

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی و فراکسیون‌های آن از گیاه *Salvia verticillata* L. با استفاده از سه روش متفاوت

عفت سوری^{۱*}، حسن فرسام^۱، سوسن اردستانی^۲، مرجان ذوالفقاری^۱

۱- دانشیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- استادیار، گروه شیمی دارویی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک (IBB)، دانشگاه تهران
* آدرس مکاتبه: تهران، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۴۵۱، تلفن: ۶۶۹۵۹۰۶۵ (۰۲۱)، نمابر: ۶۶۴۶۱۱۷۸ (۰۲۱)
پست الکترونیک: souri@sina.tums.ac.ir

تاریخ تصویب: ۸۵/۹/۱۱

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۲/۹

چکیده

مقدمه: آنتی اکسیدان‌ها ترکیبات مهمی هستند که محافظت بدن را در مقابل تخریب ناشی از استرس‌های اکسیداتیو در اثر رادیکال‌های آزاد بر عهده دارند. انواع متفاوتی از مهارکننده‌های رادیکالی در بدن موجود است که اغلب آنها از رژیم غذایی مانند میوه‌ها، سبزیجات و نوشیدنی‌ها تامین می‌شوند.

هدف: در این بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه *Salvia verticillata* با استفاده از سه روش مختلف بررسی شده است.

روش بررسی: در این بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف گیاه *Salvia verticillata* با استفاده از سه روش مهار رادیکال پایدار ۲ و ۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، لیپیدپراکسیداسیون میکروزومی و مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید بررسی شده است.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که عصاره اتیل استاتی برگ و ساقه گیاه به طور نسبی در هر سه روش بیشترین فعالیت را نشان داده است. میزان IC_{50} برای این عصاره در روش مهار رادیکال DPPH، لیپید پراکسیداسیون میکروزومی و مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید به ترتیب معادل ۸/۷۸، ۰/۲۹ و ۰/۰۱ میکروگرم است که این میزان کمتر و یا در حد IC_{50} برای quercetin در شرایط مشابه است. عصاره‌های دیگر با به کارگیری روش‌های مختلف جواب‌های متفاوتی نشان داده‌اند.

نتیجه‌گیری: تناقض به دست آمده در نتایج می‌تواند در ارتباط با مکانیزم عمل اجزا، منبع تولید رادیکال و یا کینتیک واکنش مهار در روش‌های مختلف باشد. از هر یک روش‌های بررسی شده می‌توان برای مطالعات اولیه غربال‌گری استفاده نمود.

کل واژگان: آنتی اکسیدان، *Salvia verticillata*، لینولئیک اسید، پراکسیداسیون، DPPH



مقدمه

با اینکه اتیولوژی بسیاری از بیماری‌ها همچنان ناشناخته است، مشاهدات زیادی ثابت می‌کند که واکنش‌های اکسیداسیون ناشی از رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در ایجاد شرایط پاتولوژیک بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های قلبی، نقص کلیوی، دیابت، سرطان، نقص ایمنی و پیری دارند [۱،۲،۳،۴]. به نظر می‌رسد ترکیبات آنتی اکسیدانی غشای سلول‌ها را در مقابل صدمات ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند [۳،۴]. آنتی اکسیدان‌های طبیعی موجود در غذاها و اجزای گیاهی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند چرا که اعتقاد بر این است که دارای اثرات جانبی کمتری هستند [۵]. به همین دلیل مطالعات نسبتاً گسترده بسیاری بر روی ترکیبات آنتی اکسیدانی مختلف موجود در گونه‌های مختلف گیاهان انجام گرفته است [۵،۶،۷].

بررسی انجام شده نشان داد که تاکنون گزارشی در رابطه با فعالیت آنتی اکسیدانی *Salvia verticillata* L. ارایه نشده است. در یک مطالعه اولیه توسط نویسندگان مقاله نشان داده شد که عصاره متانولی گیاه *Salvia verticillata* L. از تیره Labiatae دارای فعالیت آنتی اکسیدانت در مقابل پراکسیداسیون لینولئیک اسید است. این گیاه به صورت وحشی در مناطق مختلف ایران به خصوص تهران، قزوین و مازندران می‌روید. بررسی‌ها نشان داد که بررسی‌های محدودی در ارتباط با خصوصیات فیتوشیمیایی و بیولوژیک این گیاه انجام شده که از آن جمله می‌توان به جداسازی تعدادی ترکیبات فلاونوئیدی و ترپنوئیدی اشاره کرد [۸،۹].

روش‌های متفاوتی برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی در گیاهان گزارش شده است. هر یک از این روش‌ها کاستی‌ها و برتری‌های خود را دارند. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه موردنظر و به کارگیری سه روش متفاوت است تا بتوان به اختلاف نسبی نتایج این روش‌ها پی برد. در روش اول واکنش رادیکال آزاد ۲ و ۲ - دی فنیل -۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) با عصاره بررسی شد [۱۰،۱۱]. در روش دوم، میکروزوم‌های کبد موش صحرایی به عنوان الگوی مطالعه لیپید پراکسیداسیون استفاده شده است [۱۲]. در روش

سوم، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه بر مبنای مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید اندازه‌گیری می‌شود [۱۳]. در یک بررسی دیگر نویسندگان مقاله فعالیت آنتی اکسیدانی ۶۰ گونه گیاهی را با استفاده از روش مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید بررسی کرده‌اند [۱۴].

مواد و روش‌ها

گیاه جمع‌آوری شده

گیاه *Salvia verticillata* L. (تیره Labiatae) از منطقه ولی‌آباد در جاده چالوس، استان مازندران در خرداد سال ۱۳۸۲ جمع‌آوری و توسط بخش هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران شناسایی شد (شماره هرباریوم: 6652-THE). گل‌ها از ساقه و برگ جدا شد و در هوای آزمایشگاه خشک گردید و تا زمان استفاده در ظرف‌های در بسته و دور از نور نگهداری شد.

مواد شیمیایی

لینولئیک اسید، تیوباریتوریک اسید^۱، سدیم دودسیل سولفات^۲ و بوتیلید هیدروکسی تولوئن^۳ از شرکت Merck (Darmstadt, Germany) خریداری شدند. معرف ۱،۳ - دی اتیل -۲- تیوباریتوریک اسید^۴ از شرکت آلد ریچ (Milwaukee, WI, USA) و معرف ۲،۲ - دی فنیل -۱- پیکریل هیدرازیل^۵ و quercetin dihydrate از شرکت فلوکا (Buchs SG, Switzerland) خریداری شدند.

آلبومین سرم گاوی^۶ و معرف Goomassie Brilliant Blue G-250 (از شرکت سیگما، Sigma Steinheim, Germany) خریداری شدند. کلیه مواد و حلال‌های مورد استفاده دیگر از خلوص شیمیایی برخوردار بوده و از شرکت Merck خریداری شدند.

روش تهیه عصاره‌ها

گل‌های خشک گیاه کاملاً پودر شده و مقدار ۱۰۰ گرم آن

¹ TBA

³ BHT

⁵ DPPH

² SDS

⁴ DETBA

⁶ BSA



در ۴۰۰ میلی‌لیتر متانول خیس‌انده و به مدت یک شب در هوای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از آن عصاره جدا و صاف شد و باقی‌مانده به مدت ۳ روز دیگر با همان حلال خیس‌انده شد. عصاره در ۴۰ درجه سانتی‌گراد و در فشار پایین تبخیر شد تا عصاره شربتی شکل به وزن ۲۶/۴ گرم به دست آمد. عصاره متانولی در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب پراکنده شد و به ترتیب با حلال‌های هگزان، کلروفرم و اتیل استات به طور جداگانه مورد استخراج قرار گرفت. حلال‌های استخراجی صاف و تبخیر شدند و به ترتیب مقدار ۲/۵۹، ۰/۶۳، ۲/۷۵ گرم از عصاره هگزانی، کلروفرمی و اتیل استاتی به دست آمد. فاز آبی هم تبخیر شد و مقدار ۱۵/۴۲ گرم عصاره آبی به دست آمد. تهیه عصاره از مخلوط برگ و ساقه با روش فوق انجام شد و به ترتیب مقدار ۲۰/۰۹، ۲/۳۸، ۰/۲۱، ۰/۶۲ و ۱۰/۹۷ گرم عصاره متانولی، هگزانی، کلروفرمی، اتیل استاتی و آبی به دست آمد.

مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از روش Okada & [۱۱] انجام گرفت. به ۲۰ میکرولیتر محلول عصاره با غلظت‌های مختلف (۲-۰/۰۲ mg/ml) مقدار ۳۰ میکرولیتر از محلول اتانولی DPPH (۰/۱ میلی‌مولار) اضافه شد. سپس به آن مقدار ۲/۷ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد اضافه گردید و مخلوط به شدت تکان داده شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در هوای آزمایشگاه قرار داده شد و سپس جذب آن با استفاده از اسپکتروفتومتر در ۵۱۷ nm اندازه‌گیری شد. درصد مهار در مقایسه با یک محلول شاهد که فقط معرف DPPH داشت و عصاره در آن موجود نبود محاسبه گردید. منحنی تغییرات درصد مهار در مقابل لگاریتم غلظت رسم گردید و IC_{50} محاسبه شد. این روش سه بار انجام شد و میانگین نتایج محاسبه گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدان در میکروزوم‌های کبد موش صحرایی

جداسازی میکروزوم‌های کبد موش صحرایی

موش صحرایی نر از جنس Sprague – Dawley به وزن ۳۰۰ - ۲۵۰ گرم از موسسه تحقیقات رازی تهیه شد. پس از

بی‌هوش کردن حیوان با اتر کبد آن خارج گردید. این بافت با سرم فیزیولوژی شسته، قطعه قطعه شد و در دستگاه Potter کاملاً له گردید. بعد از افزودن سرم فیزیولوژی به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰g در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. محلول رویی جدا شده و مجدداً به مدت ۶۰ دقیقه در ۱۰۵۰۰g سانتریفوژ شد. فاز رویی دور ریخته شد و به توده انباشته باقیمانده ۸ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۱ مولار، pH = ۷/۴) اضافه گردید و سوسپانسیون حاصل در حرارت ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. میکروزوم‌های حاصل در طول دو هفته مورد مصرف قرار گرفتند [۱۲]. میزان پروتئین نمونه‌های حاصل با استفاده از روش Bradford اندازه‌گیری شد [۱۵].

مهار لیپیدپراکسیداسیون میکروزومی

لیپیدپراکسیداسیون میکروزومی بر مبنای روش Bahorun et al انجام گرفت [۱۲]. مخلوط واکنش تشکیل شده از ۱۲ میکرولیتر سوسپانسیون میکروزومی (حاوی ۲/۷ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر) در بافر فسفات، ۵۰ میکرولیتر محلول عصاره گیاه در غلظت‌های مختلف (۲-۰/۰۲ mg/ml)، ۱۷۵ میکرولیتر بافر فسفات (pH = ۷/۴، ۰/۱M) و ۲۵ میکرولیتر محلول $FeSO_4$ (۰/۲ مولار) به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از سرد شدن در یخ به مدت ۵ دقیقه، ۵۰ میکرولیتر محلول آبی تری کلرواستیک اسید (۲۰ درصد) اضافه شده و به هم زده شد. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. محلول رویی جدا شده و به مدت ۵ دقیقه در یخ سرد شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر اسیدارتوفسفریک (۳M) اضافه شده، به هم زده شده و به مدت ۶۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. بعد از سرد شدن به مدت ۱۰ دقیقه، ۴ میلی‌لیتر اتیل استات اضافه شده و مواد حاصل از اکسیداسیون استخراج شد. میزان فلورسانس لایه اتیل استاتی در دستگاه اسپکتروفلوریمتر در $\lambda_{ex} = 515nm$ و $\lambda_{em} = 553nm$ خوانده شد. میزان فلورسانس بدون حضور مهارکننده به عنوان ۱۰۰ درصد اکسیداسیون در نظر گرفته شد. با رسم منحنی درصد مهار در مقابل لگاریتم غلظت میزان IC_{50} محاسبه شد.



مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف *S. verticillata* در مقابل پراکسیداسیون لینولئیک اسید بر مبنای روش Furuta et al اندازه‌گیری شد [۱۳]. برای انجام آزمون مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف (۲ mg/ml - ۰/۰۲) با ۲۰ میکرولیتر لینولئیک اسید در اتانول (۲mg/ml) مخلوط گردید و به مدت ۶۰ دقیقه در ۸۰ درصد قرار داده شد. پس از سرد شدن در حمام یخ مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول BHT (۲۰m M)، ۲۰۰ میکرولیتر محلول SDS (۸ درصد) و ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. بعد از مخلوط کردن، مقدار ۳/۲ میلی‌لیتر محلول DETBA (۱/۲mM) در بافر فسفات (۰/۱۲۵M و pH = ۳/۰) در حرارت ۵۰ درجه اضافه گردید و مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس از سرد کردن در حمام یخ، مقدار ۴ میلی‌لیتر اتیل استات اضافه شد و پس از به هم زدن و سانتریفوژ در ۱۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه لایه اتیل استات جدا شد. یک محلول شاهد شامل لینولئیک اسید و ترکیبات دیگر بدون آنتی اکسیدانی به عنوان پراکسیداسیون ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. میزان فلورسانس لایه اتیل استاتی و محلول‌های شاهد در $\lambda_{em}=555nm$ و $\lambda_{ex}=515nm$ در دستگاه اسپکتروفلوریمتر (Schimadzu, Kyoto, Japan) و Model RF- 5000 در مقابل بلانک مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و درصد مهار پراکسیداسیون محاسبه شد [۱۱]. تمامی عصاره‌ها و شاهد سه بار اندازه‌گیری شد و میانگین نتایج محاسبه گردید و با رسم منحنی درصد مهار در مقابل لگاریتم غلظت میزان IC_{50} محاسبه گردید.

محاسبات آماری

مقادیر گزارش شده به صورت $\pm sd$ میانگین است. برای تعیین معنی‌دار بودن اختلاف میانگین داده‌ها از Student's pair T-test استفاده شد.

نتایج

فعالیت مهارکنندگی DPPH

میزان IC_{50} عصاره‌های مختلف گیاه *Salvia verticillata* در مقابل DPPH در جدول شماره ۱ آورده شده است. تمامی عصاره‌ها با افزایش غلظت افزایش فعالیت مهارکنندگی نشان دادند. فعالیت نسبی عصاره‌ها بر مبنای IC_{50} در مورد عصاره گل به ترتیب اتیل استاتی < آبی < متانولی < هگزانی < کلروفرمی است. این فعالیت در مورد عصاره برگ و ساقه به ترتیب اتیل استاتی < آبی < متانولی < هگزانی < کلروفرمی است. اختلاف معنی‌دار بین نتایج به دست آمده برای عصاره‌های آبی و متانولی گل و برگ و ساقه دیده نشد ($p > 0/05$). میزان IC_{50} عصاره‌های اتیل استاتی برگ و ساقه ($IC_{50} = 8.78 \mu g$) در حد IC_{50} برای quercetin ($IC_{50} = 7.16 \mu g$) در این روش است.

لیپد پراکسیداسیون میکروزمی

میکروزوم‌های کبدی الگوی خوبی برای مطالعات لیپید پراکسیداسیون هستند. در جدول شماره ۱ اثر عصاره‌های مختلف گیاه *S. verticillata* بر پراکسیداسیون میکروزوم‌های کبدی دیده می‌شود. فعالیت آنتی اکسیدانی نسبی در این آزمایش بر مبنای مقادیر IC_{50} برای عصاره‌های گل به ترتیب متانولی < آبی < اتیل استاتی < کلروفرمی < هگزانی است. در مورد عصاره‌های برگ و ساقه ترتیب فعالیت به صورت اتیل استاتی < کلروفرمی < هگزانی < متانولی < آبی است. اختلاف معنی‌دار بین فعالیت عصاره‌های هگزانی و کلروفرمی و همچنین عصاره‌های اتیل استاتی و آبی گل دیده نشد. نتایج یکسانی در مورد عصاره‌های متانولی و هگزانی و همچنین عصاره‌های کلروفرمی و اتیل استاتی برگ و ساقه دیده شد ($p > 0/05$). عصاره‌های کلروفرمی ($IC_{50} = 0.31 \mu g$) و اتیل استاتی ($IC_{50} = 0.29 \mu g$) برگ و ساقه در این روش فعالیت بیشتری از quercetin ($IC_{50} = 0.43 \mu g$) نشان می‌دهند.

اثر مهار بر پراکسیداسیون لینولئیک اسید

اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در غشاها به خصوص لینولئیک اسید از ترکیبات حساس به واکنش‌های اکسیداسیون



عصاره‌های کلروفومی و آبی برگ و ساقه دیده نشد ($p > 0.05$).

بحث

نتایج این بررسی نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی گیاه و اجزای جدا شده از آن در روش‌های مختلف می‌باشد. فعال‌ترین بخش، عصاره اتیل استاتی برگ و ساقه است. این عصاره در روش لیپید پراکسیداسیون میکروزومی و مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید فعالیت بیشتر از quercetin و در روش مهارکنندگی DPPH دارای فعالیت معادل quercetin می‌باشد. نتایج متفاوت آنتی‌اکسیدانت برای عصاره با به کارگیری روش‌های مختلف دیده می‌شود. نتایج به دست آمده برای عصاره متانولی گل در روش مهارکنندگی DPPH و روش لیپید پراکسیداسیون میکروزومی متفاوت است. در گزارش‌های دیگری نیز نتایج متفاوت در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان با به کارگیری روش‌های مختلف دیده شده است [۱۶، ۱۷، ۱۸].

است. مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید به عنوان روش با ارزشی جهت تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانت به طور گسترده استفاده می‌شود. در این بررسی، فعالیت عصاره‌های مختلف گیاه *S. verticillata* برای مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید در غلظت‌های مختلف با استفاده از روش Furuta et al انجام گرفت [۱۳]. میزان IC_{50} عصاره‌های گیاه در جدول شماره ۱ آورده شده است. همان‌گونه که در این جدول نشان داده شده است، تمامی عصاره‌ها فعالیت متوسط تا بالایی را نشان می‌دهند. در میان آنها عصاره اتیل استاتی برگ و ساقه ($IC_{50} = 0.01 \mu g$) بیشترین فعالیت را نشان می‌دهد که میزان IC_{50} آن کمتر از میزان IC_{50} برای quercetin ($IC_{50} = 0.08 \mu g$) در این روش می‌باشد. فعالیت نسبی عصاره‌ها بر مبنای IC_{50} در گل به ترتیب متانولی < اتیل استاتی < هگزانی < آبی < کلروفومی می‌باشد. میزان فعالیت عصاره برگ و ساقه به ترتیب اتیل استاتی < متانولی < هگزانی < کلروفومی < آبی می‌باشد. اختلاف معنی‌دار بین فعالیت عصاره‌های متانولی و اتیل استاتی گل و همچنین

جدول شماره ۱ - میزان IC_{50} عصاره‌های مختلف *S. verticillata* با استفاده از سه روش مختلف

عصاره	IC_{50} (μg) مهار DPPH ^a	IC_{50} (μg) لیپیدپراکسیداسیون میکروزومی ^b	IC_{50} (μg) پراکسیداسیون لینولئیک اسید ^c
گل:			
متانولی	۴۵/۲۵±۴/۵۶	۰/۴۹±۰/۱۱	۰/۰۳±۰/۰۰
هگزانی	۴۳۸/۰۶±۱۳/۱۷	۴۰/۳۷±۴/۱۵	۰/۲۸±۰/۰۲
کلروفومی	۱۷۹۶/۱۳± ۳۳/۴۳	۳۱/۲۴± ۱/۸۲	۶۱/۸± ۰/۷۰
اتیل استاتی	۱۵/۸۵± ۱/۵۷	۹/۳۴± ۰/۶۳	۰/۰۵± ۰/۰۱
آبی	۳۷/۸۲±۳/۲۴	۷/۵۲±۰/۷۸	۵/۰۶±۰/۷۵
برگ و ساقه:			
متانولی	۶۴/۴۷±۵/۵۷	۱/۲۸±۰/۲۸	۰/۱۱±۰/۰۲
هگزانی	۲۵۴/۵۷±۱۲/۹۵	۰/۷۵±۰/۰۹	۰/۵۸±۰/۰۸
کلروفومی	۸۰۴/۳۴± ۲۶/۹۱	۰/۳۱± ۰/۰۴	۱/۶۳± ۰/۴۰
اتیل استاتی	۸/۷۸± ۰/۹۶	۰/۲۹± ۰/۰۶	۰/۰۱± ۰/۰۰
آبی	۵۵/۷۵±۷/۷۵	۳۱/۱۶±۱/۹۵	۲/۰۷±۰/۲۵
Quercetin	۷/۱۶±۰/۱۹	۰/۴۳±۰/۰۴	۰/۰۸±۰/۰۰

a فعالیت مهارکنندگی در مقابل ۱۱۸/۳ میکروگرم DPPH در محیط واکنش

b فعالیت آنتی‌اکسیدان در مقابل نمونه میکروزومی حاوی ۳۲/۴ میکروگرم پروتئین در محیط واکنش

c فعالیت آنتی‌اکسیدان در مقابل ۴۰ میکروگرم لینولئیک اسید در محیط واکنش



بنابراین در انتخاب روش مناسب باید برنامه ریزی آگاهانه تری با در نظر گرفتن این عوامل انجام گیرد. روش های ذکر شده در این مطالعه با توجه به سادگی و در دسترس بودن معرف ها و وسایل می تواند به عنوان یک روش غربالگری روتین برای تعداد زیاد نمونه مورد استفاده قرار گیرد. از طرف دیگر تناقض نتایج به دست آمده در روش های متفاوت مشوق انتخاب مجموعه ای از روش ها برای دستیابی به نتایج مستدل می باشد.

تناقض در نتایج به دست آمده می تواند در ارتباط با تنوع ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان، مکانیزم مختلف واکنش آنها و کینتیک متفاوت واکنش های مهاری آنها در روش های انتخابی باشد. عوامل دیگری مانند اتصال به آهن در تست های پراکسیداسیون که توسط Fe^{2+} القا می شوند نیز می تواند بر نتایج تاثیرگذار باشد. ظرفیت آنتی اکسیدانی اندازه گیری شده یک نمونه در ارتباط با روش به کار برده شده و منبع تولید رادیکال آزاد یا عامل اکسیدکننده به کار برده شده می باشد.

منابع

1. Noguchi N and Niki E. Phenolic antioxidants: A rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. *Free Rad. Biol. Med.* 2000; 28 (10): 1538-46.
2. Young IS and Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol* 2001; 54: 176-86.
3. Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet* 2000; 355: 1179-80.
4. Maxwell SRJ. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 1995; 49(3): 345-61.
5. Veliloglu YS, Mazza G, Gao L and Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46: 4113-17.
6. Gazzani G, Papetti A, Massolini G and Daglia M. Anti and prooxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect of thermal treatment. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46: 4118-22.
7. Larson RA. The antioxidants of higher plants. *Phytochem.* 1988; 27 (4): 969-78.
8. Ulubelen A and Topcu G. Flavonoids and terpenoids from *Salvia verticillata* and *Salvia pinnata*. *J. Natural Products* 1984; 47 (6): 1068-1069.
9. Janicsak G and Mathe I. Parallel determination of rosmarinic and caffeic acids by TLC-densitometry. *Chromatographia* 1997; 46(5/6), 322-324.
10. Hsiao G, Teng CM, Wu CL and Ko FN. Merchantin H as a natural antioxidant and free radical scavenger. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996; 334 (1): 18 – 26.
11. Okada Y and Okada M. Scavenging effect of water soluble proteins in broad beans on free radicals and active oxygen species. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46 (2): 401- 6.
12. Baborun T, Trotin F, Pommery J, Vasseur J and Pinkas M. Antioxidant activities of *Crataegus mongyna* extracts. *Planta Med.* 1994; 60: 323 – 28.
13. Furuta S, Nishiba y and Suda I. Fluorometric assay for screening antioxidative activity of vegetables. *J. Food Sci.* 1997; 62 (3): 526 – 28.
14. Souri E, Amin Gh, Dehmobed-Sharifabodi A, Nazifi A, Farsam H. Antioxidant activity of sixty plants from Iran. *IJPR* 2004; 3:55-59.
15. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248 – 54.
16. Kim BJ, Kim JH, Kim HP and Heo MY. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): antioxidative activity and free radical scavenging activity. *Int. J. Cosmetic Sci.* 1997; 19: 299-307.
17. Deighton N, Brennan R, Finn Ch and Davies HV. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *J. Sci. Food Agric.* 2000; 80: 1307-13.
18. Lee SE, Hwang HJ, Ha JS, Jeong HS and Kim JH. Screening of medicinal plants for antioxidant activity. *Life Sci.* 2003; 73: 167-79.

