

مطالعه ترکیبات شیمیایی اسانس رازیانه و بررسی قدرت ضد اکسایشی و سمیت سلولی آن

بهروز علیزاده بهبهانی^{1*}، محمد نوشاد¹، فرشته فلاح²

1- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

2- دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: 99/02/10 تاریخ پذیرش: 99/04/07)

چکیده

با توجه به استفاده گسترده از نگهدارنده های شیمیایی جهت افزایش عمر نگهداری مواد غذایی و شیوع سرطان های روده بزرگ انسان، تقاضا برای مواد دارویی و نگهدارنده طبیعی و ایمن افزایش یافته است. بنابراین، این مطالعه با هدف ارزیابی پتانسیل آنتی اکسیدانی و سیتوتوکسیک اسانس رازیانه که کاربرد گسترده ای در طب سنتی ایران کاربرد دارد انجام گردید. در این مطالعه، اسانس رازیانه با استفاده از روش تقطیر با آب استخراج و ترکیبات شیمیایی آن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی و طیف بینی فرسرخ تبدیل فوریه از لحاظ کمی و کیفی شناسایی شدند. مقدار فنول و فلاوونوئید اسانس نیز اندازه گیری و فعالیت آنتی اکسیدانی آن (مهار رادیکال های آزاد DPPH و ABTS و زوال رنگ محلول بتا-کاروتن/لینولئیک اسید) بررسی گردید. اثر سیتوتوکسیک اسانس رازیانه بر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) توسط آزمون MTT بررسی شد. آنتولبا 75/61 درصد ترکیب شیمیایی اصلی اسانس رازیانه بود و پیک های جذبی آن نیز در اعداد موجی 1244 و 840 بر سانتی متر ظاهر شدند. محتوای فنول و فلاوونوئید اسانس رازیانه نیز به ترتیب معادل 12/87 mg GAE/g و 39/67 mgQE/g به دست آمد. ظرفیت آنتی اکسیدانی اسانس بر اساس فعالیت مهار رادیکال DPPH، رادیکال ABTS و زوال رنگ محلول بتا-کاروتن/لینولئیک اسید به ترتیب 26/68، 39/57 و 32/38 درصد گزارش شد. اثر سیتوتوکسیک اسانس بر سلول های سرطانی روده بزرگ تابع غلظت بود. اسانس رازیانه قابلیت استفاده به عنوان ترکیبی طبیعی جهت جلوگیری از اکسیداسیون محصولات غذایی و شیوع سرطان روده بزرگ را دارا می باشد.

کلید واژگان: اسانس رازیانه، آنتی اکسیدان طبیعی، ترکیبات شیمیایی، سرطان روده بزرگ، اثر سیتوتوکسیک.

1- مقدمه

افزایش عمر نگهداری محصولات غذایی در کنار ایمنی و سلامت آن‌ها از دغدغه‌های مهم جوامع انسانی می‌باشند. امروزه بطور گسترده‌ای از نگهدارنده‌های شیمیایی مختلف جهت افزایش عمر نگهداری انواع محصولات غذایی استفاده می‌شود. اما بدلیل اثرات سمی و نامطلوب این نگهدارنده‌های سنتزی بر سلامت انسان، تقاضا برای مواد نگهدارنده طبیعی و ایمن افزایش یافته است. در دهه‌های اخیر، توجه ویژه‌ای به اسانس‌های گیاهی شده است که این امر ناشی از ایمن بودن و ویژگی‌های بیولوژیکی مثبت آن‌ها از قبیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد التهابی و ضد سرطانی می‌باشد [1]. اسانس‌ها دسته‌ای از مواد تشکیل‌دهنده زیست فعال و ارزشمند در گیاهان به شمار می‌روند که جهت معطر ساختن محصولات غذایی، فرآورده‌های دارویی، آرایشی و بهداشتی، در صنایع عطرسازی، در تهیه ادویه‌جات و درمان بعضی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. ایمن بودن اسانس‌های گیاهی، فایده اصلی استفاده از آن‌ها در بسیاری از محصولات غذایی می‌باشد [2].

رازیانه یا بادیان سبز با نام علمی *Foeniculum vulgare*، گیاهی گلدار، دو یا چند ساله، از راسته آپیالس، تیره چتریان و سرده رازیانه‌ها است که تمامی قسمت‌های آن معطر بوده و معمولاً دانه‌های کوچک یا میوه آن بیشترین کاربرد را دارا می‌باشند. رازیانه در طب سنتی ایران بعنوان ماده‌ای ضد التهاب، بادشکن، خلط‌آور، ضد اسپاسم، مدر، ملین و ضد درد مورد استفاده قرار گرفته است. در صنایع غذایی، از رازیانه بعنوان عامل طعم‌دهنده در شکلات استفاده می‌شود [3]. مطالعات مختلفی در مورد اسانس رازیانه انجام شده است و تفاوت در غلظت نسبی ترکیبات اسانس آن به مناطق جغرافیایی، روش‌های استخراج، مراحل رشد و بخش‌های مختلف گیاه نسبت داده شده است. علاوه بر این، فعالیت محافظت از کبد، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد دیابتی، ضد سرطانی، ضد قارچی و ضد باکتریایی اسانس رازیانه در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است [4]. نتایج مطالعاتی که روی ترکیب اسانس رازیانه انجام شده است نشان می‌دهد که ترکیبات فرار اصلی بدست آمده عبارتند از آنتول¹، استراگول²، لیمون³

1. Anethole
2. Estragole
3. Limonene

فنچون⁴ [5].

سرطان بعنوان یکی از مهم‌ترین دلایل مرگ‌ومیر در سراسر جهان به شمار می‌رود و تنها پیشرفت اندکی در کاهش عوارض مرگ‌ومیر این بیماری انجام شده است. سرطان روده بزرگ سومین سرطان شایع در هر دو جنس مرد و زن بوده که با پولیپهای آدنومای خوش خیم شروع می‌گردد. در صورتیکه این مرحله از بیماری به موقع تشخیص داده شود با عمل جراحی کاملاً قابل درمان خواهد بود. اما در صورت عدم درمان به موقع به آدنومای پیشرفته با درجه دیسپلازی بالا تبدیل و سپس به شکل سرطان بدخیم تکامل پیدا می‌کند [6]. اثر سمی اسانس‌های گیاهی بر سلول‌های سرطانی روده بزرگ در مطالعات مختلف گزارش شده است و بنابراین قابلیت استفاده بعنوان ترکیبات ضد سرطانی طبیعی در کاهش انواع سرطان‌های روده بزرگ را دارا می‌باشند [7].

با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثر سیتوتوکسیک اسانس رازیانه بر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) انجام نشده است، هدف از این مطالعه استخراج اسانس رازیانه و بررسی سمیت آن بر سلول‌های فوق بود. علاوه بر این، ترکیبات مؤثره، ساختار شیمیایی، محتوای فنول و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس رازیانه نیز بررسی گردید.

2- مواد و روش‌ها

2-1- تهیه گیاه و استخراج اسانس

گیاه رازیانه از عطاری شهر اهواز (استان خوزستان) خریداری و نام علمی آن در آزمایشگاه دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تأیید گردید. اسانس گیری با روش تقطیر با آب انجام گردید. بدین ترتیب که پس از آسیاب و الک کردن گیاه 50 گرم از آن به 750 میلی‌لیتر آب مقطر در دستگاه کلونجر اضافه شد. اسانس گیری به مدت 3 ساعت طول کشید. اسانس حاصل جهت انجام آزمون‌ها در ظرف تیره رنگی درون یخچال (دمای 4 درجه سلسیوس) نگهداری شد [3].

2-2- شناسایی کیفی و گروه‌های عامل

ترکیبات اسانس با تکنیک طیف‌بینی فروسرخ

تبدیل فوریه

4. Fenchone

اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$100 \times \left[\frac{A_{\text{شاهد}} - A_{\text{نمونه}}}{A_{\text{شاهد}}} \right] = \text{فعالیت مهارکنندگی (\%)}$$

از متانول بجای نمونه جهت تهیه شاهد استفاده گردید. از روش Shan و همکاران [10] با اصلاحات مورد نیاز جهت بررسی فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS اسانس رازیانه استفاده گردید. بطور خلاصه، ابتدا محلول رادیکالی غلیظ ABTS (7 میلی مولار) با استفاده از پتاسیم پرسولفات (2/45 میلی مولار) رقیق و در دمای اتاق در شرایط تاریکی قرار داده شد. در ادامه، محلول کاتیونی رادیکال ABTS تا رسیدن به جذب 0/7 در طول موج 734 نانومتر رقیق گردید. سپس 100 میکرولیتر از اسانس یا کنترل (متانول) با 3/9 میلی لیتر محلول رادیکالی مخلوط و جذب محلول بعد از 6 دقیقه گرمخانه گذاری اندازه گیری شد. فعالیت مهارکنندگی در نهایت با کمک فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times \left[\frac{A_{\text{کنترل}} - A_{\text{نمونه}}}{A_{\text{کنترل}}} \right] = \text{فعالیت مهارکنندگی (\%)}$$

از روش اسپکتروفوتومتری به منظور پایش زوال رنگ محلول بتا-کاروتن/لینولئیک اسید در حضور اسانس رازیانه استفاده گردید. جذب محلول در 490 نانومتر و بعد از 120 دقیقه گرمخانه گذاری (A₁₂₀) در برابر نمونه کنترل در زمان صفر (C₀) و بعد از 120 نگهداری (C₁₂₀) اندازه گیری شد. اثر بازدارندگی سپس بصورت زیر بدست آمد [11]:

$$100 \times \left[\frac{(A_{120} - C_{120})}{(C_0 - A_{120})} \right] = \text{اثر بازدارندگی (\%)}$$

2-5- اندازه گیری فنول کل اسانس رازیانه

در این روش بطور خلاصه، مقدار 1 میلی لیتر محلول فنول با 200 میکرو لیتر اسانس مخلوط و محلول حاصله به مدت 6 دقیقه در مکان تاریک نگهداری شد. در مرحله بعد، 2 میلی لیتر از محلول کربنات سدیم 7 درصد به آن اضافه و بعد از نگهداری به مدت 120 دقیقه، جذب محلول در طول موج 765 نانومتر اندازه گیری شد. سپس مقدار فنول کل اسانس با کمک منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه گردید و برحسب mg gallic acid equivalent (GAE)/g گزارش شد [12].

2-6- اندازه گیری فلاونوئید کل اسانس رازیانه

به منظور اندازه گیری مقدار فلاونوئید کل، مقدار 500 میکرولیتر از اسانس یا کوئرستین (صفر-0/5 میلی گرم در میلی لیتر) با 300 میکرولیتر از محلول 5 درصد نیتريت سدیم مخلوط و محلول به مدت 6 دقیقه همزده شد. سپس 300

شناسایی کیفی اسانس و گروه های عاملی ترکیبات تشکیل دهنده آن با استفاده از تکنیک طیف بینی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR) صورت پذیرفت. پودر اسانس رازیانه ابتدا با پتاسیم بروماید ترکیب و سپس با استفاده از دستگاه پرس به قرص تبدیل شد. طیف اسانس با کمک دستگاه اسپکترومتر (Thermo Nicolet، مدل Avatar370، ساخت آمریکا) و در محدوده عدد موجی 4000-500 بر سانتی متر ثبت گردید [7].

2-3- شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس با

استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل

به طیف سنج جرمی

شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات اسانس رازیانه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (Agilent Technologies 5975C، ساخت آمریکا) صورت پذیرفت. برای این منظور، مقدار یک میکرولیتر از اسانس رازیانه به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق گردید. دمای ستون (مدل HP-5، Agilent Technologies Inc.)، MS، ساخت آمریکا؛ طول 30 متر؛ قطر داخلی 0/25 میلی متر؛ ضخامت 0/25 میکرومتر) از 45 درجه سلسیوس به 210 درجه سلسیوس با سرعت 3 درجه سلسیوس در هر دقیقه افزایش یافت. پس از بدست آوردن کروماتوگرام، شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات تشکیل دهنده اسانس رازیانه با کمک طیف جرمی استاندارد و با مقایسه شاخص کواتسان ها با مقادیر استاندارد مشخص شد [8].

2-4- تعیین فعالیت ضد اکسایشی اسانس

رازیانه

فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس رازیانه با استفاده از سه روش آنتی اکسیدانی مهار رادیکال آزاد DPPH، رادیکال آزاد ABTS و رنگبری بتا-کاروتن/لینولئیک اسید انجام گردید.

ظرفیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH اسانس رازیانه مطابق با روش Behbahani و همکاران [9] با کمی اصلاحات صورت پذیرفت. برای این منظور، 1 میلی لیتر اسانس با 3 میلی لیتر محلول متانولی DPPH ترکیب و سپس مخلوط حاصله به مدت 30 دقیقه در مکان تاریک و در دمای محیط گرمخانه گذاری گردید. در مرحله بعد، جذب محلول در طول موج 517 نانومتر قرائت شد و فعالیت مهارکنندگی بر

محیط کشت به آرامی جداسازی و با 200 میکرولیتر DMSO جایگزین گردید. در ادامه، جذب مخلوط با کمک دستگاه الایزا ریدر در 570 نانومتر قرائت گردید و منحنی زنده‌مانی سلول در برابر غلظت‌های مختلف اسانس رازیانه رسم شد.

2-8- آنالیز آماری

نتایج به دست از آزمون‌ها با کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه و با کمک نرم‌افزار SPSS (نسخه 18) تجزیه و تحلیل شد. از آزمون دانکن در سطح احتمال 5 درصد جهت مقایسه میانگین استفاده شد. لازم به ذکر است که تمامی آزمون‌ها حداقل 3 مرتبه تکرار شدند.

3- نتایج و بحث

ترکیبات شناسایی شده در اسانس رازیانه به‌مراه زمان بازداری، شاخص کوتاس و درصد آن‌ها در جدول 1 گزارش شده است. بطور کلی، 4 ترکیب در اسانس رازیانه شناسایی شدند که 99/99 درصد کل اسانس استخراج شده را تشکیل می‌دادند. مشخص گردید که anethole با 75/61 درصد ترکیب اصلی اسانس رازیانه بود و سایر ترکیبات شناسایی شده به ترتیب fenchone (13/29 درصد)، limonene (6/39 درصد) و estragole (4/7 درصد) بودند. فراوانی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس در محور عمودی کروماتوگرام و زمان جداسازی و شناسایی هر ترکیب در محور افقی مشخص شده‌اند (شکل 1). لازم به ذکر است که از شاخص بازداری کوتاس (جدول 1) برای تأیید شناسایی‌های انجام شده توسط طیف جرمی استفاده شد.

میکرولیتر از محلول 10 درصد آلومینیوم نیترات به آن اضافه و به مدت 6 دقیقه مجدداً همزده شد. در مرحله بعد، 2 میلی‌لیتر سود 2 مولار اضافه شد و جذب محلول در 510 نانومتر قرائت گردید. مقدار فلاوونوئید کل سپس با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه و برحسب mg quercetin equivalent (QE)/g اسانس گزارش گردید [13].

2-7- بررسی سمیت سلولی اسانس رازیانه بر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) با

استفاده از روش MTT

اثر سیتوتوکسیک اسانس رازیانه بر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) با استفاده از روش MTT مطابق با مطالعه Behbahani و همکاران [7] بررسی گردید. سلول‌های سرطانی در محیط DMEM با گلوکز بالا و غنی شده با سرم جنین گوساله (10 درصد حجمی/حجمی) و پنسیلیوم/استرپتومایسین، کشت و سپس در دمای 37 درجه سلسیوس تحت رطوبت ثابت 95 درصد و فشار 5 درصد دی‌اکسید کربن گرمخانه گذاری شدند. سپس سلول‌ها به پلیتهای 96 خانه‌ای (تقریباً 100 هزار سلول به ازای هر چاهک) انتقال و تا رسیدن به 50-60 درصد چسبیدن گرمخانه گذاری گردیدند. در ادامه، محیط کشت با محیط تازه حاوی DMEM و سرم جنین گاوی (200 میکرولیتر) جایگزین و سپس غلظت‌های مختلف اسانس رازیانه به هر چاهک اضافه گردید. تکثیر سلول توسط آزمون MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) و بعد از 24 ساعت گرمخانه گذاری بصورت زیر تعیین مقدار شد. 30 میکرولیتر از محلول MTT (5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه و پلیت به مدت 3 ساعت در انکوباتور مجهز به دی‌اکسید کربن گرمخانه گذاری شد. سپس

Table 1 Chemical constituents of *Foeniculum vulgare* essential oil

No.	Compound	KI	Retention time (min)	%
1	Limonene	1030	13.43	6.39
2	Fenchone	1087	16.25	13.29
3	Estragole	1196	20.48	4.7
4	Anethole	1302	23.56	75.61
Total				99.99

KI: the Kovats retention indices relative to C8-C20 n-alkanes were determined on DB5 capillary column.

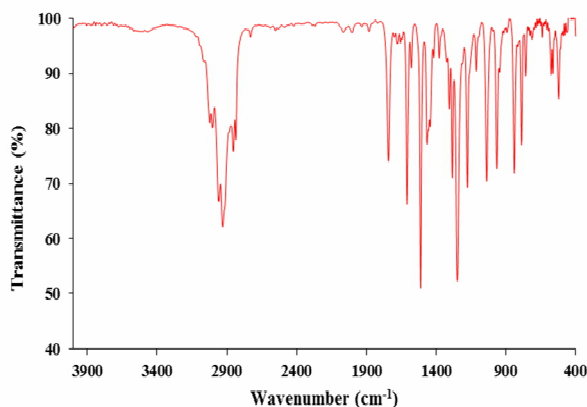


Fig 2 The FTIR spectrum of *Foeniculum vulgare* essential oil.

محتوای فلاونوئید کل اسانس معادل $0/54 \pm 39/67$ mg QE/g بدست آمد. اسانس رازیانه دارای فعالیت اکسیدانی قابل توجهی بود؛ بطوریکه فعالیت مهار رادیکال DPPH، رادیکال ABTS و زوال رنگ محلول بتا-کاروتن/لینولئیک اسید به ترتیب برابر با $0/36 \pm 26/68$ ، $0/67 \pm 39/57$ و $0/79 \pm 32/38$ درصد گزارش شد.

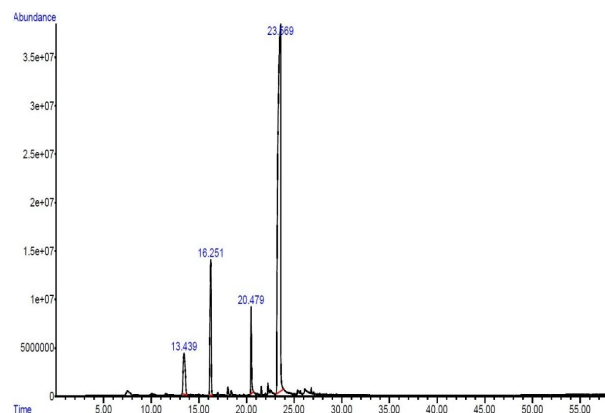


Fig 1 The chromatogram of *Foeniculum vulgare* essential oil.

طیف FTIR اسانس رازیانه در شکل 2 مشخص شده است. پیک‌های قرار گرفته در اعداد موجی 1510، 1608، 3003، 1247، 1465 و 964 بر سانی مترمؤید حضور گروه‌های عاملی ترکیبات اسانس‌های گیاهی و بویژه anethole می‌باشند. نتایج مقدار فنول و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس رازیانه در جدول 2 آورده شده است. فنول کل اسانس رازیانه برابر با $12/87 \pm 0/58$ mg GAE/g بود.

Table 2 The total phenolic content, total flavonoids content and antioxidant activity of *Foeniculum vulgare* essential oil

Antioxidant activity (%)			Total flavonoid content (mg QE/g)	Total phenolic content (mg GAE/g)
β -carotene-linoleic acid assay	ABTS	DPPH		
32.38 ± 0.79	39.57 ± 0.67	26.68 ± 0.36	39.67 ± 0.54	12.87 ± 0.58

استخراج و سپس ترکیبات تشکیل‌دهنده آن از طریق روش‌های مختلف کیفی و کفی و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن تعیین گردید.

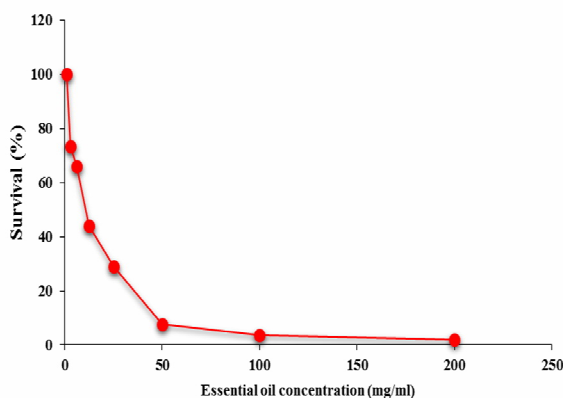


Fig 3 Cytotoxic activity of *Foeniculum vulgare* essential oil on colon cancer cell lines (HT29) by MTT assay.

اثر سیتوتوکسیک غلظت‌های مختلف اسانس رازیانه بر رده سلولی سرطان روده بزرگ بعد از 24 ساعت واکنش در شکل 3 آورده شده است. بیشترین درصد زنده‌مانی سلول (100 درصد) در غلظت پایین اسانس (1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مشاهده شد و افزایش غلظت اسانس سبب کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی گردید؛ بطوریکه غلظت 200 میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسانس سبب بیشترین تأثیر (2/06 درصد زنده‌مانی) بر سلول‌های سرطانی روده بزرگ شد.

با توجه به افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان نسبت به عوارض مواد شیمیایی و سنتزی در انسان‌ها، امروزه پژوهشگران صنعت غذا به استفاده از گیاهان دارویی جهت کنترل اکسیداسیون محصولات غذایی و افزایش عمر نگهداری آن‌ها علاقه‌مند شده‌اند. بنابراین، با توجه به پتانسیل بالای رازیانه جهت ایجاد عطر و طعم در مواد غذایی و درمان بسیاری از بیماری‌ها، اسانس این گیاه دارویی با استفاده از روش تقطیر با آب

رازیانه می‌باشند [18]. پیک‌های قرار گرفته در اعداد موجی 2847 و 2937 بر سانتی‌متر ممکن است ناشی از الگوی غیرمتمقارن فرکانس گروه‌های CH_2 و CH_3 ترکیبات الکلی در اسانس باشند. همچنین، پیک در 1234 بر سانتی‌متر احتمالاً مربوط به کشش متمقارن پیوند C-O-C در اسید استرهای آروماتیک و ارتعاش کششی گروه C-OH ترکیبات فنولی می‌باشد. لازم به ذکر است که ارتعاشات کششی پیوندهای C-O و ارتعاش تغییر شکل‌گروه‌های C-OH در اعداد موجی 1122 و 1035 بر سانتی‌متر، ارتعاشات خمشی گروه‌های C-H در عدد موجی 992 بر سانتی‌متر، ارتعاشات جذبی پیوندهای $\text{CH}=\text{CH}$ حلقه‌های بنزنی در عدد موجی 743 بر سانتی‌متر و ارتعاشات جذبی آلکانها در عدد موجی 645 بر سانتی‌متر تأیید کننده حضور گروه‌های عاملی ترکیبات مؤثره اسانس‌ها می‌باشند [7].

فنولها و فلاونوئیدها یکی از مهم‌ترین گروه‌های ترکیبات با فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تشکیل می‌دهند که اثرات درمانی و حفاظتی مختلفی بر بدن انسان دارند و گزارش شده است که گیاهان دارویی منبع مناسبی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشند [19]. محتوای فنول و فلاونوئید کل اسانس رازیانه به ترتیب برابر با $39/67 \pm 0/54 \text{ mg QE/g}$ و $12/87 \pm 0/58 \text{ GAE/g}$ بود. نتایج متفاوتی توسط سایر محققین گزارش شده است. مقدار فنول کل $6/59$ ، $15/69$ و $0/15 \text{ mg GAE/g}$ و فلاونوئید کل $2/45 \text{ mg QE/g}$ در مطالعات مختلف بدست آمده است [20-22]. این تفاوت‌ها به عوامل اقلیمی مؤثر بر رشد گیاه مانند آب، هوا، خاک و ارتفاع و همچنین به عوامل دیگری مانند روش‌های متنوع اندازه‌گیری ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی مرتبط می‌باشند [23]. ترکیبات فنولی عمده گیاه رازیانه عبارتند از 3-کافئول کوئینیک اسید، 4-کافئول کوئینیک اسید، ۱،۵-دی کافئول کوئینیک اسید، مشتقات هیدروکسیل سینامیک اسید و رزماریک اسید و از مهم‌ترین ترکیبات فلاونوئیدی رازیانه می‌توان به روتین، کوئرستین، ایزوکوئرستین، کوئرستین-3-گالاکتوزید، کامپفرول-3-روتینوزید و کامپفرول-3-گالاکتوزید اشاره نمود [24].

باتوجه به اینکه ترکیبات زیست فعال گیاهان دارویی دارای جنبه‌های واکنش‌پذیری پیچیده‌ای می‌باشند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی‌ها را نمی‌توان تنها با یک آزمون ساده بررسی

با مقایسه نتایج ترکیبات شناسایی شده در اسانس رازیانه با مطالعات پیشین، هرچند اجزای اصلی اسانس تا حدودی مشابه با یافته‌های سایر محققین بود، اما تفاوت‌هایی بویژه در غلظت ترکیبات وجود داشت. Diao و همکاران [5] ترکیبات شیمیایی اسانس رازیانه را مورد مطالعه قرار دادند و نتایج این محققین نشان داد که limonene, estragole, anethole و fenchone به ترتیب با 6/24، 10/42، 68/53 و 5/45 درصد ترکیبات اصلی اسانس می‌باشند. در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده اسانس رازیانه به ترتیب عبارتند بودند از: anethole (75/83 درصد)، limonene (5/67 درصد)، estragole (4/56 درصد)، p-Anis aldehyde (3/99 درصد) و fenchone (2/82 درصد) [14] Mimica - Dukić و همکاران [15] گزارش نمودند که anethole با 74/18 درصد اصلی‌ترین ترکیب شیمیایی در اسانس رازیانه می‌باشد و fenchone، estragole و limonene به ترتیب رتبه‌های بعدی را بخود اختصاص دادند. تفاوت در میزان ترکیبات اصلی اسانس رازیانه می‌تواند ناشی از مناطق جغرافیایی، واریته‌های کشت شده، مرحله برداشت گیاه، روش‌های استخراج و شرایط آنالیز مختلف اسانس باشد [5]. لازم به ذکر است که anethole، estragole و fenchone بعنوان مونوترپن‌های اکسیژن‌دار و limonene بعنوان مونوترپن هیدروکربنی شناخته می‌شوند [16].

از تکنیک FTIR نیز جهت شناسایی کیفی اسانس رازیانه استفاده گردید (شکل 2). پیک‌های جذبی در 1608، 3003، 1510، 1465، 1247، 964 و 840 بر سانتی‌متر مؤید حضور گروه‌های عاملی ترکیبات مؤثره اسانس‌های گیاهی می‌باشند. پیک‌های جذبی شاخص anethole، بعنوان اصلی‌ترین ترکیب اسانس رازیانه، در اعداد موجی 1244 و 840 بر سانتی‌متر ظاهر شدند که به ترتیب مربوط به $\nu(\text{C-O-C})$ و $\delta(\text{H})$ موقعیت‌های پارای حلقه بنزنی anethole می‌باشند [17]. محدوده عدد موجی 3003-2835 به ارتعاشات کششی پیوندهای CH نسبت داده شده است. علاوه بر این، پیک‌های ظاهر شده در اعداد موجی 1741 بر سانتی‌متر مربوط به $\text{C}=\text{CH}$ حلقه فنیل، 1510 و 1464 بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاش کششی $\text{C}=\text{C}$ حلقه آروماتیک و محدوده 1000-675 بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاشات خمشی باندهای CH اسانس

نمود و توصیه شده است که حداقل از دو آزمون آنتی‌اکسیدانی مختلف جهت تعیین و صحت فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی استفاده گردد [25]. به همین دلیل، در این پژوهش از سه روش آنتی‌اکسیدانی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، رادیکال آزاد ABTS و زوال رنگ محلول بتا-کاروتن لینولیک اسید استفاده شد. آزمون DPPH قابلیت اسانس در اهدای هیدروژن به رادیکال آزاد DPPH که سبب زوال رنگ محلول DPPH می‌شود را اندازه‌گیری می‌کند و قدرت رنگبری بالاتر بیانگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر می‌باشد [26]. در آزمون ABTS، رنگ سبز-آبی محلول کاتیونی رادیکال ABTS در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها زوال می‌یابد و کاهش رنگ با جذب محلول در 734 نانومتر پیش می‌گردد. احیای مستقیم از طریق انتقال الکترون و خنثی‌سازی رادیکال از طریق انتقال اتم هیدروژن از مکانیسم‌های اثبات شده ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در خنثی‌سازی رادیکال‌های ABTS می‌باشند [27]. در آزمون آنتی‌اکسیدانی مهار زوال رنگ محلول بتا-کاروتن/لینولیک اسید، حذف یک اتم هیدروژن از گروه متیلنی دی‌آلیلیک لینولیک اسید منجر به تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود که به مولکول بتا-کاروتن حمله کرده و از بین رفتن رنگ آن را سبب می‌شوند. سرعت زوال رنگ بتا-کاروتن در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها که قادر به خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد (هیدروپراکسید) تولید شده از لینولیک اسید می‌باشند، کاهش می‌یابد [28]. نتایج این پژوهش تا حدودی مشابه یافته‌های سایر محققین بود. Viuda-Martos و همکاران [20] گزارش نمودند که اسانس رازیانه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی برابر با 15/07 درصد بر پایه مهار رادیکال آزاد DPPH و 40/85 درصد بر پایه مهار رادیکال آزاد ABTS می‌باشد. Anwar و همکاران [29] با بررسی مراحل مختلف رشد گیاه رازیانه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آن، گزارش کردند که اسانس حاصل از میوه‌های نارس، نیمه-رسیده و رسیده گیاه رازیانه به ترتیب دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی 55/3، 65/4 و 66/8 درصد بر پایه مهار زوال رنگ محلول بتا-کاروتن/لینولیک اسید می‌باشد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای 81/64 درصد (بر پایه مهار رادیکال‌های آزاد DPPH) اسانس رازیانه در مطالعه‌ای دیگر نیز گزارش شده است [30]. تفاوت در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس رازیانه در این پژوهش و سایر مطالعات ممکن است ناشی از اختلاف در غلظت ترکیبات فنولی،

فلاوونوئیدی و اجزای اصلی تشکیل‌دهنده اسانس استخراجی باشد؛ بطوریکه گزارش شده است که anethole و estragole ترکیبات اصلی مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی حاوی آن‌ها می‌باشند [30]. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس رازیانه عمدتاً ناشی از حضور anethole می‌باشد که قادر است رادیکال‌های آزاد را از طریق انتقال الکترون یا هیدروژن خنثی سازد. به این ترتیب، اسانس رازیانه قابلیت استفاده بعنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی جهت کنترل فرایند اکسیداسیون در فرآورده‌های غذایی (بویژه روغن‌های خوراکی) و همچنین جلوگیری از صدمات ناشی از رادیکال‌های آزاد در بدن انسان را دارا می‌باشد.

اسانس رازیانه اثر سیتوتوکسیک وابسته به غلظت بر رده سلولی سرطان روده بزرگ داشت و غلظت‌های بالاتر اسانس اثر سیتوتوکسیک بالاتری نشان دادند (شکل 3). اسانس‌های گیاهی دارای ماهیت آبگریز و تمایل زیاد به برهمکنش با غشاهای سلولی می‌باشند. در این حالت، اسانس قادر به ایجاد تغییر در قطبیت سلول سرطانی (بویژه غشاهای میتوکندری)، کانال‌های یونی و اختلال در پتانسیل غشا و در نتیجه جلوگیری از عملکرد پمپ‌های پروتونی و تولید ATP هستند. علاوه بر این، پمپ‌های یونی غشایی ممکن است در حضور اسانس‌های گیاهی تخریب شوند که این حالت منجر به نشت یون (کلسیم) و پروتئین‌های غشایی می‌شود [7]. Sharopov و همکاران [31] اثر سیتوتوکسیک اسانس رازیانه را بر رده سلولی سرطان‌های HeLa، Caco-2، MCF-7، CCRF-CEM و CEM/ADR5000 بررسی و بیان نمودند که اثر سیتوتوکسیک اسانس عمدتاً ناشی از ماهیت آبگریزی آن و ویژگی آلکیل‌کنندگی ترکیب اصلی آن، یعنی anethole می‌باشد. علاوه بر این، مشخص شد که مورفولوژی و یکپارچگی غشای سلول‌های سرطانی تحت تأثیر اسانس رازیانه قرار می‌گیرند. اثر سیتوتوکسیک anethole در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است. بطور مثال، گرمخانه‌گذاری هپاتوسیتها با anethole سبب مرگ سلولی و از بین رفتن ATP سلولی و منابع نوکلئوتید آدنین گردید [32]. همچنین، anethole فعالیت آپوپتوتیک نشان می‌دهد و قادر به ایجاد صدمه در DNA می‌باشد [33]. با توجه به نتایج مطالعات مختلف، اثر سیتوتوکسیک اسانس رازیانه در این پژوهش را می‌توان به ترکیب اصلی تشکیل‌دهنده آن یعنی anethole نسبت داد.

4- نتیجه گیری

در این مطالعه، اسانس رازیانه غنی از ترکیبات زیست فعال، بویژه anethole (75/61 درصد)، با استفاده از روش استخراج تقطیر با آب تولید گردید. بر اساس آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH، رادیکال آزاد ABTS و جلوگیری از زوال رنگ محلول بتا-کاروتن/لینولئیک اسید، مشخص گردید که اسانس استخراجی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی برخوردار است. حضور گروه‌های عاملی ترکیبات زیست فعال در اسانس رازیانه نیز با استفاده از طیف بینی فرسرخ تبدیل فوریه تأیید گردید. علاوه بر این، اسانس رازیانه اثر سیتوتوکسیک وابسته به غلظتی بر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) نشان داد و غلظت بالاتر اسانس سبب کاهش بیشتر زنده‌مانی سلول‌های سرطانی گردید. با توجه به نتایج این پژوهش، اسانس رازیانه قابلیت استفاده بعنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی جهت جلوگیری از اکسیداسیون فرآورده‌های غذایی (بویژه روغن‌های خوراکی) و همچنین صدمات ناشی از رادیکال‌های آزاد در بدن انسان را دارا می‌باشد.

5- تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی شماره 971/40 می‌باشد که توسط معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان حمایت گردیده است.

6- منابع

- [1] Deng W, Liu K, Cao S, Sun J, Zhong B, Chun J. Chemical Composition, Antimicrobial, Antioxidant, and Antiproliferative Properties of Grapefruit Essential Oil Prepared by Molecular Distillation. *Molecules* 2020; 25(1): 217.
- [2] Sharafi SM, Rasooli I, Allahghadri T, Jalali Nadoushan MR, and Rezaei MB. Antimicrobial, antioxidant, hematologic and cytotoxic properties of *Citrus limon* L. essential oil. *Iran J Med Aromat Plants* 2010; 26(3): 423-437.
- [3] Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Falah F. Investigation of antimicrobial activity of Fennel essential oil on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning and its interaction with kanamycin antibiotic. *Food Sci Tech* 2019; 91(16): 233-241.
- [4] Syed FQ, Mirza MB, Elkady AI, Hakeem KR, Alkarim S. (2019). An Insight of Multitudinous and Inveterate Pharmacological Applications of *Foeniculum vulgare* (Fennel). In *Plant and Human Health, Volume 3*, Springer; 2019. p. 231-254.
- [5] Diao WR, Hu QP, Zhang H, Xu JG. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control* 2014; 35(1): 109-116.
- [6] Dalalilifahani R, Monajemi L, Amjad. Cytotoxic Effects of Extract and Essential oil Leaves of *Achillea wilhelmsii* C. Koch on Colon Cancers Cells. *Exp Anim Biol* 2013; 1(3): 1-6.
- [7] Behbahani BA, Noshad M, Falah F. Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *Syzygium aromaticum* essential oil on foodborne pathogens. *Potravinarstvo Slovak J Food Sci* 2019; 13(1): 875-883.
- [8] Behbahani BA, Yazdi FT, Shahidi F, Mortazavi SA, Mohebbi M. Principle component analysis (PCA) for investigation of relationship between population dynamics of microbial pathogenesis, chemical and sensory characteristics in beef slices containing Tarragon essential oil. *Microb Pathogenesis* 2017; 105: 37-50.
- [9] Behbahani BA, Noshad M, Falah F. Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microb Pathogenesis* 2019; 136: 103716.
- [10] Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agric Food Chem* 2005; 53(20): 7749-7759.
- [11] Dapkevicius A, Venskutonis R, van Beek TA, Linssen JP. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J Sci Food Agric* 1998; 77(1): 140-146.
- [12] Alizadeh Behbahani B, Falah F, Lavi Arab F, Vasiee M, Tabatabaee Yazdi F. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2020; 2020: 5190603.
- [13] Dharmadasa RM, Abeyasinghe DC, Dissanayake DMN, Abeywardhane KW, Fernando NS. Leaf essential oil composition, antioxidant activity, total phenolic content and total flavonoid content of *Pimenta dioica* (L.) Merr (Myrtaceae): a superior quality

- antimicrobial effect of *Heracleum Lasiopetalum* on infection and food poisoning microorganisms. *J Appl MicrobiolFood Ind* 2018; 4(4): 15-28.
- [24] Khalaj H, Hasan Abadi T, Shaghghi J, Hajiaghaee R. A Review on the Botanical, Ecological, Agronomical and Pharmacological Properties of the Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *JMed Plants* 2018; 1(69):1-15
- [25] Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic Res* 2002; 36(2): 177-187.
- [26] Shahsavari N, Barzegar M, Sahari MA, Naghdibadi H. Antioxidant activity and chemical characterization of essential oil of *Buniumpersicum*. *Plant Food Hum Nutr* 2008; 63(4): 183-188.
- [27] Nooshkam M, Varidi M, Bashash M. (2019). The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. *Food Chem* 2019; 275: 644-660.
- [28] Rao MS, Chawla SP, Chander R, Sharma A. Antioxidant potential of Maillard reaction products formed by irradiation of chitosan-glucose solution. *CarbohydrPolym* 2011; 83(2): 714-719.
- [29] Anwar F, Hussain AI, Sherazi STH, Bhangar MI. (2009). Changes in composition and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruit at different stages of maturity. *J Herbs Spices Med Plants* 2009; 15(2): 187-202.
- [30] Dawidar AM, Mogib MA, El-Ghorab AH, Mahfouz M, Elsaid FG, Hussien K. Chemical composition and effect of photo-oxygenation on biological activities of Egyptian commercial anise and fennel essential oils. *J Essent Oil Bear Plants* 2008; 11(2): 124-136.
- [31] Sharopov F, Valiev A, Satyal P, Gulmurodov I, Yusufi S, Setzer WN, et al. (2017). Cytotoxicity of the essential oil of fennel (*Foeniculum vulgare*) from Tajikistan. *Foods* 2017; 6(9): 73.
- [32] Nakagawa Y, Suzuki T. Cytotoxic and xenoestrogenic effects via biotransformation of trans-anethole on isolated rat hepatocytes and cultured MCF-7 human breast cancer cells. *BiochemPharmacol* 2003; 66(1): 63-73.
- [33] Muthukumari D, Padma PR, Sumathi S. In vitro analysis of anethole as an anticancerous agent for triple negative breast cancer. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2013; 23(2): 314-318.
- spice grown in Sri Lanka. *Univers J Agric Res* 2015; 3(2): 49-52.
- [14] Tognolini M, Ballabeni V, Bertoni S, Bruni R, Impicciatore M, Barocelli E. Protective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis. *Pharmacol Res* 2007; 56(3): 254-260.
- [15] Mimica - Dukić N, Kujundžić S, Soković M, Couladis M. Essential oil composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. obtained by different distillation conditions. *Phytother Res* 2003; 17(4): 368-371.
- [16] Anwar F, Ali M, Hussain AI, Shahid M. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. *FlavourFrag J* 2009; 24(4): 170-176.
- [17] Kfoury M, Auezova L, Greige-Gerges H, Ruellan S, Fourmentin S. Cyclodextrin, an efficient tool for trans-anethole encapsulation: Chromatographic, spectroscopic, thermal and structural studies. *Food Chem* 2014; 164: 454-461.
- [18] Chranioti C, Karamberi A, Tsakanika LA, Tzia C. Freeze-dried fennel oleoresin products formed by biopolymers: Storage stability and characterization. *Food Biopro Tech* 2016; 9(12): 2002-2011.
- [19] Ahmad BS, Talou T, Saad Z, Hijazi A, Cerny M, Kanaan H. et al. Fennel oil and by-products seed characterization and their potential applications. *IndCrops Prod* 2018; 111: 92-98.
- [20] Viuda-Martos M, Mohamady MA, Fernández-López J, ElRazik KA, Omer EA, Pérez-Alvarez JA, et al. In vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control* 2011; 22(11): 1715-1722.
- [21] Kalleli F, BettaiebRebey I, Wannas WA, Boughalleb F, Hammami M, SaidaniTounsi M, et al. Chemical composition and antioxidant potential of essential oil and methanol extract from Tunisian and French fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds. *JFood Biochem* 2019; 43(8): e12935.
- [22] Agarwal D, Saxena SN, Sharma LK, Lal G. Prevalence of Essential and Fatty Oil Constituents in Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) Genotypes Grown in Semi Arid Regions of India. *J Essent Oil Bear Plants* 2018; 21(1): 40-51.
- [23] BarzegarH, MehrniaMA, Alizadeh Behbahani B. Determination of the chemical composition, antioxidant activity and the

Study the chemical composition of essential oil of *Foeniculum vulgare* and antioxidant activity and its cell toxicity

Alizadeh Behbahani, B. ^{1*}, Noshad, M. ¹, Falah, F. ²

1. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
2. PhD student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received: 2020/04/29 Accepted: 2020/06/27)

Due to the extensive use of chemical preservatives to increase the shelf life of foods and the prevalence of colorectal cancer, the demand for natural and safe pharmaceuticals and preservatives has increased. Thus, this study aimed to evaluate the antioxidant and cytotoxic potentials of *Foeniculum vulgare* essential oil, which has vast applications in the traditional medicine. In this study, the essential oil of *F. vulgare* was extracted by hydrodistillation method and its chemical constituents were identified quantitatively and tentatively using gas chromatography coupled to mass spectrometry and fourier transform infrared spectroscopy. The total phenol and flavonoid contents of the essential oil and its antioxidant activity (DPPH and ABTS free radicals scavenging activity and β -carotene/linoleic acid bleaching inhibition) were also investigated. The cytotoxic effect of *F. vulgare* essential oil was evaluated on colon cancer cell lines (HT29) using MTT assay. Anethole (75.61%) was the main chemical compound of *F. vulgare* essential oil and its absorption peaks were appeared at 1244 and 840 cm^{-1} . The total phenol and flavonoid contents of *F. vulgare* essential oil were 12.87 mg GAE/g and 39.67 mg QE/g, respectively. The antioxidant capacity of the essential oil, based on DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity, and β -carotene/linoleic acid bleaching inhibition, were 26.68, 39.57, and 32.38%, respectively. The cytotoxic effect of the essential oil on the colon cancer cells was depended on its concentration. The *F. vulgare* essential oil could be used as a natural compound to inhibit the oxidation of foods and the prevalence of colorectal cancers.

Keywords: *Foeniculum vulgare* essential oil, Natural antioxidant, Chemical compounds, Colon cancer; Cytotoxic effect.

* Corresponding Author E-Mail Address: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir