/۲۱**	۵۱۷/۷۲**	۱۰/۹۰**
خطا	۱۰۴	۰/۳۸	۱/۷	۱/۶۸
ضریب تبیین		۰/۹۹	۰/۹۸	۰/۹۷
ضریب تغییرات		۳/۱۸	۲/۵۰	۲/۵۰

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال یک و پنج درصد و ns در سطح پنج درصد معنی دار نیست.
* and ** are significantly different in 5% and 1% respectively, and ns is not significantly different.



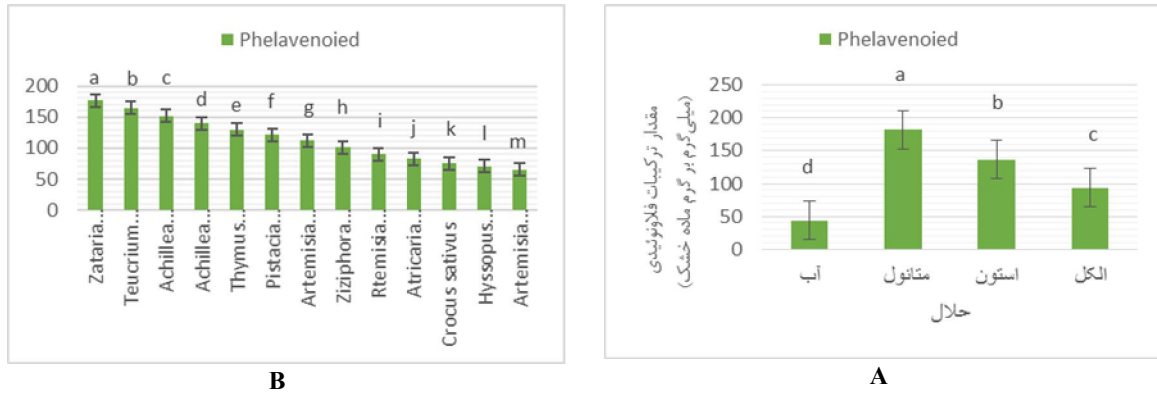
شکل ۱- A: تغییرات مقدار ترکیبات فنلی کل حاصل از حلال‌های مختلف، B: تغییرات مقدار ترکیبات فنلی کل حاصل از گیاهان.

Fig. 1. A: Changes the amount of total phenolic compounds derived from various solvents, B: Change the value of total phenolic compounds derived from plants.



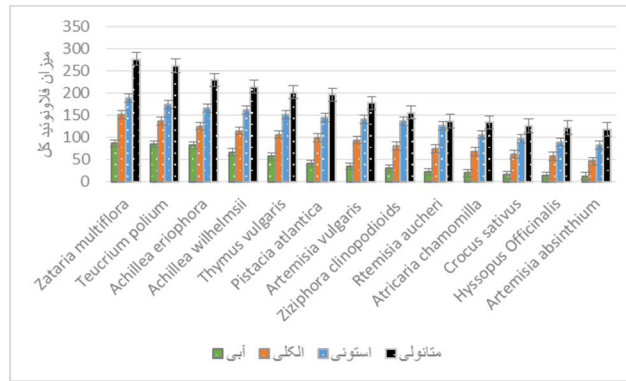
شکل ۲- اثر متقابل حلال و گیاه بر مقدار ترکیبات فنلی کل

Fig. 2. Effect of interaction of solvent and plant on total phenolic compounds



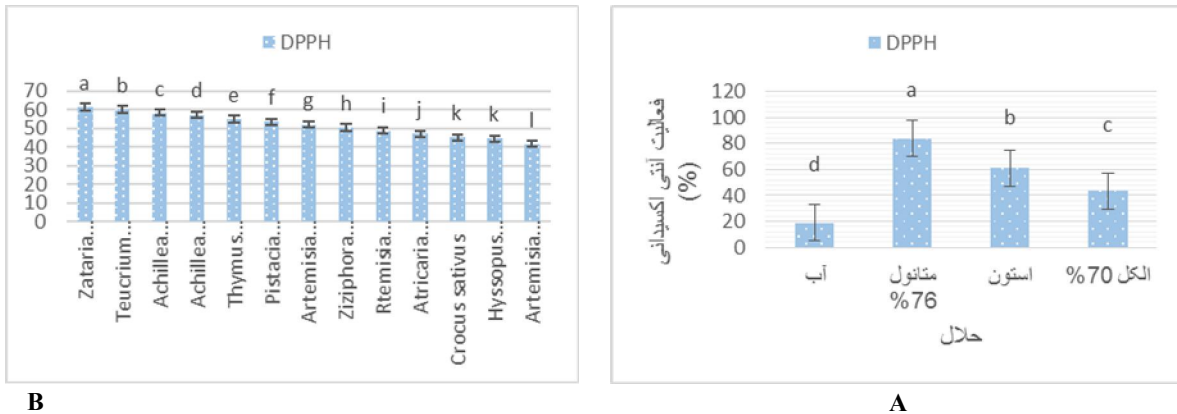
شکل ۳- A: تغییرات مقدار ترکیبات فلاونوئیدی کل حاصل از حلال‌های مختلف، B: تغییرات مقدار ترکیبات فلاونوئیدی کل حاصل از گیاهان.

Fig. 3. A: Changes of the amount of total flavonoid compounds obtained from different solvents, B: The changes in the value of total flavonoid compounds derived from plants.



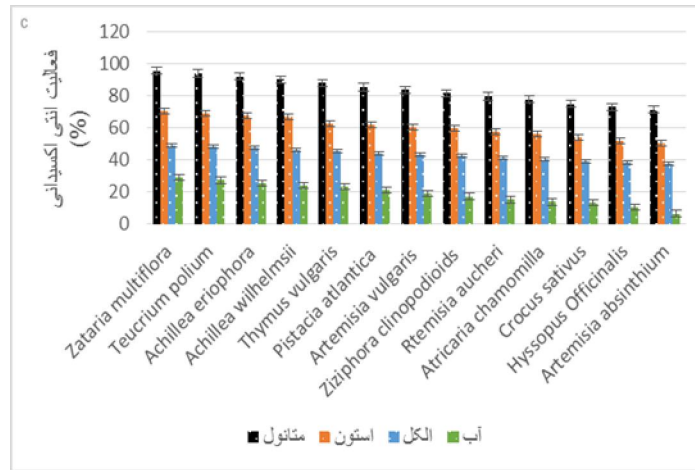
شکل ۴- اثر متقابل گیاه و نوع حلال بر مقدار ترکیبات فلاونوئیدی کل.

Fig. 4. Effect of interaction of solvent and plant on total flavonoid compounds.



شکل ۵- A: میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی حاصل از عصاره‌های مختلف، B: میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان مختلف.

Fig. 5. A: The amount of antioxidant activity caused by various solvent, B: The antioxidant activity of different plants.



شکل ۶- اثر متقابل گیاه و نوع حلال بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

Fig. 6. Interaction between the plant and the type of solvent on the antioxidant activity.

بیشتر در گیاهان دارویی با مقادیر مختلف یافت می‌شوند. حدود ۴۰۰۰ نوع ترکیب متعلق به گروه فلاونوئیدها در گیاهان وجود دارند که طی مسیر سنتز فنل پروپانویید در گیاه سنتز می‌شوند و غالباً شامل فلاون، فلاونول، و آنتوسیانین‌ها هستند (Morello *et al.*, 2005; Siriamornpus & Suttajit, 2010).

Valikhah و همکاران (2008) بیان کردند روند استخراج ترکیبات فنلی فاکتوری مهم در تعیین ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره است. دما، حلال، زمان عصاره‌گیری، قدرت استخراج و روش استخراج تأثیر بارزی در محتویات عصاره خواهد گذاشت. این تفاوت‌ها به تمایل این ترکیبات به حلال مورد نظر برای عصاره‌گیری و مخصوصاً قطبیت آن وابسته است. نتایج این تحقیق نشان داد بین میزان مواد فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در چهار عصاره (متانولی، استونی، الکی و آبی) اختلاف معنی‌داری وجود دارد به طوری که در بین عصاره‌ها حداکثر میزان فنل و فلاونوئید و میزان به-دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد از عصاره متانولی به دست آمد در حالی که کمترین مقدار فنل و فلاونوئید از عصاره آبی حاصل شد. این نتایج با مطالعه Sadeghi و همکاران (2014) مطابقت دارد. آنها در گزارشی بیان کردند میزان ترکیبات فنلی فلاونوئیدی در عصاره متانولی زولنگ نسبت عصاره اتانولی آن بیشتر است و همچنین این عصاره از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری برخوردار است و میزان EC_{50} در آزمون مهارکنندگی رادیکال آزاد برای عصاره متانولی ۱۱۹/۶۶ بر میلی‌لیتر و برای آنتی‌اکسیدان سنتزی

شامل می‌شوند. استخراج این ترکیبات به عوامل متعددی وابسته است که مهم‌ترین آنها حلال و روش استخراج است. انتخاب حلال و روش استخراج به قسمت‌های مختلف یک گیاه و نیز مواد تشکیل‌دهنده آن وابسته است. انتخاب حلال برای هر دسته از ترکیبات گیاهی بسیار مشکل خواهد بود؛ زیرا همراه با این ترکیبات، مواد دیگری نیز وجود دارد که بر درجه حلالیت این مواد تأثیر گذار است (Samsam Shariat, 1993). Khalili و Ebrahimzadeh (2015) فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان را به حضور ترکیبات فنلی در آنها نسبت دادند. ترکیبات فنلی شامل فنل‌های ساده (با یک حلقه آروماتیک دارای دست کم یک گروه هیدروکسی) با دو بخش فنلی هستند که فلاونوئیدها را تشکیل می‌دهند. Fallah و همکاران (2012) در گزارشی بیان کردند ترکیبات فنلی تقریباً در تمام بخش‌های گیاه وجود دارند و در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک مانند رشد سلولی، جوانه‌زنی دانه و رسیدن میوه نقش دارند. از مهم‌ترین ویژگی‌های که به این گروه نسبت داده می‌شود، خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که به آنها امکان ازدست‌دادن هیدروژن و به‌دام‌انداختن رادیکال آزاد را می‌دهد. علاوه بر این پلی‌فنل‌ها فعالیت‌های بیولوژیکی متفاوتی، از جمله فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهاب، ضد آلرژی و گشادکننده عروق دارند (Khalili & Ebrahimzadeh, 2015).

فلاونوئیدها نیز گروه بزرگی از ترکیبات فنلی با بیش از ۳۰۰۰ ساختار و یکی از مهم‌ترین ترکیبات ثانویه گیاهان هستند که

و فلاونوئیدی کل گیاهان دارویی است، بنابراین، تفاوت در میزان این ترکیبات در مطالعه حاضر نیز می‌تواند ناشی از عوامل ذکر شده باشد.

اساس روش DPPH بر پایه بی‌رنگ شدن محلول DPPH است که به وسیله آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره انجام می‌شود و این عمل از طریق مهار رادیکال‌های آزاد صورت می‌پذیرد. مدل به‌دام‌اندازی رادیکال پایدار DPPH به‌طور گسترده برای ارزیابی توانایی به‌دام‌نداختن رادیکال‌های آزاد در نمونه‌های مختلف به‌کار می‌رود (Lee et al., 2003). در این مطالعه، عصاره گیاه آویشن شیرازی نسبت به بقیه گیاهان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از خود نشان داد و گیاه افسنتین نسبت به بقیه گیاهان فعالیت کمتری داشت؛ بنابراین، تفاوت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاهان تحت مطالعه با بقیه گیاهان فوق‌الذکر می‌تواند ناشی از تفاوت در میزان فنل و ترکیبات مؤثر آنها باشد و از آنجایی که قابلیت احیاکنندگی عصاره گیاه آویشن شیرازی بسیار بالا بود، می‌توان نتیجه گرفت که این عصاره با دادن الکترون سبب پایان واکنش‌های زنجیره‌ای می‌شود (Lee et al., 2003). Bahrami-Karkevandi و همکاران (2011) بیان کردند با افزایش غلظت ترکیبات فنلی تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش افزایش می‌یابد، در نتیجه، احتمال دادن هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد. نتایج بقیه پژوهشگران نیز نشان داد که وجود مقادیر بالاتری از ترکیبات فنلی در عصاره با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالای آن مرتبط است (Thi & Hwang, 2014; Piluzza & Bullitta, 2011). بالابودن ترکیبات فنلی دلیل اصلی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها است، زیرا براساس شواهد موجود، ارتباط مثبتی بین ترکیبات فنلی و قدرت آنتی‌اکسیدانی گیاهان وجود دارد (Mazandarani et al., 2011; Rahimi & Ramezani, 2017).

Urooj و Arabshahi (2006) ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی، استونی و آبی برگ شاه‌توت را بررسی کردند. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار ترکیبات فنلی به ترتیب در عصاره متانولی < استونی < آبی بود. همچنین، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی، استونی، آبی و BHT به ترتیب ۱/۳۹۳، ۱/۳۸۶، ۰/۶۶، و ۳/۹۲۱ معادل میکرومول آلفا توکوفرول

۴۲/۱۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین نتایج مطالعه Alamholo و Nazeri (2015) نیز نشان داد که عصاره متانولی نسبت به عصاره اتانولی کارایی بیشتری دارد و عصاره متانولی گل سیاه‌گینه در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد را داشت و بیشترین میزان فنل و فلاونوئید مربوط به عصاره متانولی ریشه به ترتیب برابر $111/8 \pm 2/69$ mgGAE/g و $0/35 \pm 2/25$ mgQ/g بود.

درحالی‌که در مطالعه‌ای که Fallah و همکاران (2012) انجام دادند، نتایج نشان داد عصاره متانولی حاوی مقدار زیادی ترکیبات پلی‌فنلی نسبت به عصاره اتانولی است و عصاره اتانولی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به عصاره متانولی نشان داد. اما نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به عصاره متانولی و سپس عصاره استونی و الکی و آبی است. نتایج مطالعه AbbasVali و همکاران (2016) نشان داد که مناسب‌ترین حلال استون است، درحالی‌که نتایج این تحقیق نشان داد که حلال متانولی در تمام تیمارها نسبت به حلال استونی مناسب‌تر است. همچنین، نتایج این تحقیق، نتایج مطالعات قبلی راه مبنی بر این که متانول برای استخراج مواد ضد میکروبی از گیاهان دارویی در مقایسه با دیگر حلال‌ها از جمله آب، اتانول و هگزان بهتر است، تأیید می‌کند (Karaman et al., 2001; Zgoda & Porter, 2003). بنابراین، می‌توان گفت در صورت استفاده از متانول به‌عنوان حلال استخراجی، در میزان استخراج ترکیب‌های فنلی تأثیر معنی‌داری مشاهده خواهد شد. محققان تفاوت‌های مشاهده‌شده بین عصاره‌های مختلف را به تفاوت در قطبیت حلال‌های به‌کاررفته مرتبط می‌دانند. استخراج ترکیبات فنلی از مواد گیاهی به حلالیت این ترکیبات در حلال‌های مختلف بستگی دارد. به‌علاوه قطبیت حلال‌های به‌کاررفته را در افزایش حلالیت این ترکیبات نقش کلیدی دارد (Hayouni et al., 2007).

در این مطالعه، حداکثر میزان فنل و فلاونوئید از گونه آویشن شیرازی و کمترین میزان آنها از گونه افسنتین حاصل شد. Terronen و Hakkinen (2000) بیان کردند که میزان ترکیبات فنلی گیاهان در مناطق مختلف تحت تأثیر تفاوت‌های ژنتیکی، اختلافات آب و هوایی و جغرافیایی مانند ارتفاع در مناطق مختلف قرار دارد و این نشان‌دهنده تأثیر این عوامل بر میزان ترکیبات فنلی

بین حلال‌های مختلف به کاررفته (استونی، متانولی، اتانولی و آبی) حلال متانولی عملکرد بهتری در ارتباط با استخراج فنل، فلاونوئید و میزان مهار رادیکال‌های آزاد داشت، درحالی که حلال آبی عملکرد ضعیف‌تری نسبت به بقیه حلال‌ها نشان داد. در بین گیاهان به کاررفته نیز بیشترین مقدار فنل و فلاونوئید و میزان فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد متعلق به گیاه آویشن شیرازی بود، درحالی که افسنطین کمترین مقدار را نشان داد.

سپاسگزاری

از همکاری آزمایشگاه تحقیقات گیاهان دارویی پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی دانشگاه زابل تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

- Abbas Vali, M., Esmaeili Kutmehr, M., Moshtaghi, H. and Escanderi, M.H. 2016. Evaluation of antibacterial extracts of acetone, ethanol and methanol leave four varieties of oleo in Iranian on the *E. coli*. – J. Food Microbio. 2: 67-77.
- Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Moza. in model and food systems. – J. Food Chem. 105: 57-64.
- Alam Hollo, M. and Nazeri, S. 2015. Assessments of antioxidant and antibacterial activity of extracts alcoholic of flower and root *Dendrostellera lesserti* on some human pathogenic bacteria. – J. Med Sci. 21: 277-285.
- Alamhulu, M. and Nazeri, S. 2015. Investigation antibacterial and antioxidant activities of alcoholic extracts of flower and root *Dendrostellera lesserti* on some human pathogenic bacteria. – Sci. J. Hamadan Univ. Med. Sci. 21: 277-285.
- Arabshahi, D.S. and Urooj, A. 2006. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. – J. Food Chem. 102: 1233-1240.
- Bahrami-Karkevandi, M., Moshtaghian, S.J., Mahzoni, P., Adibi, S. and Kazemi, S. 2011. The effects of hydroalcoholic extract of *Artemisia aucheri* on bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats. – J. Med. Sci. 12: 33-40.
- Betancourt, A.O. 2008. Analysis, extraction and recovery of poly-3- hydroxybutyrate in the biomass. – University of Quebec at Montreal Thesis, pp 45-55.
- Burits, M. and Bucar, F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. – Phyto. Res. 14: 323-328.
- Chang, Y.L., Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. – J. of Agri. and Food Chem. 50: 3713-3717.
- Choe, E. and Min, B.D. 2009. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of food. – Rev. in Food Sci. and Food Safety 8: 345-358.

در گرم عصاره بود. این نتایج با نتایج تحقیق حاضر، از نظر وجود ارتباط بین مقدار ترکیبات فنلی عصاره‌ها با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنها، مطابقت داشت نتایج Mirzaie و همکاران (2010) نشان داد که بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به درمنه مربوط بود و الگوی فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH، توان آنتی‌اکسیدانی معادل ترولکس که براساس ربایش رادیکال نسبتاً پایدار سبز آبی ABTS³ است که به یک محصول بی‌رنگ تبدیل می‌شود. شدت کاهش رنگ نشان‌دهنده مقدار رادیکال ABTS+ است که توسط آنتی‌اکسیدان‌ها مهار شده است و میزان آن با دستگاه طیف‌سنج نوری اندازه گرفته می‌شود (Re et al., 1998). این روش را می‌توان برای اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و چربی یا مواد ناخالص و عصاره‌های غذایی در نظر گرفت. جواب این روش براساس عدد ترلکس مطرح می‌شود که بر مبنای مقایسه ظرفیت ربایش آنتی‌اکسیدانی نسبت به ترلکس است. روش TEAC به سه ترکیب شیمیایی K2S2O8, ABTS, TROLOX وابسته است (Mariken et al., 2003; Gliszynska-Swiglo, 2006) و قدرت احیاکنندگی به ترتیب از بیشترین به کمترین مقدار مربوط به درمنه، بابونه و بومادران بود، درحالی که نتایج این تحقیق نشان داد فعالیت آنتی‌اکسیدانی بومادران از درمنه و بابونه بیشتر است و در مقایسه گیاهان تحت مطالعه با یکدیگر، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب مربوط به عصاره متانولی آویشن شیرازی، کلپوره همدانی و سپس بومادران بود.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش با گزارش‌های قبلی مبنی بر ارتباط مستقیم اجزای فنلیک با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطابقت داشت. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که انتخاب نوع حلال تأثیر زیادی بر میزان استخراج ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی دارد (Gharehkhani et al., 2012) و از طرفی، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی به‌میزان زیادی تحت تأثیر ماهیت حلال، زمان استخراج و تعامل این دو عامل است. باین‌حال، قدرت استخراج حلال مهم‌ترین فاکتور مؤثر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محصول است (Sadeghi et al., 2014). در این مطالعه، با توجه به نتایج به‌دست آمده از ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهان مختلف استخراج شده با حلال‌های متفاوت، می‌توان گفت که از

- Ebrahimzadeh, M.A., Hosseinimehr, S.J., Hamidinia, A. and Jafari, M.** 2008. Antioxidant, and free radical scavenging activity of *Feijoa sellowiana* fruits peel and leaves. – *Pharmacology* 1: 7-14.
- Fallah, H., Ksouri, R., Lucchessi, M.E., Abdely, C.H. and Magné, C.H.** 2012. Ultrasound-assisted extraction: effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae shoots. – *Tro. J. of Pharm. Res.* 11: 243-249.
- Gharekhani, M., Ghorbani, M., Ebrahimzadeh, M.A., Gafari, S.M. and Sadeghimahonak, A.R.** 2012. Comparison of different methods of extraction of phenolic compounds and flavonoids of *Urtica dioica* L. – *Quarterly Sci. Res. of Med. and Aromatic Plants.* 26: 389-405.
- Gliszczynska-Swigło, A.** 2006. Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. – *J. Food Chem.* 96: 131-136.
- Hakkinen, S.H. and Torronen A.R.** 2000. Content of flavonols and selected phenolic acids in Strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. – *Food Res. Int.* 33: 517-524.
- Hayouni, A., Abedrabba, M., Bouix, M. and Hamdi, M.** 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* and *Juniperus phoenicea* fruit extracts. – *J. Food Chem.* 105: 1126-1134.
- Hwang, J.Y., Shue, Y.S. and Chang, H.M.** 2001. Antioxidative activity of roasted and defatted peanut kernels. – *Food Res. Int.* 34: 639-647
- Kamkar, A., Jebelli Javan, A., Asadi, F. and Kamalinejad, M.** 2010. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. – *Food and Chem. Toxicol.* 48: 1796-1800.
- Karaman, I., Sahin, F. and Gullule, M.** 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus*. – *J. Ethnopharmacol.* 85: 231-235.
- Khalili, M. and Ebrahimzadeh, M.A.A.** 2015. Review on antioxidants and some of their common evaluation methods. – *J. Mazandaran Univ. Med. Sci.* 24: 188-208.
- Lee, K.W., Kim, Y.J., Kim, D.O., Lee, H.J. and Lee, C.Y.** 2003. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. – *J. Agric. Food Chem.* 51: 651-20.
- Lee, S.E., Hwang, H.J., Ha, J.S., Jeong, H.S. and Kim, J. H.** 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. – *Life Sci.* 73: 167-179.
- Lutza, M., Henri'quez, C. and Escobar, M.** 2011. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus*), raw and cooked. – *J. Food Compos. Anal.* 24: 49-54.
- Mahdavi, D.L., Deshpande, S.S. and Salunkhe, D.K.** 1995. Food antioxidant. – Marcel Dekker Inc., New York, USA, 746 pp.
- Mariken, J.T.J., Sebastiaan Dallinga, J., Hans-Peter, V., Guido, R.M.M. and Aalt, B.** 2003. A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. – *Food Chem.* 80: 409-414.
- Mazandarani, M., Makri, S. and Bajian, G.R.** 2011. Evaluation of phytochemical and antioxidant activity in different parts of *Heracleum gorganicum* Rech. f. in Golestan Province, north of Iran. – *J. Plant Physio.* 2: 381-388.
- Mirzaei A, Akbartabartori M, Sadeghi H, Sharifi B.** 2010. The evaluation of total phenol and antioxidant activity yarrow, wormwood and chamomile. – *Journal of Armaghane Danesh.* 15: 243-252.
- Morello, J.R, Romero, M.P., Ramo, T. and Motilva, M. J.** 2005. Evaluation of l-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea*) from fruit setting period to harvesting time. – *Plant Sci.* 168: 65-72.
- Mour, A., Sruez, G.M., Franco, D. and Dominguez, J.** 2001. Natural antioxidant from residual sources – *Food Chem.* 72: 145-171.
- Ordone, A.A.L., Gomez, J.D. and Vattuone, M.A.** 2008. Antioxidant activities of *Sechium edule* Swartz extracts. – *Food Chem.* 97: 452-458.
- Piluzza, G. and Bullitta, S.** 2011. Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. – *Pharm. Biol.* 49: 240-247.
- Rahimi, M. and Ramezani, M.** 2017. The effects of temperature on antioxidant activity, total phenolics and agronomic traits of two thyme species. – *Nova Biologica Reperta.* 4: 264-270.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C.** 1998. Antioxidant activity applying an improved antiradical action decolonization assay. – *PII S0891-5849, 00315-3*
- Sadeghi, A.R., Salmaneian, Sh., Jamsun, M. and Tabatabai Amid, B.** 2014. Identify and measure the phenolic acids, radical scavenging activity and reducing power iron methanol extracts and ethanol *Eryngium caucasicum*. – *J. Res. and Innovation in Food Sci. and Tech.* 2: 193-204
- Samsam Shariat, Sh.** 1993. Extraction of effective components of herbal medicine, determination and evaluation methods. – *Mani Press. Esfahan. Iran.* pp: 12 -13.
- Serrano, J., Goñi, I. and Saura-Calixto, F.** 2006. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. – *Food Rev. Int.* 40: 15-21.
- Shi, J., Nawaz, H., Pohorly, J. and Mittal, G.** 2005. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods engineering and technology. – *Food Rev. Int.* 21: 1-12.
- Siriamompus, S. and Suttajit, M.** 2010. Microchemicals compounds and antioxidant activity of different morphological part of thai wildpurslane (*Portulaca oleracea*). – *Weed Sci.* 58: 182-188.
- Thi, N.D. and Hwang, E.S.** 2014. Bioactive compound contents and antioxidant activity in Aronia (*Aronia*

melanocarpa) leaves collected at different growth stages. – Prev. Nutr. Food Sci. 19: 204-212.

Vilkha, K., Mawson, R., Simons, L. and Bates, D. 2008. Application and opportunities for ultrasound assisted extraction in food industry; a review. – Innov. Food Sci. and Emer. Tech. 9: 161-169.

Zgoda, L.R. and Porter, J.R.A. 2001. Convenient microdultion method for screening natural products against bacteria and fungi – Pharmaceut. Biol. 39: 54-221.

How to cite this article:

Mazarie, A., Mousavi-Nik, S.M. and Fahmideh, L. 2018. Assessments of phenolic, flavonoid and antioxidant activity of aqueous, alcoholic, methanol and acetone extracts of thirteen medicinal plants. – Nova Biologica Rep. 4: 299-309.

مزارعی، ا.، موسوی‌نیک، س.م. و فهمیده، ل. ۱۳۹۶. بررسی فعالیت آنتی-اکسیدانی، فلاونوئیدی و فنلی عصاره‌های اتانولی، آبی، استونی و متانولی سیزده گیاه دارویی. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۴: ۳۰۹-۲۹۹.