

10.22092/ijmapr.2023.359360.3219

شناسه دیجیتال (DOI):

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران

20.1001.1.17350905.1402.39.2.4.1

شناسه دیجیتال (DOR):

جلد ۳۹، شماره ۲، صفحه ۲۱۲-۲۰۳ (۱۴۰۲)

ارزیابی فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و اثر مهارى عصاره هیدروالکلی دانه بارهنگ (*Plantago major L.*) بر تولید نانورشته‌های آمیلوئیدی

پویا شیری^۱، امیر آراسته^{۲*} و گلناز تجدد^۳

۱- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران، پست الکترونیک: arasteh@iaurasht.ac.ir

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۱

تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۱

چکیده

گیاه بارهنگ (*Plantago major L.*) گیاهی علفی و چندساله با اثرات بیولوژیکی فراوان همچون خواص آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر مهارى عصاره دانه بارهنگ بر تولید نانورشته‌های آمیلوئیدی و همچنین ویژگی آنتی‌اکسیدانی این عصاره بود. در مرحله اول، عصاره هیدروالکلی دانه پودر شده گیاه با استفاده از اتانول ۹۶٪ تهیه شد. سپس ترکیب‌های موجود در عصاره با روش کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی (GC/MS) بررسی شد. تولید رشته‌های آمیلوئیدی با استفاده از روش طیف‌سنجی کنگورد و نیز تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی گذاره مورد تأیید قرار گرفت و اثرات آنتی‌اکسیدانی آن با روش DPPH بررسی شد. حضور ماده پیرولیدینون (۲/۹۵٪) و آمینوبوتیل استامید (۱۷/۹۸٪) در عصاره با روش GC/MS تأیید شد. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۹۹/۱۸٪) و کمترین تولید نانورشته‌های آمیلوئیدی (۵۵/۷۳٪) به ترتیب در غلظت‌های ۲ و ۴/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره بدست آمد. حضور رشته‌های آمیلوئیدی با تصویربرداری میکروسکوپی الکترونی مورد تأیید قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد عصاره دانه بارهنگ می‌تواند به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای کاهش عوارض ناشی از بیماری آلزایمر معرفی گردد.

واژه‌های کلیدی: بارهنگ (*Plantago major L.*)، آنتی‌اکسیدان، آمیلوئید، نانورشته.

مقدمه

گلیکوزید اوکوبین و پلانتازین از ترکیب‌های مهم گیاه بارهنگ هستند. تحقیقات مختلف نشان داده که دانه‌های این گیاه دارای مقدار زیادی مواد گلوکونی، هولوزید پلانتوز، اسید سوکسینیک، آدنین، اوکوبین و کولین می‌باشند. از دیگر مواد موجود در این دانه‌ها می‌توان به تانن‌ها و کومارین‌ها مانند آسکولتین، فلاونوئیدها، از جمله آپیژنین و املاح روی و پتاسیم اشاره کرد. از این گیاه برای درمان ناراحتی‌های تنفسی استفاده می‌شود. کمک به تصفیه خون، تب‌بری، ضد اسهال بودن، کاهش دهنده دردهای رماتیسمی، ضدالتهاب

گیاه بارهنگ با نام علمی *Plantago major* در متون مختلف به نام‌های بارتنگ، چرغون، خنک، خرگوشک و لسان‌الحمل نیز نامیده می‌شود. بارهنگ گیاهی چندساله، دارای ریزوم، بدون ساقه مشخص و بدون کرک است که برگ‌های طوقه‌ای و دم‌برگ‌دار دارد. برگ‌های گیاه به صورت بیضی یا تخم‌مرغی، با حاشیه تقریباً صاف یا کمی کنگره‌ای و فاقد کرک یا با کرک‌های اندک و پراکنده است (Yernazarova et al., 2019; Adom et al., 2017).



به‌وسیله کارشناس گیاه‌شناس مستقر در دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت بررسی و تأیید شد. ترکیب‌های DPPH، آلبومین سرم گاوی و رنگ کنگورد از شرکت سیگما آمریکا و نمک‌های معدنی مورد نیاز از شرکت مرک (آلمان) تهیه و استفاده گردید. دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی Agilent آمریکا مدل ۵۹۷۷A و دستگاه اسپکتروفوتومتر دو پرتوی مرئی-فراابنفش (Perkin-Elmer Lambda 25, USA) و میکروسکوپ الکترونی گذاره مدل Philips EM 2008(S) نیز در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

آنالیز ترکیب‌های شیمیایی با کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS)

دستگاه کروماتوگراف گازی-طیف‌سنج جرمی، یکی از پیشرفته‌ترین دستگاه‌ها در زمینه آنالیز دستگامی است. مقداری از نمونه پس از انحلال با اتانول وارد دستگاه شد و بعد منحنی کروماتوگرام توسط دستگاه رسم گردید. تجزیه و تحلیل با کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی انجام شد. تجزیه و تحلیل در دستگاه با DB-5MS و ستون پوشیده شده از سیلیکا (۳۰ متر در ۲۵۰ میکرومتر) انجام شد. ابتدا ستون برای مدت ۲ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، بعد از ۵۰ درجه سانتی‌گراد تا ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد با روند افزایش ۴ درجه سانتی‌گراد/دقیقه برنامه‌ریزی شد و در نهایت برای ۲ دقیقه در ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. دمای انژکتور و آشکارساز ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد بود. از گاز حامل هلیوم به‌عنوان حامل استفاده شده و فرایند در طیف جرمی در ۷۰ الکترون ولت انجام شد. مواد مؤثره دانه گیاه بارهنگ با استفاده از زمان بازداری ترکیب‌های اندیس بازداری، طیف جرمی و مقایسه این مؤلفه‌ها با ترکیب‌های استاندارد موجود در کتابخانه‌های دستگاه مورد شناسایی قرار گرفتند (Khosraftar et al., 2020).

کلیه و مثنانه و خاصیت ضد میکروبی تنها جزئی از کاربردهای مهم بارهنگ برای ارتقاء سلامتی است. به‌علاوه از این گیاه می‌توان در درمان خونریزی‌های ریوی، عفونت‌های مجاری تنفسی، التهابات چشمی، التهابات روده‌ای، بیماری‌های کبدی، استفراغ، کولیت و مالاریا استفاده کرد. کرم بارهنگ نیز قادر است جوش‌های صورت، جوش جوانی، جوش ناحیه بینی، زرخدان و گونه‌ها و زخم‌های جلدی را به‌طور قابل ملاحظه‌ای بهبود دهد (Najafian et al., 2018; Caro et al., 2018; Karima et al., 2015).

بیماری آلزایمر یک بیماری مغزی تحلیل برنده عصبی (Neurodegenerative) است که غیرقابل برگشت بوده و به تدریج حافظه و مهارت‌های شناختی را تخریب می‌کند. این بیماری با تشکیل تجمعات پروتئینی نامحلول و از بین رفتن سیناپس و مرگ نورون‌ها همراه است. تعیین دقیق شروع مرحله بالینی بیماری آلزایمر مشکل است، بعد از چند ماه به تدریج مشکلات از حافظه بیانی (Declarative memory) به حافظه غیر بیانی (Non-declarative memory) منتقل شده و پس از گذشت چند سال، زوال عقل شدیدی در بیماران مشاهده می‌شود (Lane et al., 2018). اگرچه مطالعات متعددی (Fulop et al., 2018) نشان داده‌اند که آمیلوئید بتا و پروتئین پیش‌ساز آن در مغز دارای نقش‌های فیزیولوژی هستند، اما تجمع آنها در مغز نیز عامل مهمی در ایجاد بیماری آلزایمر است. به نظر می‌رسد که تجمع آمیلوئید بتا در مغز در نتیجه عدم تعادل در تولید و پاکسازی (Clearance) آن در مغز ایجاد می‌شود (DeTure & Dickson, 2019). هدف از این مطالعه، بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و مهارت عصاره دانه بارهنگ (*Plantago major*) بر تولید نانوبیوفیبریل‌های آمیلوئیدی از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان یک پروتئین مدل بوده است.

مواد و روش‌ها

دانه‌های گیاه بارهنگ پس از تهیه، گونه و جنس آن

تهیه عصاره هیدروالکلی

اطمینان از عدم وجود هرگونه آلودگی میکروبی، نمونه عصاره برای یک شب در مجاورت نور UV قرار گرفت (Lukova et al., 2017a).

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای اندازه‌گیری میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی از روش احیای رادیکال آزاد DPPH استفاده شد. برای این کار، ابتدا یک استوک ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از دانه گیاه بارهنگ تهیه و از این استوک (محلول ذخیره) برای تهیه دوزهای مختلف مطابق جدول ۱ استفاده شد.

در یک بشر ۵۰۰ میلی‌لیتری اتوکلاو شده، میزان ۱۰ گرم پودر بارهنگ وزن شده در ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول ۷۰٪ اتانول (۱۴۰ میلی‌لیتر اتانول و ۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر) ریخته شد و یک مگنت درون بشر انداخته و پس از بستن دهانه بشر به کمک پارافیلیم، به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه هیتر استایر در دمای آزمایشگاه بهم زده شد. عصاره پس از خشک شدن به مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، از انتهای بشر تراشیده شده و پس از انحلال دوباره در آب مقطر استریل استفاده گردید. برای

جدول ۱- تهیه دوزهای مختلف از نمونه برای بررسی درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی

Table 1. Preparation of different sample doses to investigate antioxidant activity percentage

No.	Stock (μ l)	Ethanol	Sample concentration
		(μ l)	(mg.ml ⁻¹)
1	1	999	0.001
2	10	990	0.01
3	100	900	1
4	200	800	2

رابطه ۱

$$100 - \left(\frac{Abs.S}{Abs.C} \times 100 \right) = \text{درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی}$$

بررسی اثر عصاره بر تولید رشته‌های آمیلوئیدی

برای بررسی اثر عصاره بر تولید رشته‌های آمیلوئیدی، در یک میکروتیوپ ته‌گرد ۲ میلی‌لیتری ۲۰ میلی‌گرم پودر آلبومین سرم گاوی ریخته و یک میلی‌لیتر بافر سیترات-فسفات با pH برابر ۳ به آن افزوده و خوب بهم زده شد. غلظت آلبومین در این ظرف ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. سپس در ۶ میکروتیوپ دیگر هر یک ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول ریخته و ۳۰۰ میکرولیتر بافر سیترات-فسفات اضافه گردید و مطابق جدول ۲ نمونه‌های مورد آزمایش تهیه شد.

در اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی، لوله نمونه حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۳ میلی‌لیتر اتانول و ۰/۳ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ میلی‌مولار DPPH در اتانول بود. از محلول کنترل (۳/۵ میلی‌لیتر اتانول و ۰/۳ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ میلی‌مولار DPPH در اتانول) برای سنجش میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی در غیاب مهارکننده احتمالی استفاده شد. لوله‌ها برای ۶۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند تا شدت رنگ از بنفش پررنگ کمتر شده، یا به زرد تبدیل شود. سپس جذب لوله‌های کنترل و نمونه را در طول موج ۵۱۸ نانومتر خوانده و با استفاده از فرمول درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی محاسبه شد (Karima et al., 2015). میزان Abs. S بیانگر جذب نمونه و Abs. C بیانگر جذب کنترل است.

جدول ۲- تهیه غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی دانه بارهنگ (*Plantago major*)Table 2. Preparation of different concentrations of *Plantago major* seeds hydroalcoholic extract

No.	5 mg.ml ⁻¹ solution of bovine serum albumin (μ l)	Herbal extract (μ l)	Citrate-phosphate buffer (μ l)
1	400	-	100
2	400	20	80
3	400	40	60
4	400	60	40
5	400	80	20
6	400	100	-

آزمایشگاه، با میکروسکوپ الکترونی گذاره در ولتاژ ۷۵ کیلوولت تصویربرداری شدند (Goldsbury *et al.*, 2011).

نتایج

نتایج حاصل از بررسی عصاره با کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) کروماتوگرام حاصل از عصاره گیاه بارهنگ حضور ماده پیرولیدینون (Pyrrolidinone) به میزان ۲/۹۵٪، آمینوبوتیل استامید (N-(4-Aminobutyl)acetamide) به میزان ۱۷/۹۸، متیل بتا-د-گالاکتوپیرانوزید (Methyl beta-d-galactopyranoside) به میزان ۱/۵۸٪، تترادکانوئیکاسید (Tetradecanoic acid) به میزان ۸/۶۱٪، گلوسیتول (Glucitol) به میزان ۲/۹۷٪ و حضور ماده بوتیل سترات (Butyl citrate) به میزان ۱۴/۵۱٪ را نشان داد (جدول ۳).

نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نتایج حاصل از بررسی اثرهای آنتی‌اکسیدانی عصاره با آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH در شکل ۱ نشان داده شده است.

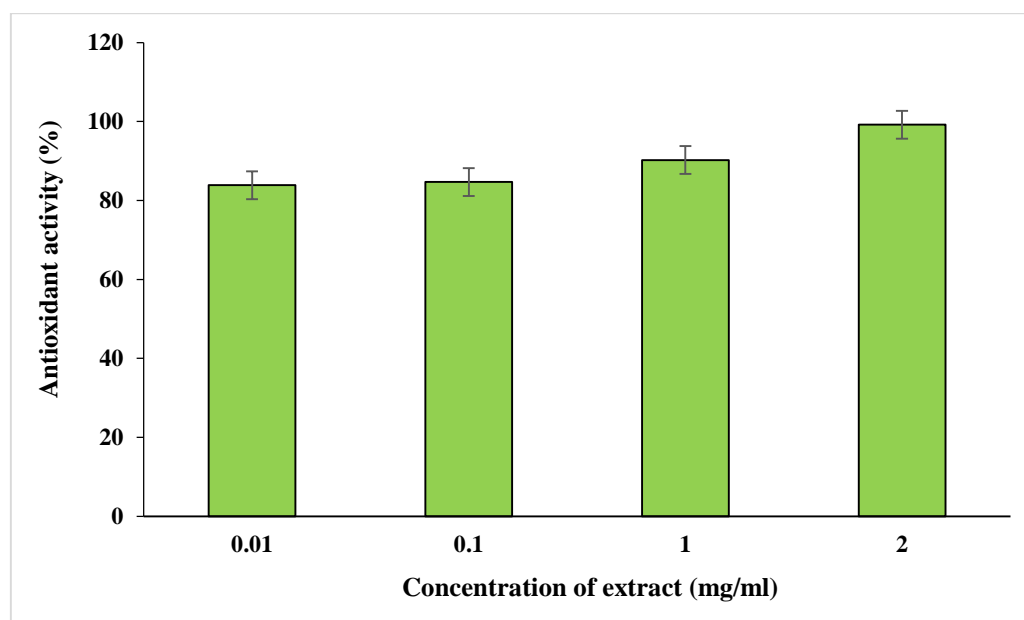
سپس یک مگنت کوچک برنجی به هر میکروتیوپ افزوده و درب آن با پارافیلیم محکم بسته شد. میکروتیوپ‌ها برای ۴۸ ساعت روی هیتر استایر با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۰۰ دور در دقیقه، بهم زده شدند. میزان جذب در طول موج بیشینه در هر مورد، به‌عنوان تابعی از تولید رشته‌های آمیلوئیدی اندازه‌گیری شد. برای این کار، یک اسکن طول موج از محلول نمونه حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه آمیلوئیدی و ۱۹۰۰ میکرولیتر از بافر کنگورد گرفته شد و نتایج مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. لوله شماره یک که فاقد عصاره است، به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد (Arasteh *et al.*, 2012).

روش میکروسکوپ الکترونی گذاره

میزان ۵ میکرولیتر از نمونه‌های پروتئین آمیلوئیدی تولید شده از آلبومین سرم گاوی با غلظت نهایی یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، برای مدت ۴۵ ثانیه روی گریدهای مسی پوشیده شده با لایه‌ای از پلیمر فرموار قرار داده و مقادیر اضافه آن برداشته شد. سپس نمونه را با محلول ۳٪ وزنی اورانیل استات به مدت یک دقیقه شستشو داده و دوباره مقادیر اضافی با کاغذ صافی برداشته شد. گریدها پس از خشک شدن به مدت ۲ ساعت در دمای

جدول ۳- ترکیب‌های موجود در عصاره هیدروالکلی دانه بارهنگ (*Plantago major*)Table 3. *Plantago major* seeds hydroalcoholic extract compounds

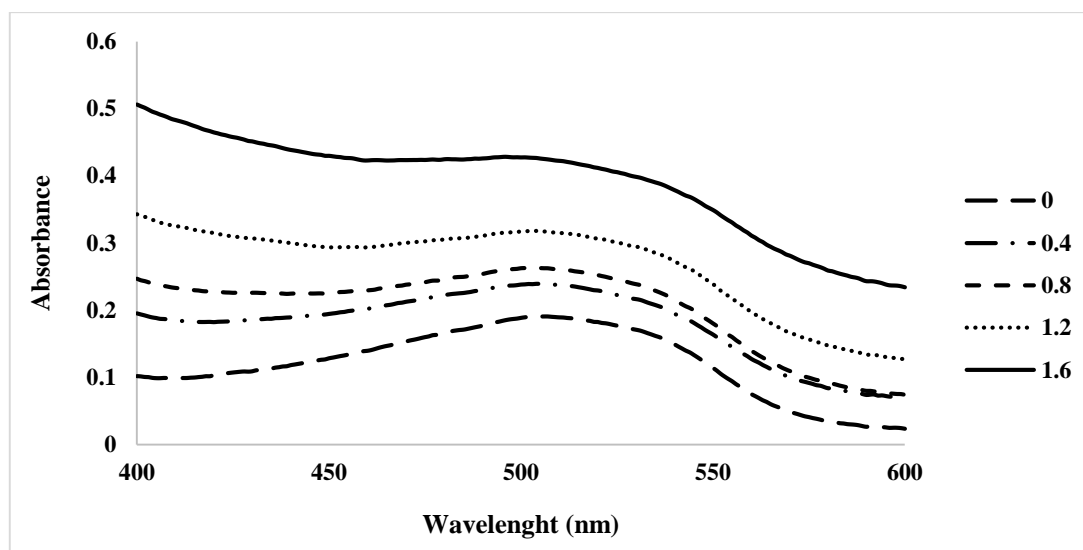
No.	Retention Index	Compound	%
1	1185	pyrrolidinone	2.95
2	1538	n-(4-Aminobutyl)acetamide	17.98
3	2597	methyl beta-d-galactopyranoside	1.58
4	2617	tetradecanoic acid	8.61
5	2674	glucitol	2.97
6	4697	butyl citrate	14.51

شکل ۱- درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی دانه بارهنگ (*Plantago major*) در غلظت‌های مختلفFigure 1. Antioxidant activity percentage of *Plantago major* seeds hydroalcoholic extract in different concentrations

نتایج حاصل از بررسی رشته‌های آمیلوئیدی با طیف‌سنجی کنگورد

اثر ضد آلزایمری با بررسی اثر مهاری عصاره هیدروالکلی بارهنگ بر تولید نانوبیوفیبریل‌های آمیلوئیدی از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان یک پروتئین مدل در غلظت‌های کنترل ۰/۴، ۰/۸، ۱/۲ و ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره و با روش طیف‌سنجی مرئی بررسی شد (شکل ۲).

طبق نمودار بدست آمده (شکل ۱)، عصاره بارهنگ در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به میزان ۹۹/۱۸٪ در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کمترین درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به میزان ۸۳/۸۵٪ داشته است. تناسب غلظت عصاره با خاصیت آنتی‌اکسیدانی تأییدی بر وجود ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان در عصاره است.



شکل ۲- طیف جذبی عصاره هیدروالکلی دانه بارهنگ (*Plantago major*) در غلظت‌های مختلف

Figure 2. Absorption spectrum of *Plantago major* seeds hydroalcoholic extract in different concentrations

گیاهی و پس از تأثیر عصاره می‌باشد که با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) در بزرگنمایی‌های متفاوت تهیه شده است. همانطور که در تصاویر قابل مشاهده است، در غیاب عصاره (شکل ۳- الف، ب و ج) رشته‌های آمیلوئیدی به صورت باریک و رشته‌ای قابل رؤیت هستند، ولی در حضور عصاره (شکل ۳- د)، پروتئین آلبومین سرم گاوی به صورت تجمعات توده‌ای دیده شده و رشته‌های کمتری ایجاد شده است.

بحث

مزایای دارویی بارهنگ در صدها سال در سراسر جهان تأیید شده است. این گیاه حاوی تعدادی از مواد تشکیل‌دهنده مؤثر شیمیایی شامل فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، تری‌نوئیدها، مشتقات اسید فنولیک، گلیکوزیدها، اسیدهای چرب، پلی‌ساکاریدها و ویتامین‌ها است که تأثیرات خاص آن در درمان کمک می‌کنند. مطالعات نشان داده‌اند که بارهنگ به عنوان یک شفادهنده زخم بوده و دارای فعالیت ضد التهابی (Najafian *et al.*, 2018)، ضد دیابتی (Do Huong *et al.*, 2021)، ضد عفونت‌های سیستم تنفسی (Najafian *et al.*, 2018)، ضد باکتری (Pensantes-

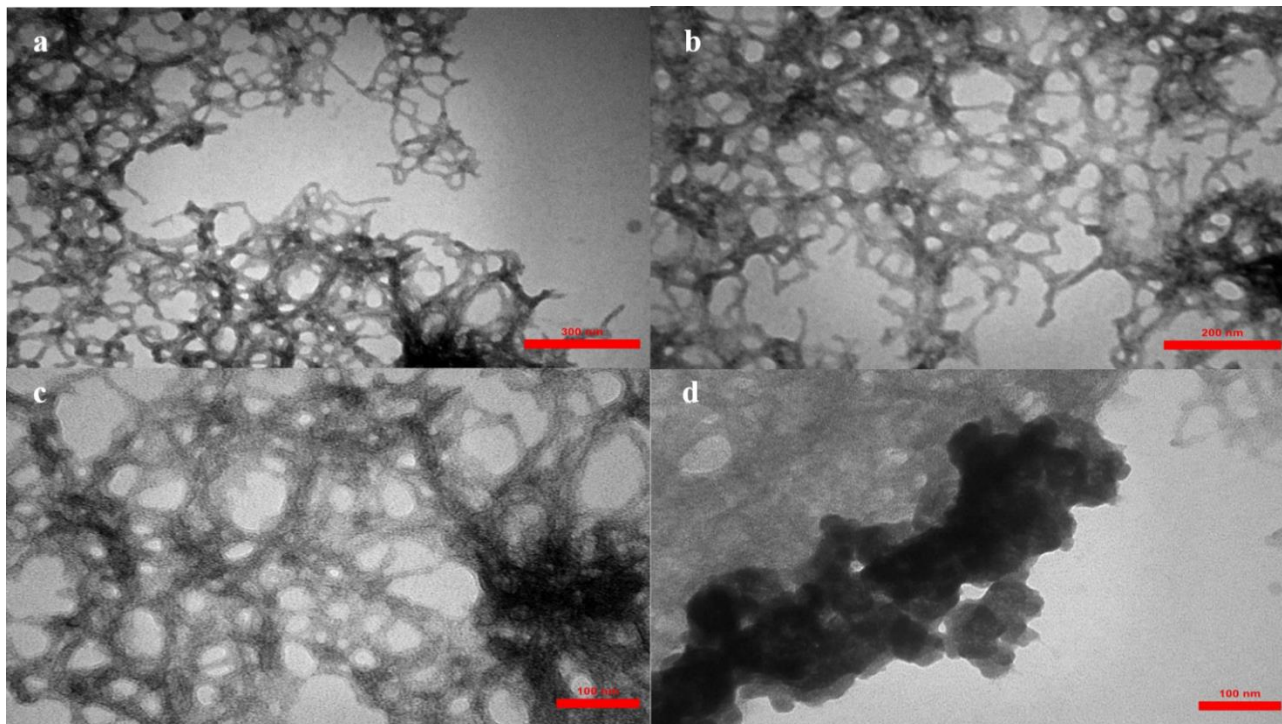
میزان طول موج بیشینه در غلظت‌های مختلف عصاره که به عنوان معیاری از میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی مطرح است، تغییر یافته است. افزایش میزان طول موج بیشینه بیانگر افزایش تولید رشته‌های آمیلوئیدی است، زیرا رنگ کنگورد در بین رشته‌های آمیلوئیدی اتصال یافته و موجب افزایش طول موج بیشینه در طیف (هیپر کروماسیتی) می‌شود. نتایج حاصل نشان می‌دهد که بیشترین کاهش در تولید رشته‌ها در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره و به میزان ۵۵/۷۳٪ ایجاد شده است و با بکارگیری غلظت‌های بیشتر عصاره، میزان تولید آمیلوئید نیز افزایش یافته است. این مطلب مؤید این موضوع است که اثرهای مهارتی عصاره بارهنگ در تولید رشته‌های آمیلوئیدی در غلظت‌های پائین‌تر بهتر دیده می‌شود.

نتایج حاصل از بررسی حضور رشته‌های آمیلوئیدی با میکروسکوپ الکترونی گذاره

تصاویر میکروسکوپ الکترونی، رشته‌هایی با قطر حدود ۱۰ نانومتر و طول چند صد نانومتر را نشان می‌دهد که تأییدی بر تولید رشته‌های آمیلوئیدی است. تصاویر زیر مربوط به تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی بدون تأثیر عصاره

سیستم غدد درون‌ریز و سیستم ایمنی بدن می‌گردد (Nazarizadeh *et al.*, 2013).

(Sangay *et al.*, 2020) و ضد توموری (Soltani *et al.*, 2020) است و باعث تأثیر بر سیستم‌های مختلف بدن همانند



شکل ۳- عکس رشته آمیلوئیدی توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره در عدم حضور عصاره هیدروالکلی دانه بارهنگ

(*Plantago major*) با بزرگنمایی های (الف) ۷۰۰۰، (ب) ۲۵۰۰۰، (ج) ۴۴۰۰۰ و در حضور عصاره بارهنگ با بزرگنمایی (د) ۴۴۰۰۰

Figure 3. Amyloid fibrils image by transmission electron microscopy in the absence of *Plantago major* seeds hydroalcoholic extract with magnification of (a) 7000, (b) 25,000, (c) 44,000, and in the extract presence with magnification of (d) 44,000

سرین (Serin) به میزان ۱۰/۹٪، گالاکتورونیک اسید (Galacturonic acid) به میزان ۱/۵۸٪ و رامنوز (rhamnose) به میزان ۶٪ ردیابی شدند (Sangay *et al.*, 2020).

در این مطالعه طبق آزمایش‌های انجام شده، در صورتی که ترکیب‌های موجود در عصاره دانه بارهنگ فرایند تولید رشته‌های آمیلوئیدی را کم کرده یا مهار کنند، اثرهای ضد آژایمری آن به‌عنوان یک گیاه دارویی مورد تأیید قرار می‌گیرد. در این تحقیق، ابتدا رشته‌های آمیلوئیدی در غیاب ترکیب‌های عصاره تهیه شدند که با تصاویر میکروسکوپ الکترونی تولید نانورشته‌ها تأیید شد. سپس فرایند تولید نانورشته‌های آمیلوئیدی در غلظت‌های مختلف از عصاره انجام

علاوه بر این، عصاره *P. major* دارای اثرهایی شامل آنتی‌اکسیدانی، ضد زخم، ضد اسهال و ضد ویروسی قوی می‌باشد (Adom *et al.*, 2017). گیاه بارهنگ با خستگی و سرطان مبارزه می‌کند و یک آنتی‌اکسیدان قوی است. در این مطالعه، عصاره هیدروالکلی بارهنگ با دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی (GC/MS) آنالیز شد. Jamilah و همکاران (۲۰۱۲) نیز به بررسی ترکیب‌های بارهنگ پرداختند و ترکیب‌های اکتانوییک اسید (Octanoic Acid) را به میزان ۴/۸۸٪، کاتچین (Catechin) به میزان ۹/۲۲٪، پیرول (Pyrrole) به میزان ۰/۹۸٪ و پنتانوییک اسید (Pentanoic Acid) را به میزان ۱/۴۴٪ ردیابی کردند (Jamilah *et al.*, 2012). در مطالعه دیگری ترکیب‌های

سپاسگزاری

نویسندگان از تمامی دوستان و همکلاسی‌هایی که در انجام این پژوهش ما را یاری کردند، کمال قدردانی را دارند.

References

- Adom, M.B., Taher, M., Mutalabisin, M.F., Amri, M.S., Kudus, M.B.A., Sulaiman, M.W.A.W., Sengupta P. and Susanti, D., 2017. Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 96: 348-360.
- Arasteh, A., Habibi-Rezaei, M., Ebrahim-Habibi, A. and Moosavi-Movahedi, A.A., 2012. Response surface methodology for optimizing the bovine serum albumin fibrillation. *The protein journal*, 31(6): 457-465.
- Caro, D.C., Rivera, D.E., Ocampo, Y., Franco, L.A. and Salas, R.D., 2018. Pharmacological evaluation of *Mentha spicata* L. and *Plantago major* L., medicinal plants used to treat anxiety and insomnia in Colombian Caribbean coast. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2018.
- DeTure, M.A. and Dickson, D.W., 2019. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*, 14(1): 1-18.
- Do Huong, T.V., Minh Giang, P., Hoang Yen, N. and Nguyen, S.T., 2021. *Plantago major* L. extracts reduce blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Journal of Chemistry*, 5: 1-8.
- Fulop, T., Witkowski, J.M., Bourgade, K., Khalil, A., Zerif, E., Larbi, A., Hirokawa, K., Pawelec, G., Bocti, C. and Lacombe, G., 2018. Can an infection hypothesis explain the beta amyloid hypothesis of Alzheimer's disease?. *Frontiers in aging neuroscience*, 10: 224.
- Goldsbury, C., Baxa, U., Simon, M.N., Steven, A.C., Engel, A., Wall, J.S., Aebi, U. and Müller, S.A., 2011. Amyloid structure and assembly: insights from scanning transmission electron microscopy. *Journal of structural biology*, 173(1): 1-13.
- Jamilah, J., Sharifa, A. and Sharifah, N., 2012. GC-MS analysis of various extracts from leaf of *Plantago major* used as traditional medicine. *world applied science journal*, 17: 67-70.
- Karima, S., Farida, S. and Mihoub, Z.M., 2015. Antioxidant and antimicrobial activities of *Plantago major*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(5): 58-64.
- Khoshraftar, Z., Shamel, A., Safekordi, A.A., Ardjmand, M. and Zaefizadeh, M., 2020. Natural nanopesticides with origin of *Plantago major* seeds extract for *Tribolium castaneum* control. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 10(3): 255-264.

شد و هر بار میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی از روی میزان جذب در طول موج بیشینه سنجش گردید. نتایج نشان داد که بیشترین میزان کاهش تولید رشته‌های آمیلوئیدی، در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. این نتیجه از دو دیدگاه قابل بحث است، نخست اینکه روش جذب سنجی کنگورد، یک روش عمومی برای ردیابی رشته‌های آمیلوئیدی است و برای تأیید اختصاصی آن باید آزمایش‌های تکمیلی انجام شود و دوم اینکه احتمال تداخل ترکیب‌های موجود در عصاره بارهنگ با رنگ کنگورد وجود دارد. این موضوع سبب می‌شود با افزایش میزان غلظت عصاره میزان جذب در طول موج بیشینه طیف‌های جذبی افزایش یابد (Arasteh et al., 2012).

در این تحقیق، به منظور بررسی اثرهای آنتی‌اکسیدانی عصاره، آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH انجام شد. نتایج مطالعه Lukova و همکاران (۲۰۱۷a) نشان دادند که عصاره بارهنگ در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به میزان ۹۹/۱۸٪ داشته است. در تحقیقی نیز حداکثر میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH تا ۴۰/۰۸٪ اندازه‌گیری شد (Lukova et al., 2017b) و در تحقیق دیگری این میزان تا ۴۴٪ تعیین گردید که نتایج ما را علاوه بر اینکه تأیید می‌کند، بالا بودن اثرهای آنتی‌اکسیدانی نمونه عصاره هیدروالکلی بارهنگ را در این تحقیق نشان می‌دهد (Mazzutti et al., 2017).

برای تعیین اثر مهاری عصاره هیدروالکلی بر تولید رشته‌های آمیلوئیدی از روش طیف‌سنجی مرئی استفاده شد و بیشترین مهار در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره ایجاد شد. حضور ماده مؤثره این- (۴-آمینوبوتیل) استامید (N-(4-Aminobutyl) acetamide) به میزان ۱۷/۹۸٪ تأیید گردید. عصاره بارهنگ با خواص آنتی‌اکسیدانی قوی که دارد می‌تواند به‌عنوان یک گیاه دارویی مؤثر در کاهش عوارض بیماری آلزایمر مورد توجه قرار گیرد. تحقیقات ما در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) انجام شد و پیشنهاد می‌شود تا این تحقیقات در شرایط غیر آزمایشگاهی (*in vivo*) نیز انجام شده و نتایج مورد بررسی قرار گیرد.

- Nazarizadeh, A., Mikaili, P., Moloudizargari, M., Aghajanshakeri, S. and Javaherypour, S., 2013. Therapeutic uses and pharmacological properties of *Plantago major* L. and its active constituents. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*, 3(9): 212-221.
- Pensantes-Sangay, S.J., Calla-Poma, R.D., Requena-Mendizabal, M.F., Alvino-Vales, M.I. and Millones-Gómez, P.A., 2020. Chemical composition and antibacterial effect of *Plantago major* extract on periodontal pathogens. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 20.
- Soltani, G.M., Hemati, S., Sarvizadeh, M., Kamalinejad, M., Tafazoli, V. and Latifi, S.A., 2020. Efficacy of the *plantago major* L. syrup on radiation induced oral mucositis in head and neck cancer patients: A randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Medicine*, 51: 102397.
- Yernazarova, K., Abdrassulova, Z.T., Tuleuhanov, S., Tussupbekova, G., Salybekova, N., Isayev, G. and Basim, H., 2019. Biological features of the medicinal plant *Plantago major* L. *International Journal of Biology and Chemistry*, 12(1): 86-93.
- Lane, C., Hardy, J. and Schott, J., 2018. Alzheimer's disease. *European journal of neurology*, 25: 59-70
- Lukova, P., Dimitrova-Dyulgerova, I., Karcheva-Bahchevanska, D., Mladenov, R., Iliev, I. and Nikolova, M., 2017a. Comparative morphological and qualitative phytochemical analysis of *Plantago media* L. leaves with *P. major* L. and *P. lanceolata* L. leaves. *International Journal of medical research and pharmaceutical sciences*, 4: 20-26.
- Lukova, P., Karcheva-Bahchevanska, D., Nikolova, M., Iliev, I.N. and Mladenov, R., 2017b. Comparison of structure and antioxidant activity of polysaccharides extracted from the leaves of *Plantago major* L., *P. media* L. and *P. lanceolata* L. *Bulgarian Chemical Communications*, 49: 282-288.
- Mazzutti, S., Ferreira, S. R.S., Herrero M. and Ibañez, E., 2017. Intensified aqueous-based processes to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*. *Journal of Supercritical Fluids*, 119: 64-71.
- Najafian, Y., Hamedi, S.S., Farshchi, M.K. and Feyzabadi, Z., 2018. *Plantago major* in traditional persian medicine and modern phytotherapy: a narrative review. *Electronic physician*, 10(2): 6390.

Evaluation of phytochemical, antioxidant, and inhibitory properties of *Plantago major* L. seeds hydroalcoholic extract on amyloid nanofibrils production

P. Shiri¹, A. Arasteh^{2*} and G. Tajaddod¹

1- Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2*- Corresponding author, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran, E-mail: arasteh@iaurasht.ac.ir

Received: August 2022

Revised: January 2023

Accepted: January 2023

Abstract

Plantago major L. is a herbaceous perennial plant with many biological effects such as strong antioxidant properties. This study aimed at investigating the inhibitory effect of *P. major* seeds extract on amyloid nanofibrils production and also to antioxidant properties of this extract. First, the plant powdered-seeds hydroalcoholic extract was prepared using 96% ethanol. The extract compounds were then analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) method. The production of amyloid fibrils was confirmed using the concord spectrometry method and transmission electron microscope imaging and its antioxidant effects were evaluated by the DPPH method. The presence of pyrrolidinone (2.95%) and N-(4-aminobutyl) acetamide (17.98%) in the extract was confirmed by GC/MS. The highest antioxidant activity (99.18%) and lowest amyloid nanofibrils production (55.73%) were obtained in the concentrations of 2 and 0.4 mg.ml⁻¹ of the extract, respectively. The presence of amyloid fibrils was confirmed by electron microscopic imaging. The results of this research showed that the *P. major* seeds extract can be introduced as a suitable candidate to reduce the complications caused by Alzheimer's disease.

Keywords: *Plantago major* L., antioxidant, amyloid, nanofiber.