Archive of SID

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 21, No. 6, Jan-Feb 2014
Pages: 693-704

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۱، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۲
صفحه: ۷۰۴-۶۹۳

مقایسه روش‌های مختلف عصاره‌گیری برای بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاه مرزنگوش (Origanum majorana L)

عذرا صبورا*[۱]، فاطمه پوربرات[۲]، حسن فلاح حسینی[۳]

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۲- کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۳- استادیار پژوهشکده گیاهان دارویی، انستیتوی گیاهان پزشکی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۲۶

چکیده

مقدمه: مرزنگوش (Origanom Majorana L) گیاهی از خانواده نعنائیان به دلیل محتوی بالای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در صنایع دارویی و غذایی کاربرد زیادی دارد. از آنجا که فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان متأثر از روش عصاره‌گیری است، هدف از پژوهش حاضر بهینه‌سازی روش استخراج این ترکیبات از بافت‌های مختلف (برگ و گل) مرزنگوش در مرحله رویشی وگلدهی می‌باشد.

روش بررسی: عصاره متانولی برگ مرزنگوش در مرحله قبل از گلدهی، بعد از گلدهی و مخلوط برگ و گل با سه روش خیساندن، امواج مایکروویو و فراصوت تهیه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با دو آزمون تعیین ظرفیت پاکسازی رادیکال‌های آزاد DPPH و ممانعت از پراکسیداسیون لینولئیک اسید در سیستم β- کاروتن برآورد گردید.

نتایج: عصاره‌گیری با ماکروویو به طور معنی‌داری بیشترین میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را از بافت‌های مختلف مرزنگوش استخراج کرد (p<۰/۰۱) و روش‌های خیساندن و کاربرد امواج فراصوت در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. آزمون DPPH تفاوت معنی‌داری بین میانگین‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف را به خوبی نشان داد. نمونه برگ قبل از گلدهی که با روش مایکروویو عصاره‌گیری شده بود در بین نمونه‌های مورد آزمایش بیشترین اثر آنتی اکسیدانی را داشت، مقدار IC50 آن در آزمون DPPH برابر ۰/۰۲mg DW ml-1 و درصد بازدارندگی از پراکسیداسیون لینولئیک اسید آن در مقایسه با BHT برابر ۱۱۰٪ بود. در حالی که عصاره‌گیری این نمونه با کاربرد امواج فراصوت کمترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشت (IC50 برابر ۰/۲۸ mg DW ml-1 و ۱۰۲٪ بازدارندگی از پراکسیداسیون لیپیدها).

نتیجه‌گیری: روش مایکروویو می‌تواند به عنوان بهترین و سریع‌ترین روش استخراج مواد آنتی اکسیدانی مرزنگوش استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: عصاره گیری، امواج فراصوت، مایکروویو، خیساندن، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، گیاه مرزنگوش

* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۵۰۸۰۶۹۷، پست الکترونیکی: azrasaboora1034@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

علیرغم نقش‌های مفیدی که اکسیژن در رابطه با تداوم حیات موجودات زنده ایفا می‌کند، گونه‌های فعال اکسیژن (AOS) شامل رادیکال‌های سوپر اکسید (O2.-)، هیدروژن پراکسید (H2O2)، هیدروکسیل (OH•)، نیتریک اکساید (NO)، پراکسیل (ROO•) و پراکسی نیتریت (O•NOO) باعث تغییرات زیان‌آوری مانند پراکسیداسیون لیپیدها، غیرفعال کردن آنزیم‌ها و آسیب اکسیداتیو DNA می‌گردد(۳-۱).

آنتی اکسیدان‌ها در غلظت‌های کم با جلوگیری از انجام واکنش های زنجیره‌ای اکسایشی، به طور قابل توجهی اکسیداسیون مواد را به تأخیر می‌اندازند(۴،۵). امروزه کاربرد آنتی اکسیدان‌های سنتزی متداول که قبلاً در صنایع غذایی-دارویی برای افزایش دوره نگهداری و انبار کردن مواد و جلوگیری از اکسایش اسیدهای چرب استفاده می‌شد به دلیل سمیت و ناپایداری آنها محدود شده است(۶). برخی از این مواد سرطان‌زا بوده و باعث اختلال کار کبد، و کاهش رشد سلول‌ها می‌گردند(۷). به همین علت تلاش می‌گردد آنتی اکسیدان‌های طبیعی جایگزین این ترکیبات سنتزی شوند.

گیاهان معطر غنی از ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های مناسبی هستند که در صنایع دارویی، غذایی، عطرسازی و تهیه نوشیدنی های غیرالکلی از قدیم مورد توجه بوده‌اند و به خاطر اثرات ضدقارچی و ضدباکتریایی آنها کاربردشان بیشتر نیز شده است(۹-۷). نحوه عصاره‌گیری از این گیاهان، به عنوان اولین مرحله کلیدی برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، بسیار مهم است. اندام گیاهی و سیستم‌های حلالی انتخاب شده می‌تواند روی کمیت و نوع ترکیبات جدا شده تأثیر بگذارد. از این جهت تجربیات متعددی جهت بهینه‌سازی روش‌های استخراج و مقایسه خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های یک گیاه آزمون شده است(۱۲-۱۰). استخراج با دستگاه سوکسله و خیساندن روش هایی رایج هستند که به کمک حلال‌هایی با قطبیت‌های مختلف انجام می‌گیرد. این امر نیاز به صرف زمانی طولانی دارد و باعث استخراج طیف وسیعی از مواد شیمیایی می‌شود(۱۳). اما عصاره‌گیری به کمک امواج فراصوت و ماکروویو روش‌های جدیدی هستند که از نظر کوتاه شدن زمان استخراج، کاهش مقدار حلال مصرف شده و حفظ خاصیت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نسبت به روش‌های سنتی مزیت‌های زیادی دارند(۱۴).

انتخاب روش استخراج به نوع بافت گیاهی بستگی دارد. مثلاً مؤثرترین روش برای استخراج مواد آنتی اکسیدانی از گیاه مریم گلی، عصاره‌گیری با آب داغ تحت فشار بالا بود که بعداً با خیساندن در اتانول ۷۰٪ یا کاربرد امواج فراصوتی همراه می‌شد(۱۵). Arbianti و همکاران نیز محتوای فنل تام و فعالیت آنتی اکسیدانی برگ های Dillenia indica را به وسیله سه روش عصاره‌گیری با امواج فراصوت، دستگاه سوکسله و عصاره‌گیری تحت فشاربالا (High Pressure Extraction) بررسی کردند. تحقیقات آنها نشان داد که در عصاره‌گیری تحت فشار بالا محتوای فنل تام عصاره بیشتر و در عصاره‌گیری با روش امواج فراصوت فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتر بود که به علت تفاوت در میزان و نوع آنتی‌اکسیدان‌ها (ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، کاروتنوئیدها و ویتامین‌های) استخراج شده در هر روش بود(۱۶). Vagi و همکاران نیز طی عصاره‌گیری گیاه مرزنگوش با سه روش سوکسله، SFE (عصاره‌گیری فوق بحرانی) و تقطیر با بخار آب تفاوت‌هایی را از نظر نوع ترکیبات استخراج شده، گزارش کردند(۱۷).

در این مقاله خاصیت آنتی‌اکسیدانی مرزنگوش (Origanum Majoranum) گیاهی یک تا چند ساله، بوته ای و از خانواده نعناعیان، مطالعه شده است. نقش مرزنگوش در درمان بیماری هایی نظیر سوء هاضمه، سردرد، رماتیسم، آب مروارید، سمیت کبدی حاد، بیماری‌های قلبی ـ عروقی، ورم کلیه، فرایندهای التهابی، اسهال، سرماخوردگی و آسیب‌های DNA اثبات شده است(۱،۳،۹،۱۸). این خواص به محتوای بالای اسانس و تولید برخی متابولیت های ثانوی آن نسبت داده شده است(۱۹). ترکیبات آنتی اکسیدانی شامل ترپن-۴-ال، گاما ترپن، ترانس ـ سابینن هیدرات، لینالول، ترانس سابینن هیدرات استات، توجانول، ترپینولن و تیمول، فلاونوئیدهای کوئرستین (Quercetin)، لوتئولین (Luteolin)، کاتچین (Catechin)، آپی‌ژنین (Apigenin)، دیوسمتین (Diosmetin)، ترکیب فنلی‌رزمارینیک

www.SID.ir

Archive of SID

اسید (Rosmarinic Acid)، تری ترپنوئیدهای ارسولیک اسید (Ursolic Acid) و اولئانولیک اسید (Oleanolic Acid) و ترپنوئیدهای فنلی کارواکرول (Carvacrol) و تیمول (Thymol) بخش مهمی از آنتی اکسیدان‌های طبیعی این گیاه را تشکیل می‌دهند (۲۳-۹،۲۰). انتخاب یک روش عصاره‌گیری مناسب می‌تواند غلظت مواد آنتی اکسیدانی را در عصاره گیاه فوق افزایش دهد. از این جهت برای بهینه‌سازی شرایط استخراج و زمان نمونه‌برداری، تأثیر سه روش مختلف عصاره‌گیری با اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها بررسی خواهد شد. در رابطه با بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه، با توجه به اینکه عملکرد آنتی اکسیدان‌ها در سیستم‌های آبی و لیپیدی یا سیستم‌های دوفازی متفاوت است، استفاده از یک روش برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمی‌تواند میزان دقیق ماده مؤثر در قدرت آنتی اکسیدانی گیاه را مشخص نماید(۲۴). به همین علت در این تحقیق از دو آزمون پراکسیداسیون لینولئیک اسید در سیستم β- کاروتن (تعین کننده قطبیت مواد موجود در عصاره‌ها) و ظرفیت جاروب کردن رادیکال‌های آزاد DPPH استفاده شد که می‌تواند خاصیت آب دوستی یا آب گریزی مواد آنتی‌اکسیدانی را پیش بینی کند(۲۵).

روش بررسی

اندام هوایی O. marjoram با منشاء اسپانیایی (کد طبقه‌بندی ۱۵۸) کشت شده در مزرعه گروه کشت و توسعه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی واقع در منطقه هلجرد کرج در دو مرحله رویشی (برگ‌ها در زمان قبل از گلدهی) و زایشی (برگ‌ها در زمان گلدهی به تنهایی و یا همراه با گل آذین) تهیه و پس از انتقال به آزمایشگاه بلافاصله در سایه خشک شد.

مواد شیمیایی شامل DPPH (۱ و ۱ دی فنیل ۲- پیکریل هیدرازیل)، β- کاروتن، لینولئیک اسید، BHT (بوتیل هیدروکسی تولوئن)، AlCl3 و Na2CO3 از شرکت Merck خریداری شد.

در روش اول و دوم صد میلی‌گرم پودر خشک برگ و گل آذین با ml ۱۰ متانول ۸۰٪ با استفاده از دستگاه مایکروویو (LG/ کره) (۲ دقیقه) و حمام امواج فراصوت (Wise Clean/ کره) با شدت ۴۰MHz و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه عصاره‌گیری شدند(۲۶). در روش سوم پودر خشک گیاه به مدت ۲۴ ساعت در متانول ۸۰٪ در دمای اتاق خیسانده شد. سپس عصاره‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت rpm ۲۵۰۰ سانتریفیوژ شدند(۲۷). روشناورها جهت سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده گردیدند.

فعالیت جاروب کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از روش Akowuah و همکاران سنجیده شد(۲۸). مقادیر مختلفی از عصاره‌ها (۵۰-۳۵۰ میکرولیتر) با متانول مطلق به حجم ml ۳ رسانده شد. پس از افزودن یک میلی‌لیتر از محلول DPPH (۰/۰۴ mg/ml)، مخلوط به خوبی تکان داده شد و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق در تاریکی نگهداری گردید. از متانول مطلق به عنوان شاهد استفاده شد و جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ nm خوانده و به کمک فرمول زیر، درصد رادیکال های جاروب شده (RSC%) محاسبه گردید(۲۸):

%RSC = [(جذب نمونه-جذب شاهد) /جذب شاهد]×۱۰۰

همچنین روش β- کاروتن/لینولئیک اسید بر اساس تجربیات Kartal و همکاران انجام شد(۲۹). بدین منظور یک میلی‌لیتر از محلول β- کاروتن (۰/۰۵ درصد در کلروفرم) به یک بالن محتوی µl ۲۵ لینولئیک اسید و µl ۱۸۰ توئین-۴۰ اضافه و سپس با ml ۱۰۰ آب مقطر اکسیژن‌دار شده مخلوط گردید (۳۰ دقیقه، ml min-1 ۱۰۰). آنگاه به µl ۳۵۰ از عصاره‌های تهیه شده، ml ۲/۵ از مخلوط بالا اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. از محلول BHT ۱۰ mgml-1 (هیدروکسی تولوئن) و متانول مطلق به ترتیب به عنوان شاهد و بلانک استفاده شد. جذب نوری نمونه‌ها در ۴۹۰nm در شروع واکنش و بعد از ۴۸ ساعت خوانده شد و با مقایسه تغییرات جذب آنها، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها با توجه به میزان پایداری رنگ زرد β- کاروتن طبق فرمول زیر محاسبه گردید(۲۹):

%RAA=(تغییرات جذب شاهد/تغییرات جذب نمونه)×۱۰۰

وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها و اثر متقابل روش عصاره گیری و روش سنجش خاصیت آنتی اکسیدانی با

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه و نرم افزار SPSS نسخه ۱۲ مورد بررسی قرار گرفت. سپس برای رتبه‌بندی، داده‌ها، میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی از طریق آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون LSD مقایسه شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

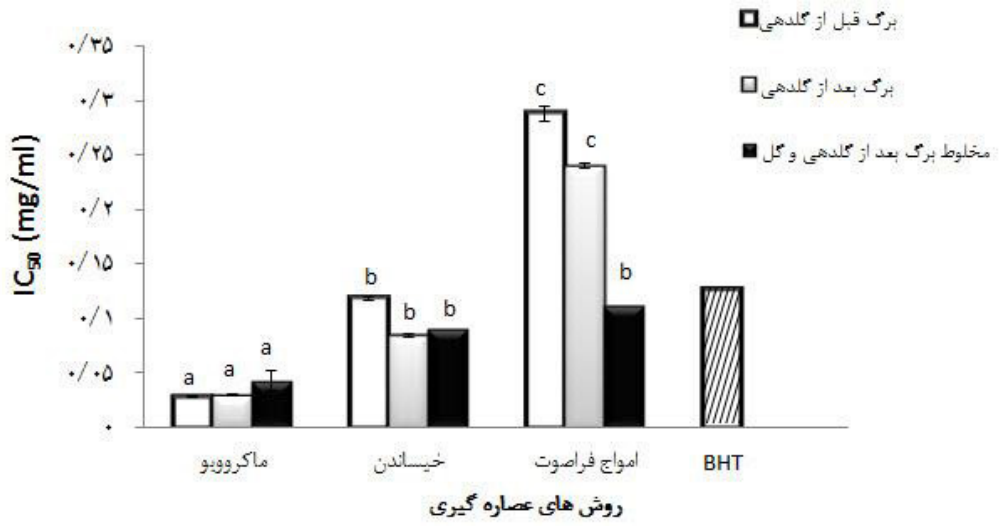
نتایج حاصل از تجزیه واریانس دوطرفه داده‌های اثر متقابل روش عصاره‌گیری و نوع بافت در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های O majorana با استفاده از روش پاکسازی رادیکال آزاد DPPH و روش β- کاروتن / لینولئیک اسید در جدول ۱ آورده شده است. نوع روش عصاره‌گیری و بافت مورد استفاده، تفاوت معنی‌داری را بین میانگین‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها نشان داد($p<۰/۰۵$).

جدول ۱: اثر متقابل روش عصاره‌گیری و نوع بافت در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های O. majorana

		میانگین مربعات	
منبع تغییرات	درجه آزادی	روش DPPH	روش β- کاروتن
روش عصاره گیری (A)	۲	۰/۰۷۵ **	۱۱۰/۰۷ *
نوع نمونه بافتی (B)	۲	۰/۰۰۹ **	۸۴۳۴/۸۶ **
A × B	۴	۰/۰۰۹ **	ns۱۹/۱۳
خطا	۱۸	۰/۰۰۰۰۲۳	۱۳/۷۱
کل	۲۷		

** $p<۰/۰۱$ * $p<۰/۰۵$ ns $p۰/۰۵$

مقایسه میزان IC50 نمونه‌ها یعنی مقدار آنتی‌اکسیدان لازم برای کاهش رادیکال‌های آزاد DPPH تا حد ۵۰٪ غلظت اولیه، نشان داد که قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره‌های مختلف تحت اثر دو عامل نوع روش استخراج و نوع بافت به تنهایی یا اثر متقابل هر دو عامل تفاوت معنی‌داری داشت (نمودار ۱). مقایسه میانگین‌ها بین روش های مختلف در مورد هر نمونه بافتی با روش LSD انجام گرفته است



شکل ۱: غلظت مؤثر برای ایجاد ۵۰٪ بازدارندگی (IC50) از فعالیت رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره‌های برگ O. majorana

مقادیر ذکر شده میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد می‌باشد. حروف مشابه در بالای ستون‌ها معرف عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های فعالیت آنتی اکسیدانی هر نمونه بافتی در روش‌های مختلف عصاره‌گیری می‌باشد.

www.SID.ir

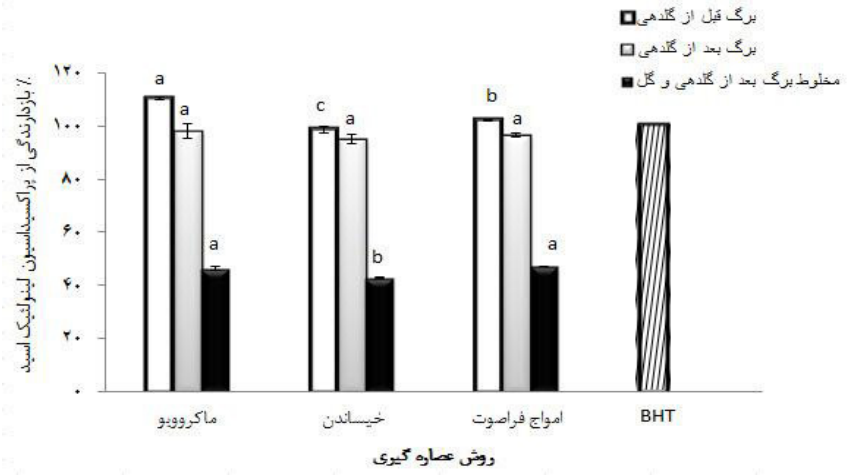
Archive of SID

همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های تهیه شده از گیاه O. majorana به ترتیب با روش‌های مایکروویو، خیساندن و کاربرد امواج فراصوت کمتر شده بود (IC50 بین ۰/۲۸ mg DW/ml - ۰/۰۲). نمونه های مختلف O. majorana یعنی برگ (قبل و بعد از گلدهی) و مخلوط برگ و گل آذین که به کمک امواج ماکروویو عصاره گیری شده بودند، اثرات آنتی‌اکسیدانی مشابهی (mg DW/ml ۰/۰۴ – ۰/۰۲) را آشکار ساختند. اما عصاره‌گیری این بافت‌ها با استفاده از امواج فراصوت مشخص کرد که برگ‌های مرزنگوش در دو مرحله نموی مختلف قبل و بعد از گلدهی از نظر محتوای آنتی‌اکسیدانی تفاوت کمی با هم داشتند (IC50 برابر ۰/۲۸-۰/۲۴ mgDW/ml) که حدود یک دهم قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه مشابه عصاره‌گیری شده با روش مایکروویو و ۱/۳ قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه مشابه عصاره‌گیری شده با روش خیساندن بود. هرچند عصاره‌گیری از کل اندام هوایی مرزنگوش در زمان بلوغ گیاه (مخلوط گل و برگ) قدرت حذف رادیکال‌های آزاد را در روش امواج فراصوت به بیش از دو برابر افزایش داده بود اما باز هم قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره این نمونه در روش مایکروویو و خیساندن به ترتیب ۳ و ۱/۲ برابر بیشتر بود (نمودار ۱).

یکی دیگر از روش‌های مورد استفاده جهت اندازه‌گیری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی روش β- کاروتن/ لینولئیک اسید بود. این روش بر پایه توانایی مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید توسط β- کاروتن و ممانعت از ایجاد هیدروپراکسیدهای لیپیدی صورت می‌گیرد. لینولئیک اسید یک اسید چرب غیراشباع است که به وسیله گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده توسط آب اکسیژندار سریعاً اکسید می‌شود.

نمودار ۲ پایداری جذب β- کاروتن را در حضور عصاره‌های مختلف مرزنگوش و در نتیجه عدم اکسیداسیون β- کاروتن و لینولئیک اسید را نشان می‌دهد. آنالیز واریانس دو طرفه داده‌ها (میانگین‌های درصد سفید شدگی β- کاروتن تحت اثر عصاره‌های مختلف O. majorana) ثابت نمود که در این آزمون، تفاوت بین روش های مختلف عصاره‌گیری از نظر میزان استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی در هر نمونه گیاهی چشمگیر نبود. اما تأثیر معنی دار نوع بافت‌های بررسی شده بر روی تفاوت خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مرزنگوش کاملاً مشهود بود (نمودار ۲). به ویژه عصاره مخلوط برگ و گل که درصد بازدارندگی از پراکسیداسیون لینولئیک اسید آن حدود نصف عصاره‌های برگی (قبل و بعد از گلدهی) بود. گرچه اثر متقابل دو عامل روش عصاره‌گیری و نوع بافت معنی‌دار نبود ($p<0/05$). اما اثر هر یک از عامل‌های نوع روش عصاره‌گیری و نوع بافت مورد استفاده به تنهایی معنی‌دار بود ($p<0/05$ و $p<0/01$).

مقایسه میانگین‌ها بین روش‌های مختلف در مورد هر نمونه بافتی با روش LSD انجام گرفته است.



نمودار ۲: اثر عصاره برگ قبل و بعد از گلدهی و مخلوط برگ و گل O. majorana در ممانعت از ایجاد هیدروپراکسیدهای لینولئیک اسید.

مقادیر ذکر شده میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد هستند. حروف مشابه در بالای ستون‌ها معرف عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های فعالیت آنتی اکسیدانی هر نمونه بافتی در روش‌های مختلف عصاره‌گیری می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه گیری

انتخاب روش مناسب عصاره‌گیری، می‌تواند کارآیی استخراج مواد آنتی اکسیدانی موجود در گیاه را به میزان چشمگیری افزایش دهد. با توجه به نتایج به دست آمده از سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌هایی که حاصل روش های مختلف عصاره گیری بود، می‌توان اظهار نمود که گیاه مرزنگوش، صرف نظر از نوع روش استخراج برای تهیه عصاره، ظرفیت بالایی برای جاروب کردن رادیکال‌های آزاد و ممانعت از پراکسیداسیون لیپیدها دارد اما آزمون DPPH روش مناسب‌تری برای تعیین کارآیی و آشکارسازی اختلاف روش‌های عصاره‌گیری بود در حالی که روش بازدارندگی از پراکسیداسیون لینولئیک اسید- β- کاروتن این تفاوت را به خوبی نشان نداد. از آنجا که روغن‌های فرار تنها ۳٪ ترکیبات استخراج شده O. majorana را تشکیل می‌دهد(۳۰،۱۷)، بنابراین منطقی به نظر می‌رسد که آزمون سنجش مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید- β- کاروتن که وابسته به اثر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی محلول در چربی است تفاوت بین روش‌ها را به خوبی نمایان نسازد. تحقیقات Sahin و همکاران نیز مشابه نتایج مطالعه حاضر بود، آنها نشان دادند که عصاره متانولی و اسانس‌های Origanum vulgare قدرت بازدارندگی زیادی نداشتند و با غلظت 2mg ml-1 به ترتیب بازدارندگی حدود ۲۴٪ و ۳۶٪ محلول BHT را در همان غلظت آشکار می‌کردند(۳۱).

مقایسه روش‌های مختلف عصاره‌گیری در گیاه O. majorana نشان داد که روش ماکروویو می‌تواند به طور معنی‌داری ($p<0/01$) بیشترین میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را استخراج کند. این یافته ها با نتایج Gallo و همکاران مطابقت دارد، آنها در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره چهار گیاه مختلف (Cinnamomum zeylanicum، Coriandrum sativum، Cuminum cyminum، Crocus sativus) که با کاربرد امواج فراصوت و ماکروویو استخراج شده بودند، گزارش کردند که عصاره های به دست آمده با روش مایکروویو از نظر محتوای ترکیبات آنتی اکسیدانی غنی‌تر هستند(۳۲)

Ince و همکاران نیز نشان دادند که مایکروویو در مقایسه با روش‌های استخراج همرفتی و امواج فراصوت و خیساندن قدرت بیشتری برای استخراج ترکیبات فنلی گیاه Melissa دارد(۳۳). تأثیر روش‌های مختلف عصاره گیری نظیر کاربرد امواج فراصوت، مایکروویو، سوکسله و خیساندن در استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاه Potentilla Atrosanguinea توسط Kalia و همکاران بررسی شد، نتایج آنها نشان داد که عصاره‌های حاصل از روش سوکسله و مایکروویو در مقایسه با دو روش دیگر بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی را دارد(۳۴).

کاربرد روش خیساندن در عصاره‌گیری بافت‌های مرزنگوش نتایج متفاوتی را در دو روش سنجش قدرت آنتی اکسیدانی نشان داد به نحوی که در روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بر حسب ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به ترتیب در روش ماکروویو بیشتر از خیساندن و پس از آن امواج فراصوت بود و در روش مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید- β- کاروتن، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به ترتیب روش ماکروویو، امواج فراصوت و خیساندن بود. استخراج مواد با روش خیساندن به طور قابل ملاحظه ای تحت تأثیر حلال صورت می‌گیرد و با توجه به نوع ترکیباتی که باید استخراج شوند، حلال آن انتخاب می‌شود. در مورد استخراج ترکیبات فنلی، هر چه میزان قطبیت حلال بیشتر باشد میزان ماده استخراج شده نیز افزایش می‌یابد(۱۴،۲۸). شاید یکی از دلایل بهتر بودن نتایج عصاره‌گیری به روش خیساندن در آزمون DPPH نسبت به آزمون مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید- β- کاروتن استفاده از متانول ۸۰٪ به عنوان حلال عصاره‌گیری در این پژوهش باشد. طبق گزارش Bouhdid و همکاران ترکیبات قطبی چون در سیستم‌های امولسیونی در فاز آبی باقی می‌مانند نمی‌توانند از پراکسیداسیون لیپیدها به خوبی ممانعت کنند(۲۵).

در طول تخریب بافتها و عصاره‌گیری با کاربرد امواج فراصوت، احتمال تشکیل رادیکال‌های آزاد از مولکول‌های حلال نیز وجود دارد. بنابراین ممکن است یکی از دلایل پایین بودن میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل از امواج فراصوت در این پژوهش در مقایسه با دو روش دیگر، مصرف

www.SID.ir

Archive of SID

بخشی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره ها برای حذف رادیکال‌های آزاد تولید شده طی عصاره‌گیری با امواج فراصوت باشد. با این حال عصاره مخلوط گل و برگ حاصل از کاربرد امواج فراصوت در مقایسه با محلول استاندارد BHT فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی را در آزمون DPPH نشان داد. به نظر می‌رسد میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تلف شده طی عصاره‌گیری این نمونه قابل چشم پوشی باشد. در سال‌های اخیر استفاده از امواج فراصوت و طیف وسیعی از حلال‌ها به عنوان یک روش سریع برای عصاره‌گیری و استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی گیاهان مختلف رواج یافته است(۳۵،۳۶). همچنین در مطالعه دیگری کارایی خوب این روش در مقایسه با روش‌های دیگر مانند سوکسله و عصاره‌گیری تحت فشار بالا (High- Pressure Extraction) نشان داده شده است(۱۷).

Matsuura و همکاران وجود مشتقات گلیکوزیدی پروکاتچین‌ها را در عصاره برگی Origanum دلیل مهار رادیکال‌های آزاد DPPH ذکر کرده‌اند(۳۷). همچنین Shahidi و همکاران فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان معطر را به حضور گروه‌های هیدروکسیل موجود در ترکیبات فنلی نسبت داده‌اند (۳۸). گزارش شده است که بخشی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی خانواده Lamiaceae مربوط به حضور روغن‌های فرار و بخش دیگر مربوط به ترکیبات غیر فرار مثل رزمارینیک و کافئیک اسید است(۳۹). فلاون‌ها، فلاونول‌ها و دی هیدروفلاونول‌های آزاد نیز در بسیاری از اعضای جنس Origanum شناسایی شده است(۲۱). از آنجا که ترکیبات فوق در ساختار شیمیایی خود دارای گروه‌های هیدروکسیل متعددی هستند و در واکوئل‌ها ذخیره‌سازی می‌شوند، احتمال داده می‌شود که تفاوت در میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف که در آزمون DPPH مشاهده شده بود، مربوط به تأثیر و قدرت نفوذ امواج مادون قرمز در روش مایکروویو و امواج فراصوتی بر روی تخریب ساختارهای غشایی و گسیختگی آنها باشد که منجر به ایجاد تفاوت‌های کمی و کیفی در محتوای فلاونوئیدی و ترکیبات فنلی آب دوست عصاره‌های مرزنجوش می‌شود. طولانی بودن زمان استخراج در روش خیساندن نیز با فراهم نمودن فرصت کافی برای انتشار حجم مناسبی از حلال به داخل سلول‌ها و خروج مواد آنتی‌اکسیدانی از جایگاه‌های استقرارشان کارآیی روش عصاره گیری را افزایش داده بود. ثابت شده است که فعالیت جاروب کنندگی رادیکال‌های آزاد عصاره های Origanum به علت وجود مشتقات گلیکوزیدی فلاونوئیدها، اسیدهای فنلی، تانن ها، استروئیدها و تری ترپنوئیدها می‌باشد(۱۸،۳۰) که با روش خیساندن در دمای اتاق به مدت نسبتاً طولانی و یا با استفاده از دمای بالا در کوتاه مدت بهتر استخراج می‌شوند. اما استفاده از دماهای بالا ممکن است روغن‌های فرار موجود در عصاره‌ها را از بین ببرد و فعالیت آنتی اکسیدانی آنها را کاهش دهد از اینرو عصاره‌گیری در دمای بالا توصیه نمی شود(۱۳).

از آنجا که ترکیبات شیمیایی بافت‌های گیاهی در طول دوره نمو آن متحمل تغییراتی می‌گردد، لذا بررسی عملکرد روش‌های عصاره‌گیری در هر دوره ممکن است نتایج مشابهی را در بر نداشته باشد. در هر دو آزمون سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، تفاوت قابل توجهی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ قبل و بعد از گلدهی با نمونه مخلوط برگ و گل مشاهده شد که این موضوع منعکس‌کننده اختلاف نوع ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود در بافت های مختلف گیاه و تأثیر روش عصاره‌گیری است. Close و همکاران گزارش کردند که انرژی نورانی اضافی دریافت شده در طول فرایند فتوسنتز باعث تشکیل ترکیبات مضری مانند کلروفیل سه تایی و اکسیژن یکتایی می شود. بدین منظور برگ‌ها دارای یک سیستم حفاظتی برای مهار این رادیکال‌های فعال خطرناک هستند(۴۰). همچنین به دلیل طولانی تر بودن دوره زندگی برگ‌ها نسبت به گل‌ها میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی آنها بیشتر است(۴۱). بنابراین ممکن است فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر عصاره‌های برگی نسبت به عصاره حاصل از مخلوط گل و برگ به دلیل تفاوت در تراکم و نوع ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در مراحل نموی بافت‌ها و سازگاری آنها با شرایط محیطی باشد. به طور مثال Siddhuraju و همکاران قدرت بالای مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد عصاره‌های برگی Cassia fistula را در مقایسه با عصاره گل، به حضور ترکیبات

www.SID.ir

Archive of SID

پلی‌فنلی مانند آنتراکوئینون‌ها (Anthraquinone)، گزانتین‌ها (Xanthone)، پروآنتوسیانیدین‌ها (Proanthocyanidin) و فلاونول‌ها (Flavonol) نسبت دادند(۴۲). توزیع این ترکیبات در بین فازهای عصاره به عواملی نظیر ساختار و قطبیت آنتی-اکسیدان‌ها، درجه غیراشباع بودن لیپیدها، نوع و حالت فیزیکوشیمیایی گهرمایه قابل اکسید، PH و دمای حلال عصاره‌گیری بستگی دارد و می‌تواند کارآیی روش استخراج را تحت تأثیر قرار دهد، به طوری که تفاوت بین روش‌های استخراج مواد آنتی‌اکسیدانی از مخلوط گل و برگ با کاربرد امواج فراصوتی و خیساندن به حداقل رسیده بود و در آزمون DPPH کاهش معنی داری را نسبت به روش کاربرد امواج مایکروویو نشان می‌داد در حالی که در آزمون مهار پراکسیداسیون لیپیدها این تفاوت نامحسوس بود.

گیاه مرزنگوش در مقایسه با بسیاری از گیاهان دیگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را نشان می‌دهد و امروزه در تولید داروهای گیاهی و صنایع غذایی کاربرد زیادی دارد. بر اساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر می‌توان اظهار نمود که با در نظر گرفتن ترکیبات شناسایی شده در گیاه مرزنگوش، روش‌های استخراج مبتنی بر جداسازی مواد شیمیایی آب دوست بر روش‌هایی که ترکیبات غیرقطبی را جدا می‌کند، ارجحیت دارد و با توجه به نوع مصرف این گیاه به عنوان ادویه یا افزودنی دارویی کاربرد امواج مایکروویو و روش خیساندن در دمای پایین توصیه می‌گردد زیرا در آزمون DPPH اثراتی قوی‌تری را نسبت به عصاره‌گیری با روش امواج فراصوت ظاهر ساختند. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ مرزنگوش با دو روش ذکر شده تفاوت زیادی در دو مرحله نموی زایشی و رویشی نداشت بنابراین برداشت گیاه از مزرعه می‌تواند در تمام طول دوره کشت گیاه انجام گیرد.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم پایه انجام شده است. بدینوسیله از معاونت پژوهشی و گروه زیست شناسی دانشگاه الزهرا که امکانات و هزینه لازم برای اجرای طرح فوق را فراهم نموده اند قدردانی و تشکر می‌گردد.

References:

1- Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. ***Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil.*** Food Chem 2004; 85: 633-40.

2- Vagi E, Rapavi E, Hadolin M, Vasarhelyine Peredi K, Balazs A, Blazovics A, Simand B. ***Phenolic and triterpenoid antioxidantd from Origanum majorana L. herb and extracts obtained with different solvent.*** J Agric Food Chem 2005; 53(1): 17-21.

3- Jin Jun W, Kyung Han B, Won Yn K, Sung Kim M, Seop Chang I, Yun Kim H, et al. ***Antioxidant effects of Origanum majorana L. on superoxide anion radicals.*** Food Chem 2001; 75(4): 439-44.

4- Pizzale L, Bortolomeazzi R, Vichi S, Beregger E, Conte L. ***Antioxidant activity of sage (Salvia officinalis and S. fruticosa) and oregano (Origanum onites and O. indercedens) extracts related to their phenolic compound content.*** J Sci Food Agricul 2002; 82(14): 1645-51.

5- Tomaino A, Cimino F, Zimbalatti V, Venuti V, Sulfaro V, De Pasquale A, et al. ***Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils.*** Food Chem 2005; 89: 549-54.

www.SID.ir

Archive of SID

6- Suhaj M. ***Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review.*** J Food Composition Analysis 2006; 19(6-7): 531-37.

7- Yasin N, Abou-Taleb M. ***Antioxidant and antimicrobial effects of marjoram and thyme in coateg refrigerated semi fried mullet fish fillets.*** World J Dairy & Food Sci 2007; 2(1): 1-9.

8- Chun SS, Vattem DA, Lin YT, Shetty K. ***Phenolic antioxidants from clonal oregano (Origanum vulgare) with antimicrobial activity against Helicobacter pylori.*** Process Biochemistry 2005; 40: 809-16.

9- Qari SH. ***Assessment of antimutagenic and genotoxic potential of Origanum majorana aqueous extract using in vitro assays.*** Saudi J Biological Sci 2008; 15: 207-12.

10- Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA. ***Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds.*** Separation Purification Technol 2011; 83: 173-9.

11- Kothari V, Gupta A, Naraniwal M. ***Comparative study of various methods for extraction of antioxidant and antibacterial compounds from plant seeds.*** J Natural Remedies 2012; 12(2): 162-73.

12- Fernandez-Ponce MT, Casas L, Mantell C, Rodriguez M, Martinez de la Ossa E. ***Extraction of antioxidant compounds from different varieties of Mangifera indica leaves using green technologies.*** J Supercritical Fluids 2012; 72: 168-75.

13- Pokorny J, Yanislieva N, Gordom M. ***Antioxidants in food – Practical Applications. Woodhead Publishing.*** Washington DC: CRC Press; 2001.p. 380.

14- Proestos C, Komaitis M. ***Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: comparison with conventional extraction technics.*** J Food Quality 2006; 29(5): 567-82.

15- Ollanketo M, Peltoketo A, Hartonen K, Hiltunen R, Riekkola ML. ***Extraction of sage by pressurized hot and conventional methods antioxidant activity of the extracts.*** Eur Food Res Technol 2002; 215: 158-63.

16- Arbianti R, Utami TS, Kurmana A, Sinaga A. ***Comparison of antioxidant activity and total phenolic content of Dillenia indica leaves extracts obtained using various techniques.*** 14 th Regional Symposium on Chemical Engineering; 2007 Dec 4-5; Yogyakarta; Indonesia. Gadjah Mada University; 2007.

17- Vagi E, Simandi B, Daood HG, Deak A, Sawinsky J. ***Recovery of pigments from origanum majorana L. by extraction with supercritical carbon dioxide.*** J Agric Food Chem 2002; 50(8): 2297-301.

18- Joshi B, Lekhak S, Sharma A. ***Antibacterial property of different medicinal plants: ocimum sanctum, Cinnamomum zeylanicum. Xanthoxylum armatum and Origanum majorana.*** J Sci Engineering Technol 2009; 5(1): 143-50.

19- Adam K, Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. ***Antifungal activities of origanum vulgare subsp. hirtum, mentha spicata, lavandula angustifolia, and Salvia fruticosa essential oils against human pathogenic fungi.*** J Agric Food Chem 1998; 46(5): 1739-45.

20- El-Ghorab AH, Mansour AF, El-Massry KF. ***Effect of extraction methods on the chemical composition and***

www.SID.ir

Archive of SID

antioxidant activity of Egyptian marjoram (Majorana hortensis Moench). Flavour Fragrance J 2004; 19(1): 54-61.

21- Skoula M, Grayer RJ, Kite GC, Veitch NC. ***Exudate flavones and flavanones in Origanum species and their interspecific variation.*** Biochemi System Ecol 2008; 36(8): 646-54.

22- Khanavi M, Norouzi M, Tabatabae H, Salehi noude A, Barzgar Safavi S, Shafie A. ***Introduction of chemical compound from essential oils of Zataria multiflora Boiss and Origanum majorana L. and study of their antivirus effect.*** Medicine Plant Journal 2009: 127-37. [Persian]

23- Abdel-Massih RM, Fares R, Bazzi S, El-chami N, Baydoun E. ***The apoptotic and anti-proliferative activity of Origanum majorana extracts on human leukemic cell line.*** Leuk Res 2010; 34(8): 1052-6.

24- Frankel EN, Meyer AS. ***The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidant.*** J Sci Food Agricul 2000; 80(13): 1925-41.

25- Bouhdid S, Skali SN, Idaomar M, Zhiri A, Baudoux D, Amensour M, et al. ***Antibacterial and antioxidant activities of Origanum compactum essential oil.*** African J Biotech 2008; 7(10): 1563-70.

26- Chen Y, Xie MY, Gong XF. ***Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from Ganoderma atrum.*** J Food Engineering 2007; 81: 162-70.

27- Pizzale L, Bortolomeazzi R, Vichi S, Uberegger E, Conte LS. ***Antioxidant activity of sage (Salvia officinalis and fruticosa) and oregano (Origanum onites and O indercedens) extracts related to their phenolic compound content.*** J Sci Food Agricul 2002; 82(14): 1645-51.

28- Akowuah GA, Ismail Z, Norhayati I, Sadikun A. ***The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of Orthosiphon stamineus and evaluation of the free radical-scavenging activity.*** Food Chem 2005; 93(2): 311-17.

29- Kartal N, Sokmen M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A. ***Investigation of the antioxidant properties of Ferula orientalis L. using a suitable extraction procedure.*** Food Chem 2007; 100(2): 584-9.

30- Leung Y, Foster S. ***Encyclopedias of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics.*** Nederland: John Wieley & Sons; 1996.p. 364-66.

31- Sahin F, Gulluce M, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M, Agar G, Ozer H. ***Biological activities of the essential oils and methanol extract of Origanum vulgare ssp. Vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey.*** Food control 2004; 15: 549-57.

32- Gallo M, Zferracane R, Graziani G, Ritieni A, Fogliano V. ***Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four different spices.*** J Molecules 2010; 15(9): 6365-74.

33- Ince AE, Sahin S, Sumnu SG. ***Extraction of phenolic compounds from Melissa using microwave and ultrasound.*** Turkish J Agricul Forestry 2013; 37: 69-75

34- Kalia K, Sharma K, Singh HP, Singh B. ***Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of Potentilla atrosanguinea Lodd and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC.***

www.SID.ir

Archive of SID

J Agricul Food Chem 2008; 56(21): 10129-34.

35- Pan G, Yu C, Qiao J. ***Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids (FC) from hawthorn seed (HS).*** Ultrason Sonochem 2012; 19(3): 486-90.

36- Hossain MB, Brunton NP, Patras A, Tiwari B, O Donnell CP, Martin-Diana AB, et al. ***Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (Origanum majorana L.) using response surface methodology.*** Ultrason Sonochem 2012; 19(3): 582-90.

37- Matsuura H, Chiji H, Asakawa C, Amano M, Yoshihara T, Mizutani J. ***DPPH radical scavengers from dried leaves of oregano (Origanum vulgare).*** Biosci Biotechnol Biochem 2003; 67(11): 2311-16.

38- Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. ***Phenolic antioxidants.*** Critical Reviews Food Sci Nutr 1992; 32(1): 67-103.

39- Vekiari SA, Oreopoulou V, Tzia C, Thomopoulos CD. ***Oregano flavonoids as lipid antioxidants.*** J Am Oil Chem Society 1993; 70(5): 483-87.

40- Close DC, McArthur C. ***Rethinking the role of many plant phenolics- protection not herbivores?.*** Oikos 2002;. 99: 166-172.

41- Chew YL, Goh JKh, Lim YY. ***Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia.*** Food chemistry 2009; 116(1): 13-18

42- Siddhuraju P, Mohan PS, Becker K. ***Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (Cassia fistula L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp.*** Food Chem 2002; 79: 61-67.

www.SID.ir

Archive of SID

Comparison of Different Extraction Methods for Optimizing Antioxidant Compounds in Origanum Majorana L

Saboora A(PhD)*[1], Pourbarat F(MSc)[2], Fallah Hossaini H(PhD)[3]

[1,2]*Department of Biology, Alzahra University, Tehran, Iran*
[3]*Institute of Medical Plants, Tehran, Iran*

Received: 13 Jun 2012 ***Accepted:*** 14 Feb 2013

Abstract

Introduction: Marjoram (Origanom majorana L), a plant which belongs to lamiaceae family, is used in medicine and food industry for its high antioxidant compounds. Since antioxidant activity of plants is affected by extraction method, this study aimed to optimize the extraction method of these compounds from different tissues of majoram (leaf and flower) in vegetative and flowering stages.

Methods: Methanolic extract was prepared from leaf dried powder before and after flowering. In fact, mixture of the flower and leaf was prepared by three methods including soaking, microwave and ultrasonic extraction. Then, antioxidant activities of the extracts were measured by two methods: DPPH scavenging capacity of free radicals and linoleic acid peroxidation in β- carotene system.

Results: The microvawe extraction significantly extracted highest antioxidant compounds from different tissues of the majoram ($p<0.01$), whereas soaking and ultrasonic methods had lesser amount of these compounds. DPPH test obviously revealed the significant difference among antioxidant activity of the various extracts. Among the studied samples, leaf sample (before flowering stage) that was extracted by microvawe method had the highest antioxidant activity. The IC50 value of this sample was 0.02 mg DW ml-1 in DPPH method and also inhibition percent of linoleic acid peroxidation was 110% compared to BHT. In contrast, extraction by ultrasonic method showed the lowest antioxidant activity (IC50 0.28 mg DW ml-1 and 102% inhibition of lipid peroxidation).

Conclusion: The study results indicated that microvawe extraction method can be introduced as the best technique for fast extraction of the antioxidant compounds from Origanum majorana L.

Keywords: Antioxidant Activity; Extraction; Marjoram; Microwave; Origanum Majorana L; Soaking; Ultrasonic

This paper should be cited as:
Saboora A, Pourbarat F, Fallah Hossaini H. ***Comparison of different extraction methods for optimizing antioxidant compounds in origanum majorana L***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2014; 21(6): 693-704.

Corresponding author: Tel: +98 9125080697, Email: azrasaboora1034@gmail.com

www.SID.ir