مقاله پژوهشی

تصویر سلامت
دوره ۲ شماره ۴ سال ۱۳۹۰ صفحه ۱۵ - ۹

بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره تام گیاه Onopordon leptolepis L در شرایط In Vitro

عین اله ولی زاده*[۱،۲]، علیرضا استادرحیمی[۱]، نسرین فتح اللهی زنوز[۲]

چکیده

زمینه و اهداف: گیاهان دارویی منابع طبیعی ارزشمندی هستند که امروزه مورد توجه کشورهای پیشرفته جهان قرار گرفته و به عنوان مواد اولیه جهت تبدیل به داروهای بی خطر برای انسان تلقی می شوند. آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که به طور مؤثر از واکنش رادیکال آزاد اکسیژن جلوگیری کرده و منجر به کاهش آسیب و یا مرگ سلولی، بیماری های قلبی و عروقی و سرطان ها می شوند.

مواد و روش‌ها: پس از عصاره گیری از قسمت های پیکر رویشی و گل گیاه دارویی Onopordon leptolepis، عصاره‌های مذکور از نظر پتانسیل آنتی اکسیدانی با روش Ferric Reducing Antioxidant Potential (FRAP) در یک غلظت و جمع‌آوری رادیکال آزاد DPPH (دی‌فنیل- پیکریل- هیدرازیل) در چهار غلظت در شرایط In Vitro مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: عصاره آبی- الکلی (۷۰%) پیکر رویشی گیاه Onopordon leptolepis بیشترین فعالیت را در روش پاکسازی رادیکال آزاد DPPH و روش FRAP از خود نشان داد. همچنین عصاره آبی- الکلی (۷۰%) گل نیز بیشترین فعالیت را در روش های DPPH و FRAP از خود نشان داد. عصاره های بخش گل از نظر پتانسیل آنتی اکسیدانی با روش FRAP و جمع‌آوری رادیکال آزاد DPPH فعالیت کمتری را نسبت به عصاره های بخش پیکر رویشی نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج در کل نشان داد که عصاره آبی- الکلی قسمت های پیکر رویشی دارای خصوصیات آنتی اکسیدانی بالایی بوده و می تواند پس از آزمایش های تکمیلی در صنایع دارویی و غذایی استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: آنتی اکسیدان، DPPH، FRAP، Onopordon leptolepis

۱. مرکز تحقیقات تغذیه، دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز (**Email:** evalizade@yahoo.com)
۲. مربی، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

مقدمه

اونوپوردون (Onopordon) با نام علمی Onopordon leptolepis L گیاهی چند ساله از تیره کاسنی (Compositae) می باشد. این جنس در ایران هفت گونه دارد که در نواحی نیمه خشک کشور رویش دارد. در این جنس گل ها صورتی و گل آذین درشت، ساقه اندام های هوایی و برگ ها دارای خار، نهنج حجره حجره و فندقه ها بدون کرک صاف و تقریباً چهار گوش می باشد (۱).

اونوپوردون از گیاهان دارویی ارزشمند بوده که در طب سنتی اروپا به طور وسیعی استفاده می گردد. موارد مصرف این گیاه به عنوان غذا محدود می باشد و اهمیت اصلی آن به دلیل کاربرد دارویی آن است. این گیاه به‌دلیل داشتن ترکیبات فلاونوئیدی، از اهمیت بالایی برخوردار است. عصاره این گیاه به علت داشتن خواص آنتی اکسیدانی و اثرات ضد توموری به عنوان یک ماده محافظ فوق العاده برای فرمولاسیون داروهای مراقبت از پوست استفاده می شود (۲).

بسیاری از تحقیقات در زمینه بیولوژی و پزشکی به رادیکال‌های نظیر ROS (گونه‌های فعال اکسیژن) اختصاص دارد. ROS در بسیاری از موجودات زنده برای فرآیندهای متابولیکی طبیعی سلول مثل فاگوسیتوز، کاهش التهاب، تقسیم سلولی و سنتز کلاژن موردنیاز است (۳-۵). با این وجود، در حال حاضر شواهد قابل ملاحظه وجود دارد که ROS منجر به صدمات اکسیداتیو در بیومولکول ها می‌شود (به خصوص در پروتئین‌ها، چربی ها و DNA). این صدمات باعث اختلالات مختلف بالینی نظیر بیماری قلبی ـ عروقی، پیری و آسیب‌های عصبی نظیر آلزایمر، پارکینسون، جهش‌های ژنتیکی و سرطان می‌گردند (۶-۸).

موجودات زنده شبکه آنتی اکسیدان پیچیده‌ای را برای خنثی‌کردن گونه‌های فعال اکسیژن که برای زندگی انسان مضر هستند، ایجاد کرده‌اند (۹-۱۱). سیستم‌های وابسته به آنزیم متعددی می‌توانند رادیکال های آزاد را سم‌زدایی کنند؛ به طور مثال سوپراکسید دیسموتاز حاوی مس و روی، تبدیل آنیون سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن کاتالیز می‌کند و به دنبال آن آنزیم‌هایی نظیر کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز، پراکسید هیدروژن را با تبدیل‌کردن به آب و اکسیژن از محیط خارج می‌کنند. علاوه بر این بعضی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در مواد غذایی می‌توانند مانعی در برابر صدمات رادیکال های آزاد از طریق جلوگیری از تشکیل رادیکال‌ها، جذب رادیکال‌های آزاد یا تسریع در از بین‌رفتن آن ها باشد (۱۲و۱۳).

آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که به طور مؤثر و به طرق مختلف از واکنش رادیکال های آزاد به شکل های اکسیژن و نیتروژن فعال با بیومولکول هایی نظیر پروتئین، آمینواسید، لیپید و DNA، جلوگیری کرده و منجر به کاهش آسیب و یا مرگ سلولی، بیماری های قلبی- عروقی و سرطان ها می شوند (۱٤). در کنار نقش آن ها در سامانه های زیستی، در مواد غذایی سرشار از چربی های غیراشباع نیز از کاهش کیفیت تغذیه ای، ایمنی، بد طعمی و بی رنگ شدن به علت ایجاد ترکیبات سمی جلوگیری می کنند. آنتی‌اکسیدان ها به دو دسته شیمیایی و طبیعی تقسیم بندی می شوند (۱۵). آنتی اکسیدان های شیمیایی که بیشترین استفاده را در صنعت غذا دارند، شامل BHT، BHA، TBHQ و پروپیل گالات بوده که سرطان زایی و اثرات منفی این ترکیبات بر سلامت انسان مشخص شده است (۱٦و۱۷). بنابراین، امروزه استفاده از گروه وسیعی از گیاهان دارویی و ترکیبات آروماتیک آن ها به عنوان منابع طبیعی که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند، مورد توجه محققین قرار گرفته است (۱۸).

با توجه به اهمیت موارد ذکر شده که در بالا به آن ها اشاره شد، در این تحقیق فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه دارویی Onopordon Leptolepis L. برای اولین بار در کشور انجام می گیرد.

مواد و روش‌ها

۱-۱. مواد گیاهی: گیاه مورد نظر با نام علمی Onopordon leptolepis L از اطراف روستای بنیس واقع در شهرستان شبستر (طول جغرافیایی ´۰۵ °۴۵، عرض جغرافیایی ´۴۲ °۳۸ و ارتفاع ۱۴۱۳ متر) جمع‌آوری شد. بعد از تأیید گونه گیاه توسط هر باریوم دانشکده‌ی علوم دانشگاه تبریز، گیاه در شرایط آزمایشگاهی خشک شده و برای عصاره گیری آماده شد.

۲ـ۱. مواد شیمیایی: مواد شیمیایی و حلال های مورد استفاده در این تحقیق شامل مواد ذیل بوده که محصول شرکت تجاری مرک آلمان با درجه خلوص تجزیه ای بودند؛ دی‌فنیل- پیکریل- هیدرازیل (DPPH)، اتانول (C2H5OH)، اسید کلریدریک (HCL)، استات سدیم (CH3COONa,3H2O)، اسید استیک گلاسیال (CH3 COOH)، کلریدآهن (FeCl3,6H2O)، سولفات آهن (FeSO4,7H2O)، TPTZ (Tripyridyl-S-Triazine)، کوئرستین، هگزان، متانول و کلروفرم.

۳ـ۱. تهیه عصاره: پس از خشک کردن گیاه در شرایط آزمایشگاهی، پیکر رویشی و قسمت گل گیاه، هر کدام جداگانه توسط آسیاب مخصوص پودر و آماده عصاره‌گیری شد. امروزه روش‌های متعددی برای عصاره‌گیری از گیاه به کار گرفته می‌شود که از بین آن ها روش خیساندن برای عصاره‌گیری انتخاب شد (۱۹).

چهار نوع عصاره از قسمت پیکر رویشی و گل گیاه Onopordon leptolepis در دمای $۲۵^{o}C$ به مدت سه روز با

روش خیساندن تهیه شدند که شامل عصاره متانولی (M)، آبی- الکلی [متانول ۷۰% (H-A)]، هگزانی (Hex) و کلروفرمی (Chl) بودند.

۱-٤. اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی: برای تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های گیاه در این تحقیق از روش های DPPH و FRAP استفاده شد. همه اندازه گیری ها در سه تکرار انجام گرفته و میانگین آن ها ثبت گردید.

۱-۴-۱. تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با روش پاکسازی رادیکال DPPH (1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)

DPPH (دی‌فنیل- پیکریل- هیدرازیل) یک رادیکال آزاد ناپایدار است که می‌تواند یک الکترون یا رادیکال هیدروژن دریافت کند و به حالت پایدار درآید. به علت وجود الکترون منفرد در ساختمان DPPH، این رادیکال در طول موج ۵۱۷ نانومتر دارای جذب خوبی می‌باشد و هرگاه در حضور یک ترکیب آنتی اکسیدانی قرار بگیرد که فعالیت پاکسازی رادیکال آزاد داشته باشد، رنگ آن زایل شده و کاهش جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر، بیانی از فعالیت نمونه آنتی اکسیدان خواهد بود (۲۱و۲۰).

برای ارزیابی فعالیت پاکسازی عصاره ها چهار غلظت مختلف (۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از عصاره‌های بخش پیکر رویشی گل گیاه تهیه شده به حجم ۲ml محلول DPPH اضافه شد و جذب آن پس از ۵ دقیقه در ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. درصد مهار یا احیای DPPH توسط ترکیب آنتی‌اکسیدان از رابطه زیر قابل محاسبه است:

$$\text{مهار DPPH (\%)} = \frac{(\text{میزان جذب عصاره} + \text{DPPH}) - (\text{میزان جذب DPPH})}{\text{میزان جذب محلول DPPH}} \times ۱۰۰$$

از ترکیب آنتی‌اکسیدانی Quercetin به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

۱-٤-۲. تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با روش سنجش FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Potential)

در این روش، معرفی ساخته می شود که حاوی TPPZ (Tripyridyl-S-Triazine) و $FeCl_3$ و بافر استات است. آنتی اکسیدان هایی که توانایی احیای Fe^{3+} به Fe^{2+} را دارند، باعث تبدیل کمپلکس $TPTZ\text{-}Fe^{3+}$ بی‌رنگ به کمپلکس $TPTZ\text{-}Fe^{2+}$ می‌شود که به رنگ آبی بوده و در طول موج ۵۹۳ نانومتر شدت آن قابل اندازه‌گیری است (۲2و۲۳).

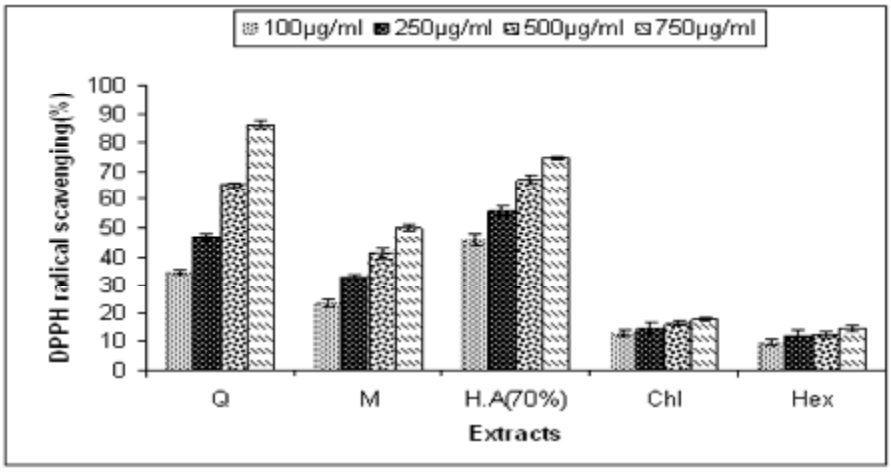
برای این کار غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌های گیاهی مختلف بخش پیکر رویشی و گل گیاه برداشته به حجم نهایی ۲ ml محلول FRAP که حاوی TPTZ ۱۰ mM (در ٤۰ mM HCl)، کلرید آهن ۲۰ mM و بافراستات ۳۰۰ mM با pH = ۳/٦ است، اضافه شد. نمونه فوق به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ ^{o}C قرار داده شده و شدت رنگ حاصل در طول موج ۵۹۳ nm در مقابل بلانک قرائت شد.

برای رسم منحنی استاندارد برای روش FRAP از سولفات آهن ($FeSO_4$و$7H_2O$) با غلظت های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکرومولار استفاده و قدرت آنتی اکسیدانی عصاره ها بر اساس مقیاس میکرو مول Fe^{2+} بیان شد. از ترکیب آنتی‌اکسیدانی Quercetin به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

یافته‌ها

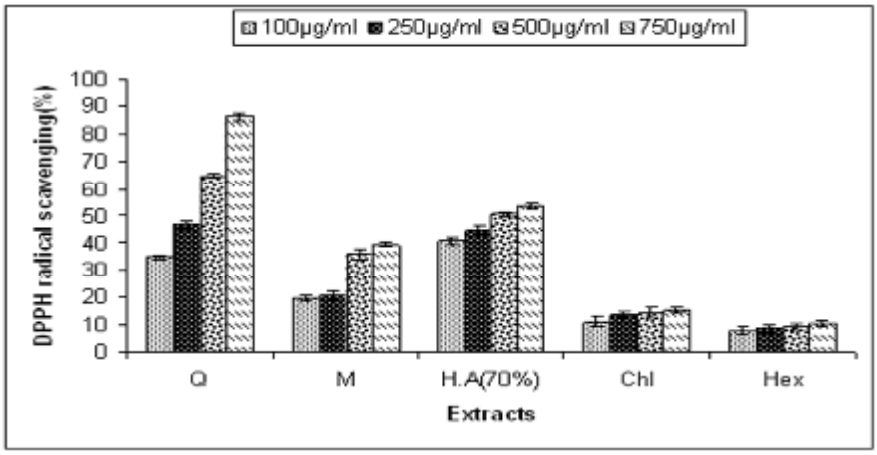
۱-۱. تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بخش پیکر رویشی و گل Onopordon leptolepis با روش DPPH

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های پیکر رویشی با روش احیای رادیکال آزاد DPPH در چهار غلظت مختلف (۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در نمودار۱ نشان داده شده است. در بین چهار نمونه آزمایش شده، عصاره هگزانی (Hex) و کلروفرمی (Chl)، بخش پیکر رویشی در مقایسه با آنتی‌اکسیدان استاندارد Quercetin، فعالیت پاکسازی ضعیفی نشان دادند و افزایش غلظت نیز تأثیری آن چنان نداشت. در حالی که عصاره آبی- الکلی [(۷۰%) H.A] در پاکسازی رادیکال DPPH بسیار مؤثر عمل کرده و با افزایش غلظت عصاره های بخش پیکر رویشی فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته است. عصاره متانولی (M) نیز در پاکسازی DPPH موثر بوده با افزایش غلظت عصاره فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش یافته است.



نمودار ۱. پاکسازی رادیکال آزاد DPPH توسط غلظت‌های مختلف از عصاره‌های بخش پیکر رویشی

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های قسمت گل گیاه با روش احیای رادیکال آزاد DPPH در چهار غلظت مختلف (۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در نمودار ۲ نشان داده شده است. در بین چهار نمونه آزمایش شده، عصاره هگزانی (Hex) و کلروفرمی (Chl) بخش گل در مقایسه با آنتی‌اکسیدان استاندارد Quercetin فعالیت پاکسازی ضعیفی نشان دادند و افزایش غلظت نیز تأثیری آن‌چنان نداشت. در حالی که عصاره آبی- الکلی [H.A (۷۰%)] در پاکسازی رادیکال DPPH بسیار مؤثر عمل کرده و با افزایش غلظت عصاره های بخش گل فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته است. عصاره متانولی (M) نیز در پاکسازی DPPH مؤثر بود و با افزایش غلظت عصاره فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش یافته است. فعالیت آنتی اکسیدانی بخش گل در مقایسه با بخش پیکر رویشی کمتر است.

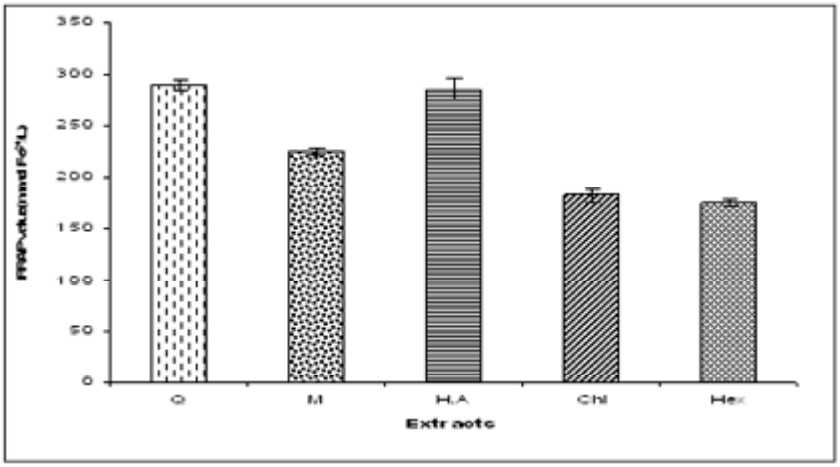


نمودار ۲. پاکسازی رادیکال آزاد DPPH توسط غلظت‌های مختلف از عصاره‌های بخش گل گیاه

۲-۱. تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بخش پیکر رویشی و گل Onopordon leptolepis **با روش** FRAP

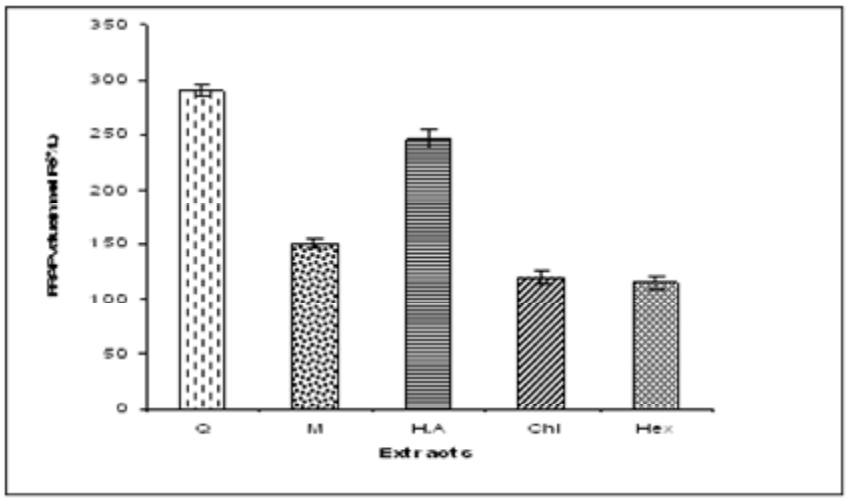
نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره قسمت پیکر رویشی گیاه با روش FRAP در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در نمودار ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که عصاره آبی- الکلی [H.A (۷۰%)] همانند روش DPPH نسبت به عصاره‌های دیگر فعال بوده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای را نشان می‌دهد.

عصاره متانولی نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی نسبت به عصاره‌های هگزانی و کلروفی (Hex و Chl) دارد. عصاره‌های Hex و Chl فعالیت‌شان تقریباً نزدیک به هم است.



نمودار3. ارزیابی پتانسیل تام آنتی‌اکسیدانی عصاره بخش پیکر رویشی با روش FRAP

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره قسمت گل گیاه با روش FRAP در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در نمودار ٤ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که عصاره آبی- الکلی [(۷۰%) H.A] نسبت به عصاره‌های دیگر فعـال بوده و فعـالیت آنتی‌اکسـیدانی بالایی را نشـان می‌دهد. عصاره متانولی نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی نسبت به عصاره‌های هگزانی و کلروفی (Hex و Chl) دارد. ولی فعالیت آنتی اکسیدانی بخش گل در مقایسه با بخش پیکر رویشی کم می باشد.



نمودار٤. ارزیابی پتانسیل تام آنتی‌اکسیدانی عصاره بخش گل با روش FRAP

بحث و نتیجه گیری

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی این توانایی را دارند که رادیکال‌های آزاد را قبل از این که واکنش‌های زنجیری اکسایشی را در غشای سلول و یا بخش‌های حاوی لیپید در سلول راه بیندازند، پاکسازی کنند. جمع‌آوری گونه‌های واکنش‌گر رادیکالی اثر شاخصی بر پایداری ترکیبات سلولی آسیب پذیر داشته و موجب تأمین سلامتی سلول‌ها و بافت‌های بدن می‌شود. در واقع عملکرد به موقع آنتی اکسیدان‌ها در مهار واکنش‌های اکسایشی رادیکال‌ها ضامن سلامتی موجود است. امروزه گیاهان دارویی به عنوان یکی از منابع مهم ترکیبات آنتی‌آکسیدان مطرح بوده و از نظر پژوهش‌های بالینی موقعیت ممتازی دارند (١٤).

فعالیت پاکسازی DPPH توسط غلظت‌های مختلف از عصاره‌های بخش پیکر رویشی و گل گیاه Onopordon leptolepis در شکل۱ و۲ نشان داده شده است. درصد فعالیت پاکسازی توسط عصاره‌های غیرقطبی (هگزان و کلروفرم)

بخش پیکر رویشی و بخش گل گیاه در مقایسه با آنتی‌اکسیدان استاندارد Quercetin افزایش ناچیزی نشان می‌دهد. در حالی‌که عصاره آبی- الکلی (۷۰%) و عصاره متانولی در حذف رادیکال آزاد DPPH به صورت وابسته به غلظت، بسیار مفید و مؤثر عمل کردند. با این توصیف می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت پاکسازی رادیکال آزاد توسط عصاره آبی- الکلی و عصاره متانولی [(۷۰%) H-A و M] وابسته به غلظت آن‌هاست. با توجه به توان آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره‌های قطبی در مقایسه با انواع غیرقطبی، می‌توان ترکیبات هیدروفیل از جمله فنول را مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی دانست (۱۹).

با توجه به نمودار ۳ و ٤ میزان عدد FRAP (مقدار کمی شده فعالیت احیا کنندگی عصاره) برای عصاره‌های مختلف متفاوت است. عصاره‌های هگزانی و کلروفی تقریباً در یک سطح بودند. عصاره آبی- الکلی [(۷۰%) M-A] میزان عددی FRAP بالایی را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج حاصل، فعالیت آنتی‌اکسیدان عصاره‌ها با افزایش قطبیت حلالی که برای عصاره‌گیری به کار رفته است، افزایش می‌یابد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که بیشترین فعالیت احیا کنندگی مربوط به عصاره قطبی است. با توجه به این‌که بخش قطبی گیاه حاوی ترکیبات فنولی است، می‌توان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه را به این ساختارها نسبت داد (۱۹).

تحقیقات نشان داده که اکثر ترکیبات فنولی که توانایی پاکسازی و خنثی‌کردن رادیکال‌های آزاد را دارند در فاز قطبی عصاره‌های گیاهی حضور دارند. در حضور غلظت‌های پایین ترکیبات فنولی یا سایر آنتی‌اکسیدان‌ها، شکستن واکنش‌های زنجیری رادیکال‌های آزاد مکانیسم عمده محسوب می‌شود و به نظر می‌رسد که فنول‌ها ترکیبات بسیار فعال گیاهان باشند که این وظیفه را برعهده می‌گیرند (٢٤). البته حمیدرضا آقابزرگ و همکارانش در ۱۳۹۱ در طی مطالعه ای جذب Pb (II) و Cu (II) را بر نمونه گیاهی خودرو Onopordon Leptolepis (OL) فرآوری شده مورد مطالعه قرار دادند. پس از تهیه این گیاه از اطراف تهران و آماده سازی و فرآوری شیمیایی آن با نمک ها کلرید (یا نیترات) منیزیم، نقره، آهن و آلومینیم در حضور هیدروژن پراکسید، قابلیت جذب این نمونه نسبت به سرب و مس، اندازه گیری کردند. بررسی تصویرهای SEM این نمونه گیاهی، حاکی از آن بود که ذره های نشانده شده روی سطح این گیاه، در حد نانومتر بوده است. نتیجه ها نشان دادند که گیاه OL بهینه شده، در بالاترین مقدار جذب خود، 79% سرب و 18% مس موجود در محلول 500 ppm را جذب کرد (۲۵).

نتایج در کل نشان داد که عصاره آبی- الکلی قسمت های پیکر رویشی و گل در هر دو روش DPPH و FRAP، دارای خصوصیات آنتی اکسیدانی بالایی بوده، ولی عصاره های بخش گل گیاه در مقایسه با بخش پیکر رویشی، فعالیت آنتی اکسیدانی پایین داشتند. پیشنهاد می شود که آزمایشات تکمیلی بر روی عصاره پیکر رویشی و گل این گیاه انجام گیرد تا بتوان بدون هیچ مشکلی از آن ها در صنایع غذایی و دارویی استفاده کرد.

References

1. Drake J. Handbook of Alien Species in Europe. Springer publication. 2009: 395
2. Joudi L and Habibi G. Exploration of medicinal species of Fabaceae, Lamiaceae and Asteraceae families in Ilkhji region, Eastern Azerbaijan Province (Northwestern Iran). Journal of Medicinal Plants Research. 2010; 4(11): 1081-1084.
3. Fidelus RK, The generation of oxygen radicals: Positive signal for lymphocyte activation. Cell Immuonol. 1988; 113: 175-182.
4. Culter RG. Oxidative stress: Its relevance to human disease and longevity determinants. Age. 1995; 18: 91-96.
5. Poli G and Parola M. Oxidative damage and fibrogenesis. Free Radic Biol. Med. 1997; 22: 287-305.
6. Cox DA, Cohen ML. Effects of oxidized low density lipoproteins on vascular contraction and relaxation. Pharmacological Reviews. 1996; 48:3-9.
7. Finkel T and Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. Nature. 2000; 408: 239-247.
8. Abe J and Brek BC. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular diseases. Trends in cardiovascular Medicine. 1998; 8:59-64.
9. Halliwell B and Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford University Press, London. Chapter 3. 1998.
10. Harman D. Free radical theory of aging increasing the Funcional life span. Annals of the Newyork Academy of Sciences. 1994; 717: 1-15.
11. Yu W, Zhao Y and Shu B. The radical scavenging activities of radix pueraiae iso Flavonoids: Achemi luminescence study . Food chemistry. 2004; 86:525-529.
12. Ames B. Micronutrients prevent cancer and delay againg. Toxicology letters. 1998; 102: 5-18.

13. Abdollahi M, Larijani B, Rahimi R and Salari P. Role of oxidative stress in osteoporosis. Therapy. 2005; 2: 787-796.
14. Shrififar F, Moshafi MH and Mansouri S.H. In vitro evalution of antibacterial and antioxidant of the essential oil and methanol extract of endemic Zataria multiflora Boiss. Food Control. 2007; 18: 5-800.
15. Singh G, Maurya S and Delampasona MP. A comparison of chemical antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. Food Chem. Toxicol. 2007; 45: 61-1650.
16. Namiki M. Antioxidants, antimutagens in food. Critical Rev. Food Sci. Nutr. 1990; 6: 273 - 300.
17. Kahl R and Kappus H. Toxicity of synthetic antioxidants BHT and BHA in comparison with natural antioxidants vitamin E. Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und Forschung 1993; 196: 329 - 38.
18. Kulisic T, Radonic A and Katalinic V. Use of different methods for testing antioxidative of oregano essntial oil. Food Chem. 2004; 85: 40-633.
19. Naznin A and Hasan N. In Vitro Antioxidant Activity of Methanolic Leaves and Flowers Extracts of Lippia Alba. Research Journal of Medicine and Medical Sciences. 2009;4(1): 107-110.
20. Jimenez-Escrig A, Jimenez-Jimenez I, Sanchez-Moreno C and Saura-Calixto F. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazy1. J. Sci. Food Agric. 2000; 80: 1686-1690.
21. Bondet V, Brand-Williams W and Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. Food Sci. Technol. Leb. 1997; 30(6): 609-615.
22. Iris F, Benzi F and Strain S. Ferric reducing antioxidant Assay. Methods in Enzymology. 1999; 292: 15-27.
23. Benzie IFF and Strain Jl. The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal. Biochem. 1996; 239: 70-76.
24. Beak BS, kwon HJ, Lee kH, Yoo M.A, kim KW, Ikeno Y, Yu BP, Bektas T, Munewer SH, Askin A and Atalay. Screening of the antioxidant potentials of six salvia species from Turky. Food chemistry. 2006; 95, 200-204.
۲۵. آقا بزرگ حمیدرضا، نعمت اللهی پریسا، حذف Pb (II) و Cu (II)از پساب ها، با Onopordon Leptolepis بهینه شده با نمک های فلزی، پژوهش های کاربردی در شیمی (پژوهش های شیمی کاربردی). ۹۱؛ ۶(۱): ۴۵-۵۳.