

چکیده

مقدمه: رادیکال‌های آزاد به خصوص گونه‌های اکسیژن فعال با ایجاد آسیب به بیومولکول‌هایی همچون DNA، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و یا چربی‌های غشایی می‌توانند اختلالاتی را ایجاد کنند. پراکسیداسیون لیپیدها در ذره LDL و دیواره سلول‌های کبدی در تشکیل آترواسکلروز و بیماری کبدی و همچنین قندی شدن غیرآنزیمی پروتئین‌ها در وخیم شدن اوضاع دیابت نقش دارند. عدم تعادل سیستم آنتی‌اکسیدانی و اکسیدانی می‌تواند باعث بروز اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد در طولانی مدت گردد. در این مطالعه اثرات آنتی‌اکسیدانی یکی از چاشنی‌های غذایی به نام فلفل سیاه بر واکنش‌های ذکر شده، بررسی گردید.

روش کار: ابتدا عصاره فلفل سیاه تهیه و شناسایی گردید. هپاتوسیت‌های موش تهیه و در مجاورت ترشیوبوتیل هیدروپرسکساید ۱/۵ mM قرار گرفت و میزان مالون دی‌آلدئید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدی در حضور و غیاب عصاره و میزان آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز (AST) آزاد شده ناشی از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اندازه‌گیری شد. تغییرات گلیکوزیلاسیون هموگلوبین و اکسیداسیون LDL نیز در حضور و غیاب عصاره فلفل بررسی و میزان درصد مهار اکسیداسیون نسبت به کنترل محاسبه گردید.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که فلفل سیاه در غلظت ۱۰ µg/ml، میزان مالون دی‌آلدئید را ۱۷/۷۸٪، رهاسازی AST از سلول‌های کبدی را ۳۳/۳٪ و میزان قندی شدن هموگلوبین را در غلظت ۰/۲۵ µg/ml به میزان ۱۷/۳۵٪ مهار می‌کند. اثر فلفل سیاه بر مهار اکسیداسیون LDL در غلظت ۱ µg/ml بسیار چشمگیر بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که فلفل سیاه در غلظت‌های به کار برده شده از خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردار است و احتمالاً می‌توان از آن به عنوان آنتی‌اکسیدان و مکمل غذایی برای بیماران دیابتیک، کبدی و افراد مستعد به آترواسکلروز استفاده نمود.

کل‌واژگان: آنتی‌اکسیدان‌ها، فلفل سیاه، LDL، سلول کبدی، هموگلوبین.

مقدمه

رادیکال‌های آزاد واکنش‌گرهایی فوق‌العاده قوی هستند که تمایل زیادی برای گرفتن الکترون و جفت کردن الکترون‌های خود دارند، لذا باعث می‌شوند تا دیگر مولکول‌ها آسیب بینند و یا عملکرد خود را از دست بدهند. آسیب‌های ناشی از واکنش‌های اکسیداتیو به DNA، پروتئین و سایر مولکول‌ها می‌تواند باعث پیشرفت و تشدید بیماری‌های قلبی-عروقی، سرطان، پیری، کاتاراکت، خونریزی کبدی و ایدز گردد (۳-۱). همچنین رادیکال‌های آزاد در مکانیسم عمل برخی از آنزیم‌های هم‌دار سیتوکروم شرکت می‌کنند (۳). رادیکال‌های آزاد می‌توانند از منابع اندوژن و اگزوژن بر اثر استرس‌های اکسیداتیو تولید شوند (۴ و ۵). از جمله حساس‌ترین هدف‌های پراکسیدانت‌ها می‌توان از اسیدهای چرب موجود در غشاهای بیولوژیک نام برد. اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع ۱ منجر به کاهش سیالیت غشا و از بین رفتن ساختمان و عملکرد آن می‌شود که در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها دخالت دارد. در نتیجه پراکسیداسیون

لیپیدها، اسیدهای چرب غیراشباع تغییر فرم می‌دهد و در نتیجه سیالیت و پتانسیل غشای لیپیدی کاهش می‌یابد که منجر به تغییر نفوذپذیری غشاهای سلولی می‌گردد. از سوی دیگر پراکسیداسیون پروتئین‌های موجود در لیپیدها بر آنزیم‌های غشایی تأثیر گذاشته، در روند انتقال یون‌ها و نیز رهاسازی مواد داخل سلولی تغییراتی ایجاد می‌شود. همچنین متابولیت‌های سیتوتوکسیک حاصل از پراکسیدهای لیپیدی ایجاد می‌شود که در اکسیداسیون پروتئین‌های موجود در LDL اهمیت به‌سزایی دارند (۷-۵). این روند در پاتوژنز آترواسکلروز نیز اهمیت ویژه‌ای دارد. با توجه به عوارض سوء رادیکال‌های آزاد، حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی ضروری به نظر می‌رسد. آنتی‌اکسیدان‌ها قادرند در مقادیر کم، غشاهای سلولی و ترکیبات مختلف موجود زنده را در مقابل اکسیدان‌ها حفظ کنند (۸). تثبیت دوباره تعادل بین مواد پراکسیداسیون و آنتی‌اکسیدان به سلول اجازه می‌دهد تا عمل فیزیولوژیک نرمال خود را مجدداً به دست آورد (۹). آنتی‌اکسیدان‌ها نقش ویژه‌ای در پیشگیری و درمان بیماری‌ها ایفا می‌کنند (۱۲-۹) تحقیقات اخیر نقش آنتی‌اکسیدانی ترکیبات خالص جدا شده از سیر، فلفل و زردچوبه را به اثبات رسانیده‌اند و

¹ Poly Unsaturated Fatty Acide (PUFA)

اندازه‌گیری MDA و AST: مقدار مشخصی از سلول‌های کبدی (cell/ml) ۱۰۶) انتخاب و در مجاورت ترشیو بوتیل هیدروپروکساید (tBH) ۱/۵mM قرار گرفت و میزان مالون‌دی‌آلدئید^۱ تولید شده در غیاب و حضور عصاره به عنوان یک مارکر پراکسیداسیونی لیپیدی در طول موج ۵۳۵ nm اندازه‌گیری شد (۱۹). سپس همان مقدار از سلول‌های کبدی انتخاب گردید و در مجاورت (tBH) ۱/۵mM قرار گرفت و میزان آنزیم AST آزاد شده به عنوان یک نشانگر آسیب غشای سلولی ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی در غیاب و حضور عصاره با استفاده از کیت شرکت man اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری میزان مهار گلیکوزیلاسیون هموگلوبین ابتدا خون از داوطلب سالم تهیه و از EDTA به عنوان ماده ضدانعقاد استفاده گردید. سپس گلبول‌های قرمز سه بار با محلول NaCl ۰/۱۴ مولار شسته شد و سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون گلبول‌های قرمز لیز شده با ۲ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۰/۰۱ مولار دارای PH=۷ و نیز ۰/۵ میلی‌لیتر CCl₄ مخلوط گردیده و قسمت لیز شده با استفاده از سانتریفوژ جدا شده، لایه فوقانی جدا و غلظت هموگلوبین با روش درابکین^۲ تعیین گردید (۲۰) و (۲۱). به منظور اندازه‌گیری اثرات عصاره فلفل بر روی مهار گلیکوزیلاسیون ابتدا ۲ سری لوله به عنوان تست (حاوی عصاره) و شاهد (فاقد عصاره) انتخاب گردید. سپس به تمام لوله‌ها هموگلوبین ۵ گرم درصد، گلوکز ۲ گرم درصد و جنتامایسین ۲۰ میلی‌گرم درصد اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردید. سپس هموگلوبین گلیکوزیله به وسیله TCA ۲۰٪ رسوب داده شد. به رسوب حاصل ۱ ml بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با PH=۷/۴ و ۰/۵ ml اسید اگزالیک ۰/۳ نرمال اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در بن ماری جوش قرار داده شد. پس از سرد شدن ۰/۵ ml تری کلرواستیک اسید ۴۰٪ اضافه و پس از جدا کردن ۱ ml از مایع رویی، ۰/۵ ml محلول تیوبایتوریک اسید ۰/۰۵ مولار به آن اضافه گردید و موج ۴۴۳ اندازه‌گیری شد. میزان جذب اندازه‌گیری شده توسط شاهد به عنوان گلیکوزیلاسیون صد در صد در نظر گرفته شد (۲۴-۲۲).

LDL از خون داوطلبان مرد نرمال با استفاده از دستگاه اولتراسانتریفوژ جدا و آنگاه در بافر فسفات سالین ۰/۰۱ مولار با PH=۷ به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد دیالیز گردید. به این ترتیب که به ازای هر ۴ سی‌سی پلاسما جدا شده ۱/۲۶۴gr برمید پتاسیم^۳ اضافه گردید. سپس محلول

نیز تحقیقات انجام شده تأثیرات مهار پراکسیداسیون لیپیدها را توسط میخک و زنجبیل نشان داده‌اند (۱۳). فلفل دارای اسانس روغنی فرار و آلکالوئیدهایی به نام چاویسین، پی‌پیرین، پی‌پیریدین می‌باشد و به علاوه در میوه آن ماده پی‌پیرین وجود دارد. ضماد فلفل برای معالجه و رفع تورم غده و تحلیل جوش و کورک، کولیک، رماتیسم و سردرد به کار می‌رود. مقوی معده و محرک اشتها بوده، مدر، بادشکن، گرم‌کننده و ضدسم و برای رفع انواعی از مسمومیت‌های غذایی به کار می‌رود (۱۴). انیسون نیز نیروی دفاعی بدن را در مقابل عفونت‌ها زیاد می‌کند و خواص ضدویروس و محرک میخک هم به اثبات رسیده است (۱۵). با توجه به این که گزارشی راجع به اثرات آنتی‌اکسیدانی فلفل سیاه بر سه سیستم اکسیداتیو، اکسیداسیون دیواره سلول‌های کبدی، اکسیداسیون LDL و قندی شدن غیرآنزیمی هموگلوبین موجود نیست، تحقیق حاضر طراحی گشت تا در صورت مشاهده تأثیرات مطلوب، از این گیاه بتوان جهت جلوگیری از عوارض دیابت و آترواسکلروز و بیماران کبدی بهره جست.

روش کار

این مطالعه از نوع تجربی است. فلفل سیاه تهیه و پس از تهیه نمونه هرباریومی شناسایی گردید. یک تا دو گرم از چاشنی ساییده شده را وزن نموده، سپس عصاره گیاهان مربوطه با استفاده از روش خیساندن تهیه شد. بدین‌منظور ۲-۱ گرم از چاشنی ساییده شده را وزن کرده و سپس حاصل توزین به درون یک ارلن صد میلی‌لیتری انتقال داده شد. الکل ۷۰ درجه به عنوان حلال اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت در یخچال قرار داده شد تا عمل خیساندن کامل و ترکیبات گیاه از آن استخراج شود و سپس توسط کاغذ صافی محتویات داخل ارلن را صاف نموده و درون شیشه ساعت خشکی که قبلاً مشخص شده بود، ریخته شد. سپس عصاره خشک حاصل در میزان معینی DMSO حل و پس از زدن برچسب برای مراحل بعدی آزمایش نگهداری شد (۱۶). به منظور به دست آوردن هیاتوسیت کبدی پس از بیهوش کردن موش صحرایی با کلروفورم، ابتدا حفره شکمی باز و رگ‌های خونی کبد مسدود شد. سپس با محلول هانک بدون کلسیم که به عنوان محلول پرفیوژن استفاده گردید، کبد را بدون خون نموده، در بافر تریس شستشو داده شد. پس از هموژن نمودن، هموژن حاصله صاف گردیده و محلول ممکن بدست آمد (۱۷). هیاتوسیت‌های جدا شده مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ گردید و آنگاه با تریپان بلو رنگ‌آمیزی و درصد سلول‌های زنده اندازه‌گیری شد. برای نگهداری این سلول‌ها، بایستی روی یخ قرار داده شوند (۱۸).

¹ Malon Dialdehyde (MDA)

² Drabkin

³ KBr

داده شد که عصاره فلفل سیاه در غلظت‌های ۱۰، ۲/۵ و ۵/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۱۱/۷۸، ۵/۰۳ و ۲/۳٪ تولید MDA را مهار می‌کنند. در آزمایشی که به منظور مهار پراکسیداسیون لیپیدهای دیواره سلولی با استفاده از اندازه‌گیری ترشح آنزیمی AST از سلول‌های کبدی انجام گرفت (جدول ۲) نشان داده شد که عصاره خالص فلفل سیاه در غلظت‌های ۱۰، ۲/۵ و ۵/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۳۳/۳، ۲۵/۳۰ و ۲۱/۴۹ درصد مانع از نشت سلولی AST می‌شود. در آزمایشی که به منظور بررسی اثرات ضد گلیکوزیلاسیون آن انجام گرفت مشخص شد که در غلظت‌های ۱، ۵/۰ و ۲۵/۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۱۲/۴، ۱۵/۲۵ و ۱۷/۳۵ درصد مانع از عمل گلیکوزیلاسیون هموگلوبین می‌گردد (جدول ۳). در آزمایشی که به منظور بررسی اثرات ضد اکسیداسیون LDL انجام گرفت مشخص شد که در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثرات ضد اکسیداسیون بالایی دارد؛ به طوری که میزان فاز تأخیری^۱ را از زمان ۴۰ دقیقه در نمونه کنترل به ۱۰۰ دقیقه در نمونه تست افزایش داد (نمودار ۱).

EDTA با غلظت ۱ mg/ml با PH= ۷/۴ ساخته و ۹ سی‌سی به هر لوله اولتراسانتروفیوژ ریخته شد. سپس با یک لوله بلند و باریک پلاسمای مخلوط با KBr به لوله اولتراسانتروفیوژ منتقل شد؛ به طوری که محلول پلاسمای سنگین زیر محلول EDTA قرار گرفت و لوله‌ها به طور کامل پرو در لوله کاملاً بسته شد. لوله‌ها در روتور به مدت ۲ ساعت با دور ۶۰۰۰ rpm قرار گرفت. تنها باند جدا شده از پلازما بعد از ۲ ساعت باند LDL می‌باشد که قابل جداسازی است (۲۵). پس از دیالیز مقدار پروتئین LDL با روش لوری تعیین مقدار شد (۲۶). آنگاه در حضور سولفات مس ($1/66 \mu\text{M}$) اکسید گردید. غلظت‌های ۱، ۲/۵، ۵/۵ و ۲۵/۳۰ میکروگرم از عصاره انتخاب و میزان تغییر اکسیداسیون LDL در حضور و فقدان عصاره در 234nm بررسی گردید (۲۵ و ۲۷ و ۲۸). هر آزمایش ۳ بار تکرار و میانگین مقادیر، گزارش گردیده است.

نتایج

در آزمایشی که جهت بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره فلفل سیاه بر هپاتوسیت‌های کبدی انجام گرفت (جدول ۱) نشان

جدول ۱- مقایسه میزان MDA تولید شده طی پراکسیداسیون لیپیدی در سیستم دیواره سلول‌های کبد در غلظت‌های مختلف عصاره فلفل سیاه

گیاه	غلظت نهایی عصاره فلفل ($\mu\text{g/ml}$)	Cont MDA ($\mu\text{M/L}$) (Mean \pm SD)	Test MDA ($\mu\text{M/L}$) (Mean \pm SD)	درصد کاهش اکسیداسیون
-	۰	۱۹۶/۰۷ \pm ۶۶/۳۳	۱۷۵۵/۹۹ \pm ۲۷/۷۰	-
فلفل سیاه	۱۰	۱۶۸۱/۹۱ \pm ۴۳/۵۲	۱۴۸۳/۶۵ \pm ۵۱/۸۷	۱۱/۷۸
	۲/۵	۱۶۹۲/۸۱ \pm ۲۶/۱۴	۱۶۰۷/۸۴ \pm ۱۵۸/۴۹	۵/۰۱
	۵/۵	۱۷۰۱/۵۲ \pm ۶۰/۷۳	۱۶۶۲/۳۱ \pm ۱۰۹/۴۳	۲/۳

مقدار ۱۰۶ هپاتوسیت در هر میلی‌لیتر انتخاب و با غلظت‌های مختلف عصاره فلفل سیاه در شرایط آزمایشگاه با $tBH(1/5 \text{ mM})$ مخلوط شد. سپس میزان MDA تولید شده در طول موج 535 nm اندازه‌گیری گردید. اعداد به دست آمده به صورت $Mean \pm SD$ بیان شده‌اند. هر عدد میانگین سه بار آزمایش است.

جدول ۲- مقایسه میزان AST آزاد شده طی پراکسیداسیون لیپیدی در دیواره سلول‌های کبدی در غلظت‌های مختلف عصاره فلفل سیاه

گیاه	غلظت نهایی عصاره ($\mu\text{g/ml}$)	Cont AST (U/L) (Mean \pm SD)	Test AST (U/L) (Mean \pm SD)	درصد کاهش اکسیداسیون
-	۰	۶۵/۸۱ \pm ۴/۳۹	۹۰/۶۱ \pm ۴/۷۱	-
فلفل سیاه	۱۰	۶۹/۸۳ \pm ۳/۴۹	۵۲/۳۹ \pm ۳/۷۸	۲۵/۱۱
	۲/۵	۱۰۹/۹۹ \pm ۱/۷۴	۵۸/۱۹ \pm ۵/۶۱	۴۷/۰۹
	۵/۵	۱۲۲/۸۲ \pm ۲/۶۶	۱۰۸/۲۵ \pm ۵/۲۴	۱۱/۸۴

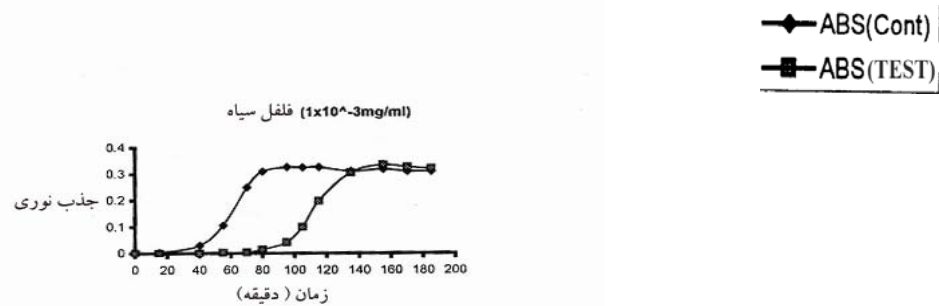
تعداد ۱۰۶ هپاتوسیت در هر میلی‌لیتر انتخاب و با غلظت‌های مختلف عصاره فلفل سیاه در شرایط آزمایشگاه با $tBH(1/5 \text{ mM})$ مجاورت گردید. سپس طبق روش میزان فعالیت آنزیم در طول موج 340 nm اندازه‌گیری گردید. اعداد به دست آمده به صورت $Mean \pm SD$ بیان شده‌اند. هر عدد میانگین سه بار آزمایش است.

جدول ۳: مقایسه میزان گلیکوزیلاسیون هموگلوبین در مجاورت غلظت‌های عصاره فلفل سیاه

گیاه	غلظت نهایی عصاره ($\mu\text{g/ml}$)	میزان جذب نوری (Mean \pm SD)	درصد مهار گلیکوزیلاسیون
-	۰ (کنترل)	۰/۲۴۲ \pm ۰/۰۲۵	-
فلفل سیاه	۱	۰/۲۱۲ \pm ۰/۰۲۰	۱۲/۳۹
	۵/۵	۰/۲۰۵ \pm ۰/۰۲۰	۱۵/۲۵
	۲۵	۰/۲۰۰ \pm ۰/۰۷۰	۱۷/۲۵

غلظت ثابتی از هموگلوبین (۵ گرم درصد) و گلوکز طبق روش‌ها انتخاب گردید و با غلظت‌های مختلف عصاره فلفل سیاه در شرایط آزمایشگاه انکوبه شد. سپس میزان جذب نوری در طول موج 443 nm اندازه‌گیری و درصد مهار گلیکوزیلاسیون محاسبه گردید اعداد به دست آمده به صورت $Mean \pm SD$ بیان شده‌اند. هر عدد میانگین سه بار آزمایش است.

¹ lag phase



نمودار ۱- اثر عصاره فلفل سیاه در غلظت $1\mu\text{g/ml}$ بر اکسیداسیون LDL

غلظت ثابتی از LDL انتخاب و با غلظت یک میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره خالص فلفل سیاه در شرایط آزمایشگاه در مجاورت سولفات مس (با غلظت $1/16$ میکرومولار) قرار گرفت. سپس میزان جذب این کنژوگه تشکیل شده در طول موج ۲۳۴ نانومتر در زمان تعیین شده اندازه‌گیری شد.

بحث و نتیجه‌گیری

قرار گرفت. این ماده در مقابل اثرات هیپاتوتوکسیک ترشیوبوتیل هیدروپراکساید و تتراکلریدکربن اثر حفاظت‌کننده داشته و این اثر را با کاهش پراکسیداسیون لیپید، جلوگیری از کاهش GSH و گروه‌های تیول و کاهش تراوش ALT در موش‌های مسموم نشان داده است. البته این اثر Piperine در مقایسه با Silymarin یک ترکیب شناخته شده دیگر، حفاظت‌کبدی کمتری را دارا بوده است (۳۱). نتایج این مطالعات و مطالعه‌ای که ما بر روی اکسیداسیون LDL و هیپاتوسیت‌های کبدی و قندی شدن هموگلوبین انجام دادیم، نشان می‌دهد که فلفل سیاه از خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردار است و می‌توان از آن به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی و مکمل غذایی در بیماران دیابتیک، کبدی و افراد مستعد به آترواسکلروز استفاده نمود.

در بررسی سیستم اکسیداسیون دیواره هیپاتوسیت‌های کبدی فلفل سیاه اثر آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهد. در سیستم قندی شدن غیرآنزیمی هموگلوبین نیز اثر آنتی‌اکسیدانی مطلوبی نشان داد که این اثر با کاهش دوز افزایش می‌یابد. در سیستم اکسیداسیون LDL نیز فلفل سیاه به طور وابسته به دوز، اثر آنتی‌اکسیدانی دارد. از آنجا که در ترکیب گیاه فلفل سیاه ترکیبات Sesquiterpenoid و ترپن‌ها وجود دارند، اثرات آنتی‌اکسیدانی فلفل سیاه قابل توجه است (۲۹). در یک بررسی انجام شده بر فلفل سیاه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن بیش از آنتی‌اکسیدانی طبیعی α -توکوفرول، گزارش شده است (۳۰). در تحقیق دیگری که بر Piperine، یک آلکالوئید موجود در عصاره فلفل سیاه، انجام شد، اثرات آنتی‌هیپاتوتوکسیک آن مورد بررسی

References

- 1- Leuke DS, Rankin SM. The oxidative modification. *Biochem J* 1990; 270: 471-748.
- 2- Laster P, Midori H, Toshikazu Y. Antioxidant food supplements in human health ... Sandiego: Academic Press; 1999: 371-372.
- 3- Cross AR, Jones OTG. Enzymatic mechanisms of superoxide production. *Biochimica et Biophysica Acta* 1991; 1057: 281-298.
- 4- Delattre J, Bonne Font-Rousselot D. Oxidative stress, free radicals and ageing. *Biotech Lab International* 1998; 21-23.
- 5- Cross C. Oxygen radical and human disease. *Ann Int Med* 1987; 107: 526-545.
- 6- Miki M. Free radical chain oxidation of rat red blood cell by molecular oxygen and its inhibition by α -Tocopherol. *Arch Biochem Biophys* 1989; 258(2): 373-380.
- 7- Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radical and catalytic metal ions in human disease: An Overview *Methods in Enzymology* 1989; 186: 1-85.
- 8- Rice Evans CA, Eurdon RM. Free radical damage and its control. *Amsterdam Elsevier* 1994; 113: 46-49.
- 9- Leung FY. Trace elements that act as antioxidants in parenteral micronutrition. *J Nutr Biochem* 1998; 9: 304-7.
- 10- Urtis CA, Ash wood ER. *Fundamentals of clinical chemistry*. 4th ed. London: WB Saunders Company; 1996: 299-301, 341.
- 11- Peng J, Jones GL, Watson K. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidants supplements. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(11): 1598-1606.
- 12- Chan AC, Chow CK, Chiu D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222(3): 274-282.
- 13- Kempaiah PK, Srinivasan K. Antioxidant status of red blood cells and liver in hypercholesterolemic rats fed hypolipidemic spices. *Int J Vitam Nutr Res* 2004; 74(3):199-208.

- ۱۴- میرحیدر ح. معارف گیاهی. جلد دوم. تهران: انتشارات نشر و فرهنگ اسلامی. ۱۳۷۲: ۲۶۸، ۴۱۶، ۴۳۷، ۳۷۰، ۳۶۲، ۳۴۱، ۳۳۵، ۳۲۳.
- 15- Chevallier A. The encyclopedia of medical plants. Dorling Kindersley Limited 1997; pp. 80, 91, 95, 182, 246.
- ۱۶- صمصام شریعت ه. عصاره‌گیری و استخراج مواد مؤثر گیاهان دارویی و روش‌های شناسایی آنها. اصفهان: انتشارات مانی. سال ۱۳۷۱: ۱۲-۱۳.
- 17- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation methods in enzymology. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-310.
- 18- Cook IA, Mitchell IB. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem* 1989; 179: 1-7.
- 19- Kostner K. Is oxidative stress causally linked to unstable angina pectoris? A study in 100 C.A.D patients and matched control. *Cardiovasc Res* 1997; 36: 330-336.
- 20- Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspects of hematology in: Burits CA, Ashwood ER. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1994: 2020-2030.
- 21- Fluchiger R, Winter Halter KH. Biochemical and clinical aspects of hemoglobin I aspects of hemoglobin abnormalities. New York: Academic Press; 1978: 208.
- 22- Asgary S, Naderi GH, Sarrafzadegan N, et al. Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. *Pharm Acta Helv* 1999; 73(5): 223-6.
- 23- Asgary S, Naderi GH, Sarrafzadegan N, et al. The inhibitory effects of pure flavonoids on in vitro protein glycosylation. *Herbal Pharmacotherapy* 2002; 2(2): 47-57.
- 24- Vankampen EJ, Zijlstra WG. Determination of hemoglobin and its derivatives. *Accl Clin Chem* 1985; 8: 1414.
- 25- Steven P, Gieseg H. Low density lipoprotein is saturable by pro-oxidant copper. *FEBS Lett* 1994; 343: 188-194.
- 26- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Proteine measurement with the folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- 27- Regnstrom J, Nilsson J, Tornvall P, et al. Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet* 1992; 339: 1183-1184.
- 28- Tringali C, Spatafora C, Longo OD. Bioactive constituents of the bark of *Parkia biglobosa*. *Fitoterapia* 2000, 71(2):118-25.
29. Maskell IE, Winner LM, Markwell PJ, et al. Does the canning process alter the physiological effects of dietary fiber in the dog? *J Nutr* 1994;124 (12): 2704S-2706S.
- 30- Nakatani N, Intanai R, Ohto H. Chemical constituents of peppers (*piper spp*) and application to food preservation: Naturally occurring antioxidative compounds. *Environ Health Perspect* 1986; 67: 135-42.
- 31- Koul IB, Kapil A. Evaluation of the liver protective potential of piperine, on active principle of black and long peppers. *Planta Med* 1993 Oct; 59(9): 413-7.