



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 الزهراء، تهران، ایران

۲- کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

۳- استادیار پژوهشکده گیاهان دارویی، انستیتوی گیاهان پزشکی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۲۴

چکیده

مقدمه: مرزنگوش (*Origanum 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 و گلدهی 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 میکروویو 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 ($p < 0.01$) 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 آنتی‌اکسیدانی را داشت، مقدار IC_{50} آن در آزمون DPPH برابر $0.02 \text{ mg DW ml}^{-1}$ و درصد بازدارندگی از پراکسیداسیون لینولئیک اسید آن در مقایسه با BHT برابر 110% بود. در حالی که عصاره‌گیری این نمونه با کاربرد امواج فراصوت کمترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشت (IC_{50} برابر $0.28 \text{ mg DW ml}^{-1}$ و 102% بازدارندگی از پراکسیداسیون لیپیدها).

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

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

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

مقدمه

علیرغم نقش‌های مفیدی که اکسیژن در رابطه با تداوم حیات موجودات زنده ایفا می‌کند، گونه‌های فعال اکسیژن (AOS) شامل رادیکال‌های سوپر اکسید (O_2^-)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، هیدروکسیل (OH^\bullet)، نیتریک اکساید (NO)، پراکسیل (ROO^\bullet) و پراکسی نیتريت ($O^\bullet NO$) باعث تغییرات زیان‌آوری مانند پراکسیداسیون لیپیدها، غیرفعال کردن آنزیم‌ها و آسیب اکسیداتیو DNA می‌گردد (۱-۳).

آنتی‌اکسیدان‌ها در غلظت‌های کم با جلوگیری از انجام واکنش‌های زنجیره‌ای اکسایشی، به طور قابل توجهی اکسیداسیون مواد را به تأخیر می‌اندازند (۴،۵). امروزه کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های 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 آنتی‌اکسیدان‌های 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 نوشیدنی‌های غیرالکلی از قدیم مورد توجه بوده‌اند و به خاطر اثرات ضدقارچی و ضدباکتریایی آنها کاربردشان بیشتر نیز شده است (۷-۹). 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 آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های یک گیاه آزمون شده است (۱۰-۱۲). استخراج با دستگاه سوکسله و خیساندن روش‌هایی 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 آنتی‌اکسیدانی از گیاه مریم‌گلی، 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 آنتی‌اکسیدانی برگ‌های *Dillenia indica* را به وسیله سه روش عصاره‌گیری با امواج فراصوت، دستگاه سوکسله و عصاره‌گیری تحت فشار بالا (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 آنتی‌اکسیدانی 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 بیماری‌هایی نظیر سوء هاضمه، سردرد، رماتیسم، آب مروارید، سمیت کبدی حاد، بیماری‌های قلبی - عروقی، ورم کلیه، فرایندهای التهابی، اسهال، سرماخوردگی و آسیب‌های DNA اثبات شده است (۱۸، ۱۹، ۲۰). این خواص به محتوای بالای اسانس و تولید برخی متابولیت‌های ثانوی آن نسبت داده شده است (۱۹). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شامل ترپن-۴-ال، گاما ترپن، ترانس - سابینن هیدرات، لینالول، ترانس سابینن هیدرات استات، توجانول، ترپینولن و تیمول، فلاونوئیدهای کوئرستین (Quercetin)، لوتئولین (Luteolin)، کاتچین (Catechin)، آپیژنین (Apigenin)، دیوسمتین (Diosmetin)، ترکیب فنلی رزمارینیک

کره) با شدت ۴۰ MHz 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 ۲۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند (۲۷). روش‌ها 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 ۳ ml 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 رادیکال‌های جاروب شده (%RSC) محاسبه گردید (۲۸):

$$\%RSC = [\text{جذب شاهد} / \text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}] \times 100$$

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 ۲۵ μ l لینولئیک اسید و ۱۸۰ μ l توئین-۴۰ اضافه و سپس با ۱۰۰ ml آب مقطر اکسیژن‌دار شده مخلوط گردید (۳۰ دقیقه، ۱۰۰ ml min⁻¹). آنگاه به ۳۵۰ μ l از عصاره‌های تهیه شده، ۲/۵ ml از مخلوط بالا اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. از محلول BHT ۱۰ mg/ml-1 (هیدروکسی تولوئن) و متانول مطلق به ترتیب به عنوان شاهد و بلانک استفاده شد. جذب نوری نمونه‌ها در ۴۹۰ nm 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):

$$\%RAA = (\text{تغییرات جذب شاهد} / \text{تغییرات جذب نمونه}) \times 100$$

وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها و اثر متقابل روش عصاره‌گیری و روش سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی با

اسید (Rosmarinic Acid)، تری‌ترپنوئیدهای ارسولیک اسید (Ursolic Acid) و اولئانولیک اسید (Oleanolic Acid) و ترپنوئیدهای فنلی کارواکرول (Carvacrol) و تیمول (Thymol) بخش مهمی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی این گیاه را تشکیل می‌دهند (۲۳-۹،۲۰). انتخاب یک روش عصاره‌گیری مناسب می‌تواند غلظت مواد آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدان‌ها 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 آنتی‌اکسیدانی گیاه را مشخص نماید (۲۴). به همین علت در این تحقیق از دو آزمون پراکسیداسیون لینولئیک اسید در سیستم β -کاروتن (تعیین کننده قطبیت مواد موجود در عصاره‌ها) و ظرفیت جاروب کردن رادیکال‌های آزاد DPPH استفاده شد که می‌تواند خاصیت آب دوستی یا آب‌گریزی مواد آنتی‌اکسیدانی را پیش‌بینی 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 هلجرده 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 ۱۰ ml متانول ۸۰٪ با استفاده از دستگاه میکروویو (LG/کره) (۲ دقیقه) و حمام امواج فراصوت (Wise Clean/

روش عصاره‌گیری و نوع بافت در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های *O. majorana* با استفاده از روش پادیکال 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 ($p < 0.05$).

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

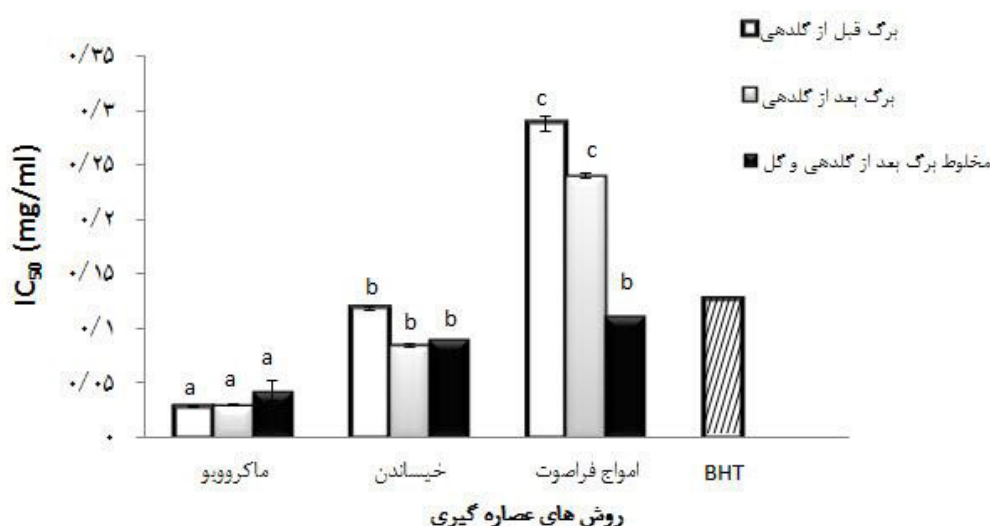
جدول ۱: اثر متقابل روش عصاره‌گیری و نوع بافت در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های *O. majorana*

منبع تغییرات	درجه آزادی	روش DPPH	روش β -کاروتن
روش عصاره‌گیری (A)	۲	۰/۰۷۵ **	۱۱۰/۰۷ *
نوع نمونه بافتی (B)	۲	۰/۰۰۹ **	۸۴۳۴/۸۶ **
A × B	۴	۰/۰۰۹ **	ns ۱۹/۱۳
خطا	۱۸	۰/۰۰۰۰۲۳	۱۳/۷۱
کل	۲۷		

$p < 0.05$ ns
 $p < 0.05$ *
 $p < 0.01$ **

و نوع بافت به تنهایی یا اثر متقابل هر دو عامل تفاوت معنی‌داری داشت (نمودار ۱). مقایسه میانگین‌ها بین روش‌های مختلف در مورد هر نمونه بافتی با روش LSD انجام گرفته است

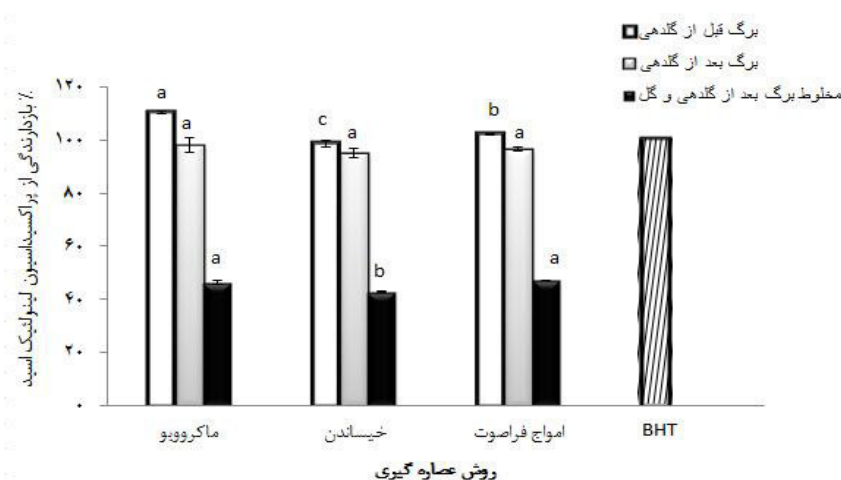
مقایسه میزان IC_{50} نمونه‌ها یعنی مقدار آنتی‌اکسیدان لازم برای کاهش رادیکال‌های آزاد DPPH تا حد ۵۰٪ غلظت اولیه، نشان داد که قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره‌های مختلف تحت اثر دو عامل نوع روش استخراج



شکل ۱: غلظت مؤثر برای ایجاد ۵۰٪ بازدارندگی (IC_{50}) از فعالیت رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره‌های برگ *O. majorana* مقادیر ذکر شده میانگین سه تکرار \pm خطای استاندارد می‌باشد. حروف مشابه در بالای ستون‌ها معرف عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر نمونه بافتی در روش‌های مختلف عصاره‌گیری می‌باشد.

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 روش‌های مختلف عصاره‌گیری از نظر میزان استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در هر نمونه گیاهی چشمگیر نبود. اما تأثیر معنی‌دار نوع بافت‌های بررسی شده بر روی تفاوت خاصیت آنتی‌اکسیدانی 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 برگ (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 \pm خطای استاندارد هستند. حروف مشابه در بالای ستون‌ها معرف عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر نمونه بافتی در روش‌های مختلف عصاره‌گیری می‌باشد.

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 - ۰/۰۲ mg DW/ml). نمونه‌های مختلف *O. majorana* یعنی برگ (قبل و بعد از گلدهی) و مخلوط برگ و گل آذین که به کمک امواج مایکروویو عصاره‌گیری 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 نمونه مختلف قبل و بعد از گلدهی از نظر محتوای آنتی‌اکسیدانی تفاوت کمی با هم داشتند (IC50 برابر mg DW/ml ۰/۲۴ - ۰/۲۸) 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/

بحث و نتیجه گیری

انتخاب روش مناسب عصاره‌گیری، می‌تواند کارآیی استخراج مواد آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاه را به میزان چشمگیری افزایش دهد. با توجه به نتایج به دست آمده از سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌هایی که حاصل روش‌های مختلف عصاره‌گیری 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 ۲mg 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 یافته‌ها با نتایج Gallo و همکاران مطابقت دارد، آنها در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره چهار گیاه مختلف (*Coriandrum sativum*، *Cinnamomum zeylanicum*، *Crocus sativus*، *Cuminum cyminum*) که با کاربرد امواج فراصوت و ماکروویو استخراج شده بودند، گزارش کردند که عصاره‌های به دست آمده با روش ماکروویو از نظر محتوای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غنی‌تر هستند (۳۲) و *Ince* و همکاران نیز نشان دادند که ماکروویو در مقایسه با

روش‌های استخراج همرفتی و امواج فراصوت و خیساندن قدرت بیشتری برای استخراج ترکیبات فنلی گیاه *Melissa* دارد (۳۳). تأثیر روش‌های مختلف عصاره‌گیری 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 آنتی‌اکسیدانی را دارد (۳۴).

کاربرد روش خیساندن در عصاره‌گیری بافت‌های مرزنگوش نتایج متفاوتی را در دو روش سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی 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 ملاحظه‌ای 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 امولسیون 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

فراهم نمودن فرصت کافی برای انتشار حجم مناسبی از حلال به داخل سلول‌ها و خروج مواد آنتی‌اکسیدانی از جایگاه‌های استقرارشان کارآیی روش عصاره‌گیری را افزایش داده بود. ثابت شده است که فعالیت جاروب‌کنندگی رادیکال‌های آزاد عصاره‌های *Origanum* به علت وجود مشتقات گلیکوزیدی فلاونوئیدها، اسیدهای فنلی، تانن‌ها، استروئیدها و تری‌ترپنوئیدها 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 آنتی‌اکسیدانی آنها را کاهش دهد از اینرو عصاره‌گیری در دمای بالا توصیه نمی‌شود (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 آنتی‌اکسیدانی موجود در بافت‌های 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 مضرى مانند کلروفیل سه تایی و اکسیژن یکتایی می‌شود. بدین منظور برگ‌ها دارای یک سیستم حفاظتی برای مهار این رادیکال‌های فعال خطرناک هستند (۴۰). همچنین به دلیل طولانی‌تر بودن دوره زندگی برگ‌ها نسبت به گل‌ها میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آنها بیشتر است (۴۱). بنابراین ممکن است فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر عصاره‌های برگ نسبت به عصاره حاصل از مخلوط گل و برگ به دلیل تفاوت در تراکم و نوع ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در مراحل نمو بافت‌ها و سازگاری آنها با شرایط محیطی باشد. به طور مثال *Siddhuraju* و همکاران قدرت بالای مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد عصاره‌های برگ *Cassia fistula* را در مقایسه با عصاره گل، به حضور ترکیبات

بخشی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها 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 چشم‌پوشی باشد. در سال‌های اخیر استفاده از امواج فراصوت و طیف وسیعی از حلال‌ها به عنوان یک روش سریع برای عصاره‌گیری و استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی 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 برگ *Origanum* دلیل مهار رادیکال‌های آزاد DPPH ذکر کرده‌اند (۳۷). همچنین *Shahidi* و همکاران فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 دی‌هیدروفلاونول‌های 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 واکنش‌ها ذخیره‌سازی می‌شوند، احتمال داده می‌شود که تفاوت در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 آب‌دوست عصاره‌های مرزنجوش می‌شود. طولانی بودن زمان استخراج در روش خیساندن نیز با

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 میکروویو 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 الزهراء، دانشکده علوم پایه انجام شده است. بدینوسیله از معاونت پژوهشی و گروه زیست‌شناسی دانشگاه الزهراء که امکانات و هزینه لازم برای اجرای طرح فوق را فراهم نموده اند قدردانی و تشکر می‌گردد.

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 کارایی 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 میکروویو 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

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 antioxidant 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.

- 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, Vatter 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, Yanisliewa 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*

- 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 antiviral 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 Wiley & 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 atosanguinea Lodd and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC*.

- 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.

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 (*Origanum 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 marjoram (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 microwave extraction significantly extracted highest antioxidant compounds from different tissues of the marjoram ($p < 0.01$), 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 microwave 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 microwave 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**