# استخلاص وتوصيف الزيت الطيار لنبات الحريق (*Urtica dioica*) باستخدام كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) وفعاليته المضادة للأكسدة باستخدام اختبارات الرش والقصر بالبيتاكاروتين والـ ( $DPPH^{\cdot}$)

فراس هاشم قمر [1] و محمد حمود السعدي [2]
[1] معهد تكنولوجيا / بغداد.
[2] كلية التربية / جامعة بابل.

تاريخ تقديم البحث 2008/3/2 - تاريخ قبول البحث 2009/6/3

## ABSTRACT

The study included the extraction of the volatile oils from the aerial parts of (*Urtica dioica*) by hydrodistillation. Determine the amount of extracted oil and identified of its components by using thin layer chromatography (TLC), and detected the antioxidant activity by using three tests of different mechanism exemplified by (spraying of β-carotene), (β-carotene bleaching) and (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ($DPPH^{\cdot}$). Five concentration of oil were used are (500, 1000, 1500, 2000, 2500) ppm also Butylated hydroxy toluene (BHT) in concentration (50) ppm was used as control in second and third tests.

The hydrodistillation method showed that yield of volatile oil was about (0.5)% without color and odor. The thin layer chromatography (TLC) showed that more than one component are found in the volatile oil. The volatile oil has high antioxidant activity in three tests in high especially concentration that used in study.

## الخلاصة

تناولت هذه الدراسة استخلاص الزيت الطيار للأجزاء الهوائية لنبات الحريق ( *Urtica dioica* ) بطريقة التقطير المائي (Hydrodistillation). قدرت كمية الزيت المستخلص وتم التعرف على مكوناته باستخدام كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (Thin Layer Chromatography) (TLC), والكشف عن فعاليته المضادة للأكسدة باستخدام ثلاث اختبارات متباينة الآلية تمثلت بالرش بالبيتاكاروتين -praying of ß (carotene) وقصر لون البيتاكاروتين (β-carotene bleaching) و الـ (-2,2-diphenyl-1 picrylhydrazyl) (.DPPH). استخدمت خمس تراكيز تدريجية من الزيت (500، 1000، 1500، 2000، 2500) جزء من المليون واستخدمت مادة الـ (Butylated hydroxy toluene )(BHT) بتركيز (50) جزء من المليون كسيطرة للمقارنة بالاختبارين الثاني والثالث.

سجلت طريقة الاستخلاص حاصل زيتي طيار قدرت إنتاجيته بـ (0.5)% وكان عديم اللون والرائحة . بينت نتائج التحليل بتقنية كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) وجود أكثر من مكون للزيت الطيار. سجل الزيت الطيار فعالية عالية مضادة للأكسدة في الاختبارات الثلاثة وخصوصاً بالتراكيز العالية المستخدمة في الدراسة.

## المقدمة

نبات الحريق (*Urtica dioica*) من النباتات الطبية الهامة ويعرف بالقراص ينتمي إلى العائلة الحريقية (Urtieaceae)، ومن أسمائه الشائعة (Stinging nettle و Great nettle)، ويتراوح طول الساق بين (2- 3) قدم وأحيانا يصل إلى (4) أقدام وقد يتفرع من معظم نباتات هذه الفصيلة أعشاب طويلة لها أوراق بسيطة متبادلة أو متقابلة ذات اذينات شكلها بيضوي (Ovate)، وفي بعض الأحيان تكون قلبية (Heart- shaped) عند القاعدة، وذات حواف مسننة بعمق (Deeply serrate)، والأغصان يمكن أن تتفرع تحت الأرض بحيث تتضاعف المجاميع الخضرية فوقها، وتغطى الأجزاء الهوائية بشعيرات لاسعة صغيرة ولكنها تكثر بشكل خاص في الجهة السفلية للورقة وفي السيقان، إذ تحتوى على مادتي الهستامين (Histamine) وحامض الفورميك (Formic acid) المسببين الرئيسيين للحساسية الجلدية

عند التلامس مع هذا النبات. ينمو هذا النبات بشكل جيد في الأراضي الغنية بالنتروجين ويزهر بين شهري حزيران وأيلول ( June-September) (1).

إن احتواء نبات الحريق على الهستامين وحامض الفورميك والفيتامينات بالإضافة إلى المعادن والتي من أهمها الحديد والسيلكا (2, 3)، جعله مفيد كعلاج لفقر الدم والنقرس والتهاب المفاصل، وذلك لأنه يساعد على تقليل نسبة حامض اليوريك في الجسم ويستعمل أيضاً كمرهم لعلاج البواسير، وأشارت الدراسات الحديثة إلى كفاءة منقوع الأوراق في تقليل الاحتقان البروستاتي المتورم والوقاية من سرطان البروستات (4, 5, 6).

تهدف هذه الدراسة إلى استخلاص الزيت الطيار من الأجزاء الهوائية لنبات الحريق (*Urtica dioica*) وتقدير كميته، والتعرف المبدئي على مكوناته باستخدام كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) (Thin Layer Chromatography)، والكشف عن فعاليته المضادة للأكسدة باستخدام اختبارات متباينة الآلية تشمل الرش والقصر بالبيتاكاروتين (Spraying and bleaching of ß-carotene) والـ (DPPH.) (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) .

## المواد وطرائق العمل

**1- المادة النباتية** :

جمعت العينة النباتية من منطقة اليوسفية جنوب مدينة بغداد شهري حزيران وتموز من العام (2008)، وعرف بالاعتماد على (1)، وتم التأكد من الوضع التصنيفي للنبات من خلال المقارنة بعينات مجففة في معشبة كلية الزراعة في جامعة بغداد، وبعد ذلك تم تجفيف الأجزاء الهوائية للنبات في الفرن على درجة (40)°م ومن ثم استخلص منها الزيت الطيار.

**2- استخلاص الزيت الطيار :**

استخلص الزيت الطيار بالتقطير المائي (Hydrodistillation) باستخدام الطريقة المنشورة في الأدبيات (7)، حيث تم وزن (10) غم من الأجزاء الهوائية للنبات مع (600) مل من الماء المقطر ووضعت في منظومة التقطير وأجريت عملية التقطير لمدة (5- 6) ساعات، ثم أخِذ ناتج عملية التقطير (الزيت والماء) بعد التكثيف وشبع بكلوريد الصوديوم (NaCl) ثم الاستخلاص بالايثر وإزالة الماء باستخدام كبريتات الصوديوم اللامائية (Na2So4 anhydrous)، ثم التخلص من المذيب باستخدام جهاز المبخر الدوار (Rotary evaporator) والاحتفاظ بالزيت الناتج لإجراء الاختبارات .

**3- توصيف الزيت بتقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)**

في البداية تم تنشيط ألواح السليكاجل (20×20 سم, 0.25, F254 ملم، E. Merck ، Germany،Darmstadt) بالتسخين لمدة ساعة عند درجة حرارة (105) °م، بعد ذلك تم أخذ كمية (100) ميكروليتر من الزيت ووضعت في أسفل الصفيحة (عند خط البداية) بعد ترك مسافة حوالي (1,5) سم أسفل الصفيحة، ثم نقل لوح السليكا جل ووضع داخل الحوض الزجاجي، وتم استخدام مزيج من البنزين: خلات الإيثيل بنسبة (v/v 3:97) لفصل مكونات الزيت الطيار، وبعد إتمام عملية الفصل تم الرش بجوهر الإظهار ( Vanillin sulfuric acid) وتم فحص الحزم المتكونة في الضوء المرئي إذ تم تحديد اللون وحساب معامل الإبطاء أو الإعاقة ($R_f$) (Retardation factor) لكل حزمة متكونة حسب ما جاء في الطريقة المنشورة (8).

**4- اختبارات التأثير المضاد للأكسدة**:

**4-1- طريقة الرش بالبيتاكاروتين**:

حزم الزيت المفصولة على صفائح الـ (TLC) الطريقة أعلاه تم اختبار فعاليتها المضادة للأكسدة باستخدام طريقة الرش بالبيتاكاروتين وذلك طبقا لطريقة (9)، حيث أذيب (9) ملغم من البيتاكاروتين في (30) مل من الكلوروفورم وأضيفت قطرتين من حامض اللينوليك (Linoleic acid) النقي و (60) مل من الايثانول، حيث رش هذا الخليط على الألواح. بعد عملية الرش عرضت الألواح إلى الضوء العادي لمدة ( 2-6 ) ساعات حتى يتم قصر لون البيتاكاروتين والحزم التي تحتفظ باللون الأصفر لأطول فترة ممكنة تمثلت المكونات المضادة للأكسدة بحيث تتناسب كثافتها اللونية مع الفعالية.

**4-2- طريقة قصر لون البيتاكاروتين:**

في هذه الطريقة أذيب (0.02) غم من البيتاكاروتين في (100) مل كلوروفورم وأخذ منها (2) مل لتضاف إلى (0.04) غم من حامض اللينوليك و (0.4) غم من (tween-20) وبعد التخلص من الكلوروفورم باستخدام المبخر الدوار عند درجة (50) $^{\circ}$م أضيف (100) مل من الماء المقطر المؤكسج، اخذ ( 5) مل من هذا المستحلب وأضيف إليه (2) مل من الزيت الطيار المخفف (500، 1000، 1500، 2000، 2500 ) جزء من المليون، ثم قيست الامتصاصية عند طول موجي (470) نانوميتر (مع الأخذ في الاعتبار تصفير الجهاز على عينة مكونة من الأيثانول فقط) فضلا عن وجود العينيتين القياسيتين، السالبة المكونة من نفس الكمية من المستحلب مضافا إليها (2) مل من الأيثانول، والموجبة المكونة من الكمية ذاتها من المستحلب مضافا إليها (2) مل من الـ (BHT) بتركيز (50) جزء من المليون. وضعت الأنابيب في حمام مائي عند درجة حرارة (50) $^{\circ}$م وقرأت الامتصاصية كل (15) دقيقة حتى اختفاء لون العينة القياسية السالبة (بحيث يؤخذ معدل القراءة لثلاثة مكررات) (10).

**4-3- اختبار الـ (DPPH) :**

أجرى الاختبار بالاعتماد على طريقة (11) مع بعض التحوير من خلال حساب الفعالية المضادة للأكسدة على أساس النسبة المئوية لمعدل اختفاء لون (DPPH·) حيث أجريت المعاملات التالية لكل تركيز من تراكيز الزيت الخمسة السابقة:

(DPPH·) (Blank) الامتصاصية عند (517) نانوميتر لـ (4) مل من الأيثانول + (1) مل من (0.1) ملي مول من (DPPH·) المذاب في الميثانول.

(DPPH·) (Sample) الامتصاصية عند ( 517 ) نانوميتر لـ (4) مل من العينية في الأيثانول + (1) مل من (0.1) ملي مول من (DPPH·) المذاب في الميثانول.

القياسي للعينة = الامتصاصية عند (517) نانوميتر لـ (4) مل من العينة في الأيثانول + (1) مل من الميثانول.

حضرت المعاملات السابقة وروعي إجراء المزج الجيد للمكونات في كل معاملة ووضعت في حمام مائي على درجة (25) $^{\circ}$م لمدة (30) دقيقة ثم قيست الامتصاصية، مع مراعاة تصفير جهاز مقياس الطيف الضوئي (Spectrophotometer) باستخدام (4 مل أيثانول + 1 مل ميثانول) المعد تحت نفس الظروف السابقة وبعد اخذ القراءات طبقت المعادلة التالية لحساب النسبة المئوية لاختفاء لون الـ (DPPH·) كما يلي:

$$\text{معدل اختفاء اللون (\%)} = \frac{(\text{DPPH}^{\cdot}_{\text{(قياسي للعينة)}} + \text{DPPH}^{\cdot}_{\text{(Sample)}}) - \text{DPPH}^{\cdot}_{\text{(Blank)}}}{\text{DPPH}^{\cdot}_{\text{(Blank)}}} \times 100$$

تكرر نفس الخطوات السابقة مع استبدال العينة بمحلول للمادة (BHT) (50) جزء من المليون كمضاد للأكسدة للمقارنة.

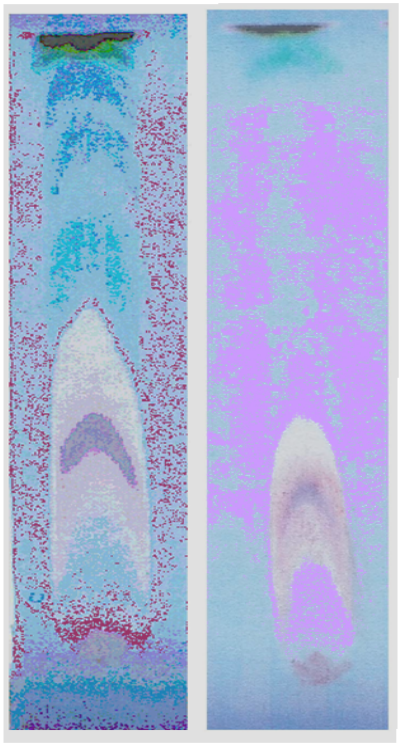
## النتائج والمناقشة

**1- توصيف الزيت الطيار:**

سجل نبات الحريق (*U. dioica*) حاصل زيتي طيار ذو لون ابيض عديم الرائحة قدر بـ (0.5)% عند استخلاصه من الأجزاء الهوائية بالتقطير المائي، والشكل (1) يبين مكونات الزيت الطيار عند فحصة بطريقة كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) باستخدام الضوء المرئي والأشعة فوق البنفسجية، ومن خلال الجدول (1) نلاحظ ظهور ثلاث حزم عند الفحص تحت الضوء المرئي ( $R_f$ = 0.412, 0.944، 0.964 ) وست حزم عند الفحص بالأشعة فوق البنفسجية ($R_f$ = 0.412، 0.653، 0.825، 0.912، 0.944، 0.964 ) إذ تشترك الثلاث حزم التي تظهر عند الفحص بالضوء المرئي نفسها عند الفحص بالأشعة فوق البنفسجية في حين تتفرد الحزم الثلاث الباقية (0.653، 0.825، 0.912) فقط عند الفحص بالأشعة فوق بنفسجية حيث يتضح من هذه النتيجة وجود أكثر من مكون للزيت الطيار لهذا النبات.

وهذه الدراسة تعد استكمالا لدراسات أخرى شارت إلى احتواء نبات الحريق على مكونات عديدة، خصوصاً وان المستخلصات المائية الكحولية لهذا النبات تحتوي على مركبات متنوعة كالسكريات المتعددة (12)، كما أكد (13) على إن المستخلصات القطبية لهذا النبات تحتوي على مواد لكنينية منها neoolivil-(+) وsecoisolariciresinol -(-) . وقد اثبت (14) بأن المستخلص الميثانولي للأجزاء الهوائية لنبات الحريق يحتوي على مركبات كلايكوسيدية – فلافينودية عند استخدام الطرق الكروماتوكرافية والضوئية ومن أهما: (Quercetin-3-O-ratinoside)، (Kaempherol-3-O-rutinoside)، (Isorhamnetin-3-O-glucoside) .

كما ويحتوي المستخلص المائي لهذا النبات على مركبات فينولية بكميات جيدة يتراوح تركيزها بين (68 – 4162) ملغم / لتر (2)، هذا وتم فصل العديد من الأحماض الفينولية والمركبات الفلافينودية من المستخلصات المائية والميثانولية لهذا النبات (15)، وقد ذكر (16) إن المستخلص المائي لنبات الحريق يحتوي على مركبات فينولية شبيهة بالـ(Pyrocatechol).



B A

شكل -1: فصل مكونات الزيت الطيار لنبات الحريق باستخدام ألواح الـ (TLC) باستخدام مذيب (البنزين : خلات الاثيل، 97 : 3 ، V/V) وباستخدام جوهر الإظهار (Vanillin Sulfuric Acid)

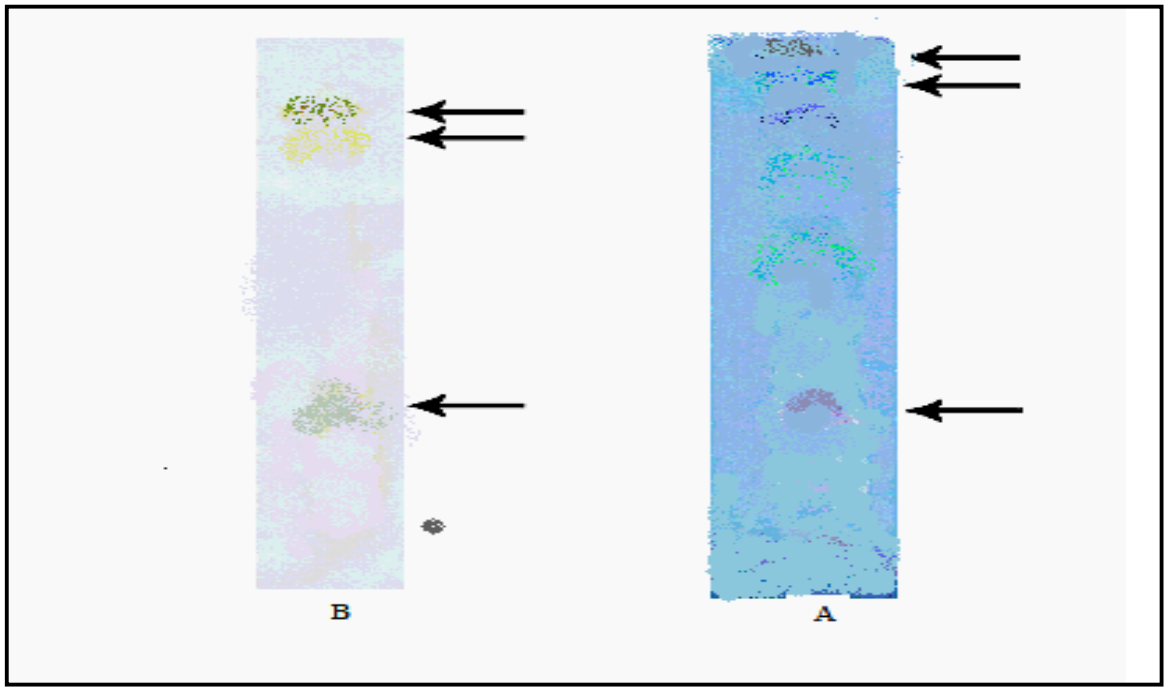
A : عند الفحص بالضوء المرئي
B : عند الفحص بالأشعة فوق البنفسجية

جدول -1: قيم الـ ($R_f$) وألوان الحزم على ألواح الـ (TLC) للزيت الطيار لنبات الحريق .

| طريقة الفحص | خصائص الحزم | | |
|---|---|---|---|
| | **$R_f$** | اللون | العدد |
| الضوء المرئي | *0.412 | بنفسجي محمر | 3 |
| | 0.944 | اخضر مصفر | |
| | *0.964 | بني | |
| الأشعة فوق البنفسجية | *0.412 | بنفسجي | 6 |
| | 0.653 | ازرق | |
| | 0.825 | ازرق | |
| | 0.912 | ازرق | |
| | *0.944 | اخضر مصفر | |
| | *0.964 | بني محمر | |

**2- التأثير المضاد للأكسدة:**

يوضح الشكل (2) فحص التأثير المضاد للأكسدة بطريقة الرش بمحلول البيتاكاروتين وحامض اللينوليك للزيت الطيار لنبات الحريق، حيث كانت نتيجة الأختبار ايجابية في ثلاث حزم ($R_f$ = 0.412، 0.944، 0.964) والتي احتفظت باللون الأصفر بعد الرش بالبيتاكاروتين والتي تم الإشارة إليها في الجدول (2) في حين أظهرت الثلاث حزم المتبقية نتيجة سلبية للاختبار وهي ($R_f$ = 0.653، 0.825، 0.912).



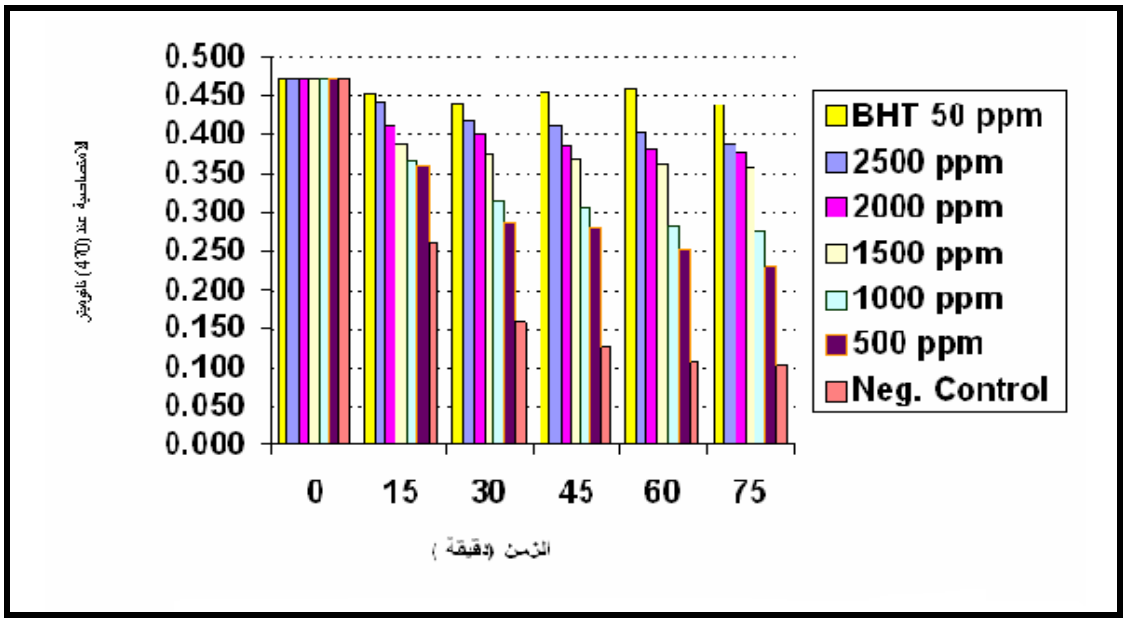

شكل -2: التأثير المضاد للأكسدة لبعض الحزم المفصولة من زيت الطيار لنبات الحريق باستخدام اختبار الرش بالبيتاكاروتين
A قبل الرش : B بعد الرش

جدول -2: نتائج الفحص للقابلية المضادة للأكسدة للزيت الطيار لنبات الحريق باستخدام اختبار الرش بالبيتاكاروتين

| الحزمة ($R_f$) | نتيجة الفحص |
|---|---|
| 0.412 | + |
| 0.653 | - |
| 0.825 | - |
| 0.912 | - |
| 0.944 | + |
| 0.964 | + |

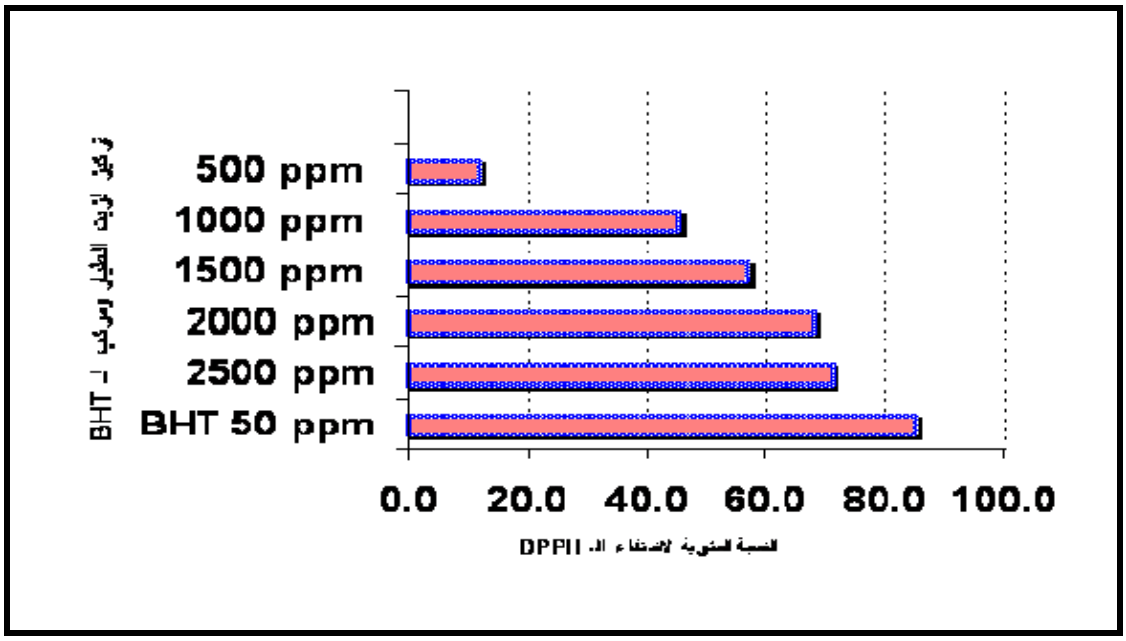
+ : وجود فعالية مضادة للأكسدة (الحزم التي احتفظت باللون الأصفر).
- : عدم وجود فعالية مضادة للأكسدة .

يبيّن الشكل (3) فحص الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة الأكسدة الاقترانية للبيتاكاروتين وحامض اللينوليك والذي يظهر أن الزيت الطيار للحريق يمتلك نشاط مضاد للأكسدة يزداد بزيادة التركيز من خلال استقرار منحنى الامتصاصية فوق(385) نانوميتر للتراكيز الثلاث المرتفعة (2500، 2000، 1500) جزء من المليون وعلى مدى (75) دقيقة ومقارب للسيطرة الموجبة المتمثلة بمضاد الأكسدة القياسي (BHT) (50) جزء من المليون وفي نفس الوقت أعطى التركيزين الأخيرين (1000، 500 ) جزء من المليون فعالية متوسطة وأعلى من السيطرة السالبة (مستحلب حامض اللينوليك – Tween- 20 الخالي من البيتاكاروتين ).




شكل-3: : قياس النشاط المضاد للأكسدة لتركيز مختلفة من الزيت الطيار لنبات الحريق بطريقة الأكسدة الاقترانية للبيتاكاروتين

في محاولة للتأكد من التأثير المضاد للأكسدة ومعرفة الميكانيكية التي يعمل بها الزيت كمضاد للأكسدة، فقد أجري اختبار ( DPPH)، حيث تم استخدام نفس التراكيز التدريجية بين (500 - 2500 ) جزء من المليون ومقارنتها مع تركيز لمضاد أكسدة قياسي يعمل بميكانيكية إعطاء الهيدروجين والمتمثل في (BHT)، وقد بيّنت النتائج في الشكل (4) نشاط عالي مضاد للأكسدة للزيت الطيار بهذه الميكانيكية الجديدة أيضا ومقارب للسيطرة تصل إلى ( 71 و 68) % للتركيزين ( 2500 و 2000 ) جزء من المليون على التوالي وفعالية متوسطة بلغت ( 57 و 45)% للتركيزين (1500 و 1000) جزء من المليون على التوالي فضلا على أن التركيز الواطئ (500) جزء من المليون قد أعطى تأثير ضعيف محسوس بلغ (12)%.




شكل-4 : التأثير المضاد للأكسدة لتركيز للزيت الطيار لنبات الحريق مقارنة بمركب الـ ( BHT ) في اختبار الـ ( $DPPH^{\cdot}$) بطريقة الأكسدة الاقترانية للبيتاكاروتين

أن النتيجة الايجابية التي أبداها الزيت الطيار للحريق في الاختبارات الثلاث أعلاه رغم تباين النتائج واختلاف الميكانيكية تساهم في ترشيح هذا النبات كأحد النباتات المهمة من ناحية الفعالية المضادة للأكسدة وخصوصاً وان ذلك يتواءم مع العديد من الدراسات التي تمت على هذا النبات في مناطق أخرى من العالم من قبل العديد من الباحثين، ففي الدراسة التي أنجزت من قبل (2) بين احتواء المستخلص المائي لنبات الحريق على فعالية عالية مضادة للأكسدة وان هذه الفعالية تتناسب طردياً مع محتوى الفينولات ( $r = 0.95$). كما كشفت دراسات أخرى عن قدرة المستخلص الكحولي لهذا النبات على رفع مستوى الفعالية للإنزيمات المضادة للأكسدة داخل أجسام اللبائن وخصوصاً الموجودة في الكبد مثل ( إنزيمات Cytochrome b5، NADH-Cytochrome b5 reductase، Glutathione S-transferase، Superoxide dismutase، DT-diaphorase ) (17، 18).

هذا ومن الجدير بالذكر إن دراسات أخرى ركزت بشكل خاص على الفينولات المتوافرة بنسبة جيدة في هذا النبات والتي يعتقد بان لها دوراً كبيراً في الفعالية المضادة للأكسدة (3)، وقد أشار (16) إلى الفعالية المضادة للأكسدة والميكروبات والقرحة والمسكنة للألم، فقد تبين من خلال دراسة هذا الباحث بأن التراكيز ( 50 و 100 و 250) ميكروغرام من المستخلص المائي لهذا النبات يؤدي إلى حصول تثبيط بنسبة (39 و 66 و 98)% على التوالي في عملية تكوين البيروكسيد لمستحلب حامض اللينوليك (Peroxidation of linoleic acid)، وهذا يدل على القدرة الجيدة التي يمتلكها هذا النبات كمضاد للأكسدة علاوة على قدرته في تقليل الجذور الحرة (Free radicals) والجذور الأيونية السالبة للـ (Superoxide) وبيروكسيد الهيدروجين ( Hydrogen peroxide ) مقارنة مع مادتين قياسيتين مضادة للأكسدة وهما ( Butylated hydroxyanisole ) (BHA) و ( Butylated hydroxytoluene ) (BHT) فضلاً عن التأثيرات الجيدة المضادة للبكتريا والقرحة المستحثة بالايثانول والمسكنة للحالات المستحثة بالتخديش بحامض الخليك، كما أكد (19) في دراسة حديثة إن لخلاصة الميثانولية للحريق لها فعالية مضادة للأكسدة باستخدام اختبار الـ ($DPPH^{\cdot}$) واعزي الفعالية

الى الفلايفونيدات الكلايكوسيدية (Flavonoids glycoside) وحامض الكوفيلكونك الأحادي والثنائي بعد أن تم تشخيص هذه المركبات بالاعتماد على تقنية UV، NMR.

## المصادر


1. Asker, A. M. Vegetation and flora of Wadi AL-Asrha (AL-Jabal-Alakhdar). MSc. Thesis, Gar Younis Univ. , Libya, 216, (1998).
2. Karakayas, S., Eis, N. and Tas, A. A. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. Int. J. Food Sci. Nutr. , 52, 6, 501 – 508, (2001).
3. Mavi, A., Terzi, Z., Ozgen, U., Yildirim, A. and Coskun, M. Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos Ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. verum (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). Biol. Pharm. Bull., 27, 5, 702 – 705, (2004).
4. Dreikorn, K., Phytotherapeutic agents in the treatment of benign prostatic hyperplasia. Curr. Urol. Rep., 1, 2, 103 – 109, (2000).
5. Dvorkin, L. and Song, K. Y. Herbs for benign prostatic hyperplasia. J. Ethnopharmacol., 81, 1, 105 – 109, (2002).
6. Durak, I., Biri, H., Devrim, E., Sozen, S. and Avci, A. Aqueous Extract of *Urtica dioica* makes significant inhibition of adenosine deaminase activity in prostate tissue from patients with prostate cancer. Cancer Biol. Ther., 3, 19, 221-227, (2004).
7. Balbaa, S. I., Hilal, S. H. and Zaki, A.Y. Medicinal plant constituents, 3rd., edition, general organisation for university and school books, 431, (1981).
8. Vekiari, S. A., Orcopoulo, V., Tzia, C. and Thomopoulos, C. D. Oregano flavonoids as lipid antioxidants. JAOCS. 70, 5, 483-487, (1993).
9. Part, D. E. and Miller, E. E. A flavoniod antioxidant in Spanish peanuts. JAOCS. 61, 6, 1064-1071, (1984).
10. Part, D. E. and Birac, P. M. Source of antioxidant activity of soybean and soy products. J. Food. Sci. 44, 1720, (1979).
11. Kurechi, T., Kikugawa, K. and Koto, T. Studies on the antioxidants. XIII. Hydrogen donating capability of antioxidants to 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. Chem. Pharm. Bull. 28, 7, 2089-2093, (1980).
12. Wagner, H., Willer, F. and kreher, B. Biologically active compounds from the aqueous extract of *Urtica dioica*. Planta Med., 55, 5, 452 – 454, (1989).
13. Schottner, M., Gansser, D. and Spiteller, G. Lignans from the roots of *Urtica dioica* and their metabolites bin to human sex

hormone binding globulin (SHBG). Planta Med., 63, 6, 529-532, (1997).

14. Akbay, P., Basaran, A. A., Undeger, U. and Basaran, N. *In vitro* immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L. Phytother. Res., 17, 1, 34 – 37, (2003).
15. Fiamegos, Y. C., Nanos, C. G., Vervoort, J. and Stalikas, C. D. Analytical procedure for the in-vial derivatization-extraction on phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection. J. Chromatogr. A., 104, 1, 11-18, (2004).
16. Gulcin, I., Kufrevioglu, O. I., Oktay, M. and Buyukokuroglu, M. E. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.*)*. J. Ethnopharmacol., 90, 2, 205 – 215, (2004).
17. Ozen, T. and Korkmaz, H. Modulatory effect of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) leaf extract on biotransformation enzyme systems, antioxidant enzymes, lactate dehydrogenase and lipid peroxidation in mice. Phytomedicine., 10, 5, 405 - 415, (2003).
18. Kanter, M., Meral, I., Dede, S., Gunduz, H., Cemek, M., Ozbek, H. and Uygan, I. Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in $CCl_4$ treated rats. J. Vet. Med. Aphysiol. Pathol. Clin. Med. 50, 5, 264 – 268, (2003).
19. Exarchou, V., Fiamegos, Y.C., Van Beek, T.A., Nanos, C. and Vervoort, J. Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants. J. Chromatogr A. 21, 2, 293-302, (2006).