

The Effect of Extraction Method on Phenolic and Flavonoid Compounds and Antioxidant Activity of *Satureja avromanica* Maroofi

Leila Hakimi^{1*} and Marjan Maasumi Gudarzi²

- 1- ***Corresponding Author** Assistance Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran (hakimi_l@yahoo.com)
- 2- M.Sc. Graduate of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Received: 11 September, 2018

Accepted: 16 January, 2019

Abstract

Background and Objectives

Satureja avromanica Maroofi is a medicinally perennial herb which is native to Iran, exclusively restricted to Uramanat mountains of Kurdistan province. It has various pharmaceutical and biological activities such as antibacterial, antifungal, antioxidant, anti-inflammatory, antiviral, anticancer and antiprotozoal properties. The experiment was conducted to study the biochemical characteristics of *S. avromanica* Maroofi extract by two extraction methods as solvent and solvent-ultrasonic.

Materials and Methods

The study was carried out as a factorial based on a completely randomized design. The investigated factors were the type of solvent (water, 75% water, 50% water, 75% methanol and methanol) and extraction method (solvent and solvent-ultrasonic). For this purpose, the plant samples were collected from Uraman Mountains of Kurdistan province in July of 2016. Samples were immediately transferred to Herbarium of Agricultural Research Center and Natural Resources of Kurdistan province. The samples were dried in shade for 15 days, and then crushed into pieces of 0.5 to 1 cm by a laboratory mill (Molyneux, Spain). The content of phenol and flavonoid as well as antioxidant activity was measured. Besides, the components of phenol and flavonoid for the best treatment were determined by HPLC apparatus.

Results

The results showed that the compounds extracted by water-ultrasonic were significantly more than those extracted by water. Inhibition percent in water-ultrasonic and water treatments were 16.62% and 11.92%, respectively. The content of phenol (45.36 mg/g, 40.29 mg/g) in water-ultrasonic was higher than that obtained in water treatment (40.29 mg/g). The flavonoid content (15.33 mg/g) in water-ultrasonic was more than that in water treatment (13.29 mg/g). Therefore, water-ultrasonic treatment was more efficient in extracting *S. avromanica* Maroofi compared to water treatment. On the other hand, the 75% water treatment had more compounds compared to other solvents. The chromatogram of essential ingredient revealed that *S. avromanica* Maroofi had more Caffeic acid, Gallic acid, Chlorogenic acid, Quercetin, p-Coumaric acid, Ferulic acid. Also, Rutin as the highest amount was obtained in Ferulic acid to be 9.12 mg/g.



Discussion

We found that water is the best solvent for biochemical extraction of *S. avromanica* Maroofi. We found a 12% increase of phenol and 14 % increase of flavonoid in water-ultrasonic relative to water treatment. Due to the wide structure of hydrogen bonds, water is a very polar solvent with a dielectric constant at room temperature and atmospheric pressure. Ultrasonic is a type of ultrasound that increases the polarity of the liquid phase. Ultrasonic waves cause mechanical fluctuations in the liquid medium. The mechanical effect of ultrasound improves the penetration of solvent into cellular materials and mass transfer. Hence, ultrasonic waves are more efficient for producing the biochemical compounds like phenol and flavonoid.

Keywords: Ferulic acid, Secondary metabolites, Solvent, Ultrasonic

اثر روش استخراج بر میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره مرزه اورامانی (*Satureja avromanica* Maroofi)

لیلا حکیمی^{۱*} و مرجان معصومی گودرزی^۲

۱- *نویسنده مسئول: استادیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران (hakimi_l@yahoo.com)

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۲۰

چکیده

به منظور بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی و ترکیبات عصاره مرزه اورامانی، با دو روش حلال و امواج فراصوت آزمایشی در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سال ۱۳۹۵ انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی در این آزمایش شامل نوع حلال (آب خالص، ۷۵ درصد آب، ۵۰ درصد آب، ۷۵ درصد متانول و متانول خالص) و روش استخراج (حلال و حلال-امواج فراصوت با توان ۲۰۰ وات) بود. نتایج نشان داد که در استخراج ترکیبات گونه مرزه، روش حلال-امواج فراصوت به طور معنی‌داری بیشتر از حلال بود. مقدار درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روش حلال-امواج فراصوت و حلال به ترتیب برابر ۱۶/۶۲ و ۱۱/۹۲ درصد به دست آمد. ترکیبات فنولی و فلاونوئید در روش حلال-امواج فراصوت برابر ۴۵/۳۶ و ۱۵/۳۳ میلی‌گرم در گرم و این مقدار برای روش حلال به ترتیب ۴۰/۲۹ و ۱۳/۲۹ میلی‌گرم در گرم بود بنابراین روش حلال-امواج فراصوت از لحاظ کارایی و هزینه نسبت به حلال، روش مناسب‌تری برای استخراج ترکیبات گونه مرزه اورامانی معرفی شد. بررسی ترکیبات گونه مرزه اورامانی در حلال‌های مختلف نشان داد که حلال آب و حلال ۷۵ درصد آب نسبت به سایر حلال‌ها مقدار بیشتری از ترکیبات را استخراج کردند. نتایج کروماتوگرام مواد مؤثره نمونه‌های عصاره آبی و امواج فراصوت با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) نشان داد که از گونه مرزه اورامانی، ترکیبات کافئیک اسید، گالیک اسید، کلروژنیک اسید، کوئرستین، پاراکوماریک اسید، فرولیک اسید و روتین به دست آمد و بیشترین مقدار این ترکیبات با ۹/۱۲ میلی‌گرم در لیتر مربوط به فرولیک اسید بود.

کلیدواژه‌ها: امواج فراصوت، حلال، فرولیک اسید، متابولیت‌های ثانویه

مقدمه

در سال‌های اخیر استفاده از گیاهان دارویی مورد توجه خاصی قرار گرفته است ولی متأسفانه به دلیل رعایت نکردن نکاتی به ظاهر ساده و در اصل بسیار با اهمیت، بسیاری از افراد نمی‌توانند از خواص و اثرات دارویی آن بهره کافی ببرند (Menendez-Baceta et al., 2015). مرزه اورامانی *Satureja avromanica* Maroofi گیاهی

است بوته‌ای، به ارتفاع ۳۵ تا ۸۰ سانتی‌متر، ساقه‌ها متعدد، نازک، غیرمعطر، اغلب ساده و یا با انشعابات کم و برگ‌ها متقابل با گل‌آذین انتهایی در گرزهای تنک می‌باشد (Maroofi, 2010). این گونه دارویی از منطقه اورامان میوان در استان کردستان جمع‌آوری و به‌عنوان گونه جدید جنس مرزه و انحصاری ایران معرفی شده و در ژورنال گیاه‌شناسی ایران اختلافات آن با خویشاوندان نزدیک

استخراج به کمک امواج فراصوت و افزایش فرکانس آن منجر به کاهش زمان مورد نیاز جهت تکمیل استخراج و کاهش حلال مصرفی گردید. محتوای فنولی و فلاونوئیدی جهت بررسی پتانسیل آنتی اکسیدانی عصاره برگ گیاه دارویی *Meyna spinosa Roxb* تعیین شد. بیشترین تأثیر آنتی اکسیدانی در *Mellilotus officenalis* با IC50 برابر با ۰/۱۸ میلی گرم در میلی لیتر گزارش شد و فعالیت آنتی اکسیدانی رادیکال عصاره *Mellilotus officenalis* چهار برابر بیشتر از DHT است (Pourmorad et al., 2006). تاکنون اطلاعات جامعی از بهترین روش استخراج عصاره گیاه مرزه اورامانی یافت نشده است. بنابراین، هدف از انجام این آزمایش بررسی مقدار فنول، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره حاصل از گیاه مرزه اورامانی و تعیین ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آن در دو روش حلال و امواج فراصوت بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاه مرزه اورامانی از روستای بلبر منطقه اورامانات شهرستان مریوان (ارتفاع از سطح دریا ۸۵۰ متر، طول جغرافیایی ۴۶ درجه و ۱۸ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۱۵ دقیقه) در تیرماه ۱۳۹۵ جمع آوری و به هرباریوم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان انتقال داده شدند. سپس نمونه‌های به روش خشک کردن طبیعی به مدت ۱۵ روز هفته در سایه و هوای آزاد خشک شدند. گیاهان خشک شده به وسیله آسیاب آزمایشگاهی (مدل مولینکس، اسپانیا) به قطعات ۰/۵ تا ۱ سانتی متر خرد شد و استفاده از ترازوی دیجیتالی (Sartorius، آلمان) وزن گردید. جهت استخراج عصاره، ۰/۱ گرم از پودر خشک گیاه مرزه خرد شده در ۲۰ میلی لیتر حلال‌های متانول، آب، ۵۰:۵۰ آب به متانول، ۷۵:۲۵ متانول به آب و ۷۵:۲۵ آب به متانول ریخته و اجازه داده شد تا عملیات استخراج عصاره به مدت یک شبانه روز انجام گیرد

در روش حلال-امواج فراصوت، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد در مجاورت امواج ماوراصوت (دستگاه حمام امواج ماوراصوت مدل

S. edmondi و *S. macrosiphonia* مورد بررسی قرار گرفت (Maroofi, 2010). کارواکرول و تیمول به عنوان ترکیبات اصلی اسانس گونه‌های مختلف مرزه گزارش شده است (Sefidkon et al., 2009; Noshkam et al., 2015).

گیاهان دارویی حاوی ترکیبات ثانویه و سیعی هستند که اغلب فعالیت‌های زیستی مهمی دارند و از آنجایی که عصاره‌های گیاهی به طور وسیعی در صنایع دارویی، غذایی و بهداشتی استفاده می‌شوند، فناوری عصاره گیری به منظور استخراج این ترکیبات فعال استفاده شد (Siahmansour et al., 2018). روش‌های سنتی مانند روش خیساندن بسیار هزینه بر می‌باشد و مقدار زیادی حلال لازم دارد (Sultana et al., 2009). اولین مرحله کلیدی در استخراج مواد مؤثره از یک گیاه نحوه عصاره گیری از آن است، چون نوع ترکیبات استخراج شده، کمیت و کیفیت آن به طور معنی داری تحت تأثیر سیستم‌های حلالی انتخاب شده و اندام گیاهی است (Mustapa et al., 2015).

در سال‌های اخیر در مورد استفاده از امواج فراصوت به دلیل کاهش زمان استخراج و امکان استفاده از دماهای پایین مطالعات فراوانی صورت گرفته است. امواج فراصوت می‌توانند باعث ایجاد یکسری انقباض و انبساط‌های متوالی در محیط شوند که این باعث ایجاد فشار و حذف متوالی آن بر ماده می‌شود، نیروهای حاصل به وسیله این مکانیسم مکانیکی می‌توانند نسبت به کشش سطحی که حلال را در لوله‌های موئینه بافت ماده نگه می‌دارد بیشتر شوند و بنابراین ایجاد کانال‌های ماکروسکوپیکی ایجاد کنند که این باعث استخراج آسان تر می‌شود، لذا عمل استخراج را می‌توان در حرارت‌های پایین انجام داد (Nandes et al., 2008; Raza et al., 2017).

در پژوهشی میزان ترکیبات فنولی، فلاونولی و فلاونوئیدی عصاره اتانولی گل میمونی به ترتیب ۱۸۰، ۷۴ و ۱۰۰ میلی گرم در گرم بود (Sherafati-chaleshati et al., 2009). Karami et al. (2011) نشان دادند که راندمان استخراج ترکیبات فنولیکی در هر دو روش یکسان بود ولی

رادیکال‌های ۲،۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) با روش Blois (1985) انجام شد. به این صورت که به ۱ میلی‌لیتر از هر یک از رقت‌های تهیه‌شده از BHT و عصاره گیاهی مقدار ۳ میلی‌لیتر محلول DPPH اضافه شد و در کنار آن‌ها محلول‌های بلانک و کنترل نیز آماده گردید (محلول‌ها حتی‌المقدور دور از نور ساخته شد، به دلیل حساسیت DPPH به نور). محلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در محلی تاریک و دردمای اتاق انکوبه شدند و پس از گذشت این مدت جذب آن‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد (برای خواندن جذب کلیه محلول‌ها، دستگاه به وسیله حلال یعنی متانول کالیبره و صفر شد). برای هر محلول، درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید.

رابطه (۱)

$$\text{DPPH آزاد} \times 100 = \frac{ODc - (ODs - ODb)}{ODc}$$

ODc: جذب محلول کنترل

ODs: جذب محلول حاوی عصاره

ODb: جذب محلول بلانک

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در عصاره توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) شرکت KNAUER کشور آلمان مدل PLATIN blue همراه پمپ K ۱۰۰۱ مجهز به دتکتور UV، ستون C ۱۸، نرم‌افزار EZChrom Eilte استفاده گردید. فاز متحرک دستگاه شامل دو قسمت A و B می‌باشد. فاز A شامل بافر امونیوم استات (۷۷۰ میلی‌گرم در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب) و فاز B شامل ۹۰۰ میلی‌لیتر استونیتریل و ۱۰۰ میلی‌متر متانول تشکیل شده است. ۲۰ میکرولیتر از عصاره در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به دستگاه تزریق و با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه از ستون C ۱۸ به قطر ذرات ۵ میکرومتر عبور داده شدند (Ganzera et al., 2002).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تیمارها با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار آزمون شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها

SONIC 6D ساخت شرکت James انگلستان دارای توان ۲۰۰ وات و فرکانس ۴۰ کیلوهرتز) بدون بکارگیری هیچ‌گونه عامل دیگر بر روی راندمان استخراج شدند. سپس نمونه‌ها در ۴۰۰۰ دور به مدت دقیقه سانتی‌فیوژ و به حجم نهایی ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شدند (Wu et al., 2001).

محتوای فنولی

محتوای فنولی با استفاده از معرف فولین-سیوکالتیو و بر حسب اسید گالیک، در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام شد (Wojdyło et al., 2007). ابتدا محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۵/۱۲، ۲۵/۵۰، ۶۲/۱۰۰ و ۱۲۵ μg/ml از گالیک اسید در متانول تهیه شد. سپس از هر یک ۱ میلی‌لیتر به لوله آزمایش منتقل کرده و به آن‌ها ۵ میلی‌لیتر از محلول واکنشگر فولین سیوکالتو ۱۰ درصد (۱۰ سی سی فولین سیوکالتو (۲ مولار) را با آب مقطر به حجم ۱۰۰ سی سی رسانده شد و بعد از ۳ تا ۸ دقیقه به آن‌ها ۴ میلی‌لیتر از محلول کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه و در محیط تاریک نگهداری و پس از آن میزان جذب در ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

محتوای فلاونوئید

محتوای فلاونوئید بر اساس روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید انجام شد (Chang et al., 2002). محتوای فلاونوئید بر اساس روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید انجام شد طبق این روش ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول و ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر از آب مقطر مخلوط گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و سپس جذب آن در ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد. از غلظت‌های مختلف کوئرستین ۱۲/۵ - ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در متانول جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد و محتوی فلاونوئید به صورت اکی‌والان‌های کوئرستین در گرم وزن عصاره خشک بیان شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش مهار رادیکال آزاد

آنتی‌اکسیدانی معنی‌دار نبود (جدول ۱). نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر نوع حلال مربوط به آب با ۱۸/۶۹ درصد و کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با ۱۱/۲۵ درصد مربوط به متانول بود (جدول ۲). همچنین مشخص شد که روش حلال امواج فراصوت دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری (۱۶/۶۲ درصد) نسبت به روش حلال (۱۱/۹۲ درصد) بود (جدول ۳ و شکل ۱).

با نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن با سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

اثر نوع حلال و روش استخراج بر درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌دار داشت ($P \geq 0.05$)، اثر متقابل روش و نوع حلال بر فعالیت

Table 1. The analysis of variance for antioxidant activity, phenol, and flavenoid under extraction method of solvent and solvent-ultrasonic

Sources of variations	df	Mean square		
		Antioxidant activity	Flavonoid	Phenol
Solvent	4	50.89 ^{**}	65.68 ^{**}	200.3 ^{**}
Extract method	1	166.1 ^{**}	28.03 ^{**}	192.5 ^{**}
Solvent × Extract method	4	1.12 ^{ns}	0.43 ^{ns}	0.58 ^{ns}
C.V. (%)	-	12.36	4.25	3.18

*, ** and ns show the significance at 5%, 1% levels and no significant difference, respectively.

Table 2. Mean comparison of antioxidant activity, phenol, and flavenoid with different solvents

Solvent	Antioxidant activity (%)	Flavonoid (mg/g)	Phenol (mg/g)
Water	18.69 ^a	19 ^a	49.23 ^a
75% Water	15.061 ^b	17 ^b	47.75 ^a
50% Water	14.24 ^c	13.91 ^c	42.78 ^b
75% Methanol	12.11 ^d	12.58 ^d	38.7 ^c
Methanol	11.25 ^e	10 ^e	35.66 ^d

Same letters in each column show no significant difference.

Table 3. Mean comparison of antioxidant activity, phenol, and flavenoid under extraction method of solvent and solvent-ultrasonic

Method	Antioxidant activity (%)	Flavonoid (mg/g)	Phenol (mg/g)
Solvent	11.92 ^b	13.40 ^b	40.29 ^b
Solvent – Ultrasonic	16.62 ^a	15.33 ^a	45.36 ^a

Same letters in each column show no significant difference.

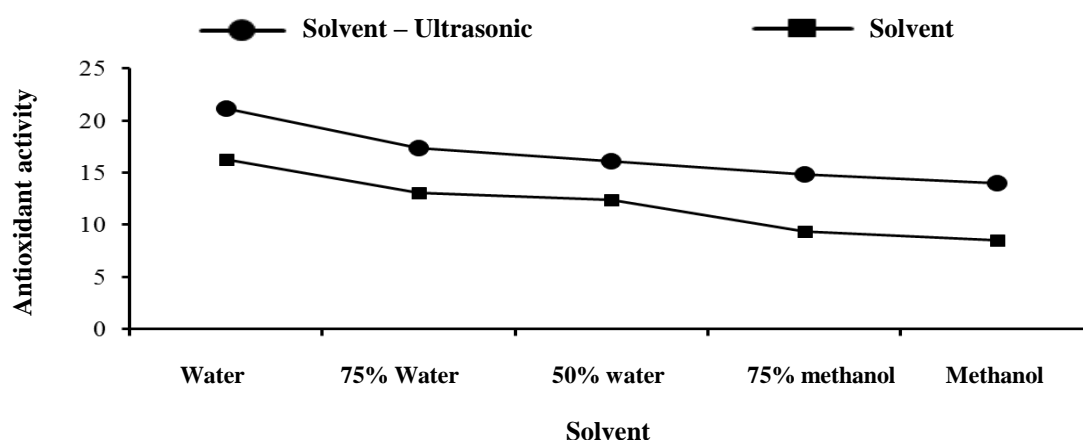


Figure 1. The variation trend of antioxidant activity under extraction method of solvent and solvent-ultrasonic

فنول

طبق نتایج مشاهده شد که اثر نوع حلال در سطح احتمال یک درصد ($P \geq 0/01$) و روش استخراج در سطح احتمال پنج درصد ($P \geq 0/05$) تأثیر معنی داری بر فنول داشت، ولی اثر متقابل روش و نوع حلال در فنول معنی دار نشد (جدول ۱). همان طور که از نتایج (جدول ۲) مشهود است حداکثر فنول به مقدار ۴۹/۲۳ و ۴۷/۷۵ میلی گرم در گرم در تیمارهای آب و ۷۵ درصد آب و حداقل فنول با مقدار ۳۵/۶۶ میلی گرم در گرم در تیمار متانول به دست آمد. نتایج جدول (۳) حاکی از آن بود که روش حلال امواج فراصوت (۴۰/۲۹ میلی گرم در گرم) دارای فنول بیشتری نسبت به روش حلال (۴۰/۲۹ میلی گرم در گرم) بود (شکل ۲).

فلانوئید

بر اساس نتایج، اثر نوع حلال در سطح احتمال یک درصد ($P \geq 0/01$) و روش استخراج در سطح احتمال پنج درصد ($P \geq 0/05$) بر فلانوئید، تأثیر معنی دار داشت، همچنین مشاهده شد که اثر متقابل روش و نوع حلال بر فلانوئید معنی دار نبود (جدول ۱). نتایج نشان داد که بیشترین مقدار فلانوئید با ۹ میلی گرم در گرم در حلال آب و کمترین فلانوئید به مقدار ۱۰ میلی گرم در گرم در حلال متانول حاصل شد (جدول ۲). نتایج مبین آن بود که روش حلال-امواج فراصوت با میانگین ۱۵/۳۳ میلی گرم در گرم در مقابل روش حلال با میانگین ۱۳/۴ میلی گرم در لیتر فلانوئید، دارای فلانوئید بیشتری بود (جدول ۳ و شکل ۳).

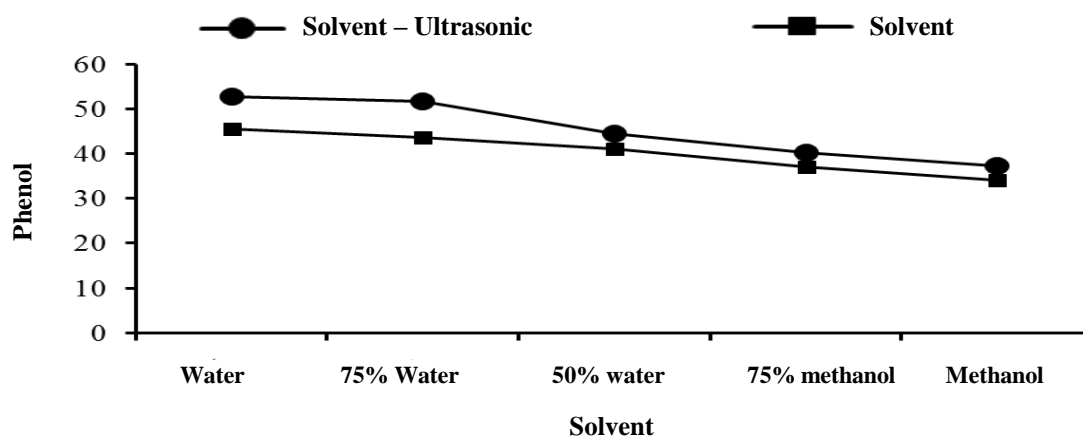


Figure 2. The variation trend of phenol under extraction method of solvent and solvent-ultrasonic

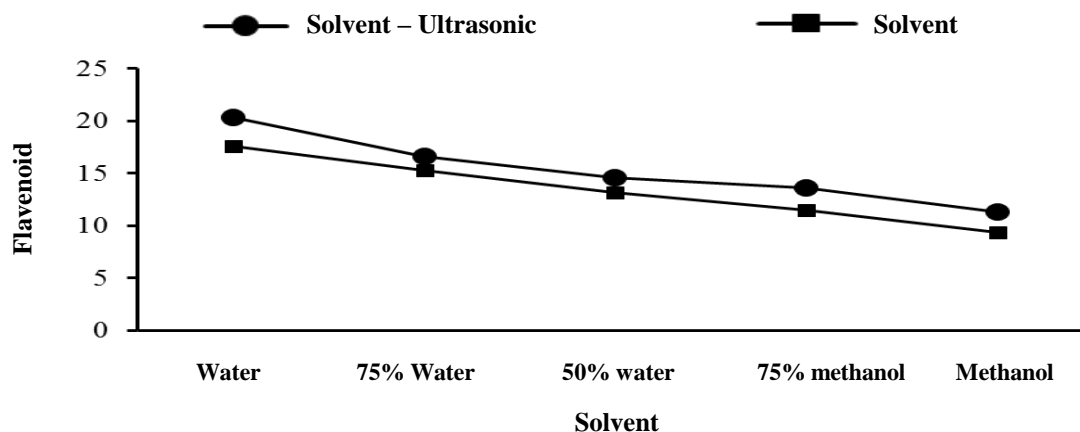


Figure 3. The variation trend of under extraction method of solvent and solvent-ultrasonic

فنولی و فلانوئیدی از گیاه گزنه *Urtica dioica* L. با روش‌های مختلف استخراج نشان داد که روش امواج فراصوت نسبت به روش‌های پیشین استخراج، کارایی بالاتری در استخراج ترکیبات داشتند.

در این تحقیق استخراج عصاره گونه مرزه در حلال‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل از بررسی حلال‌های مختلف نشان داد که استفاده از آب، میزان استخراج ترکیبات را افزایش می‌دهد به طوری که حلال‌های حاوی آب، فنول و فلانوئید بیشتری را استخراج کرده‌اند. ترکیبات فنولی در حلال آب و حلال ۷۵ درصد آب نسبت به حلال‌های دیگر اختلاف معنی‌داری داشته و مدار ترکیبات فنولی بیشتری استخراج شده است. برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی در حلال آب بیشترین مقدار مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری با سایر حلال‌ها داشت در حالی که بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی استخراج شده از حلال‌های دیگر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. بین ترکیبات فلانوئیدی استخراج شده در حلال‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری وجود داشت و حلال آب بیشترین مقدار ترکیبات فلانوئیدی را داشت. آب یک حلال منحصربه‌فرد که در دمای اتاق و فشار اتمسفر به دلیل وجود ساختار گسترده پیوندهای هیدروژنی، حلالی بسیار قطبی با ثابت دی‌الکتریک (ϵ) بالاست (Do et al., 2014; Gavara et al., 2016). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که از لحاظ کارایی و هزینه حلال آب برای استخراج ترکیبات گونه گیاهی مرزه بهترین حلال است. حلال‌های مختلف واکنش‌های متفاوتی را در گیاهان مختلف نسبت به استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی دارند. در این راستا، برای استخراج ترکیبات فنولی و فلانوئیدی از گیاه *Merremia borneensis*، حلال اتانول ۸۰ درصد به‌عنوان بهترین حلال انتخاب شد (Hossain and Shah, 2015).

نتایج کروماتوگرافی تیمار حلال آب-امواج فراصوت که از نظر بیشترین میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدان، فنول و فلانوئید بهتر از سایر تیمارها بودند، نشان داد که فرولیک اسید و روتین به ترتیب با ۹/۱۲ و ۷/۹۷ میلی‌گرم در لیتر بیشترین مقدار را داشتند (جدول ۴).

مقدار ترکیبات فنولی و فلانوئیدی استخراج شده با دو روش نشان داد که در روش حلال-امواج فراصوت مقدار بیشتری به دست آمده است. عرضه روش‌های جدید استخراج ترکیبات فعال بیولوژیکی از گیاهان، به ویژه در صنایع دارویی افزایش یافته است. دلیل این موضوع نیاز به روش ایده‌آل استخراج بوده که بتواند بیشترین مقدار ترکیبات فعالی بیولوژیکی را در کوتاه‌ترین زمان ممکن با کمترین هزینه به دست آورد (Ma et al., 2008). اولتراسونیک از امواج فراصوت می‌باشد که سبب افزایش قطبیت فاز مایع می‌شود. امواج فراصوت منجر به ایجاد نوسانات مکانیکی در محیط مایع می‌گردد. تأثیر مکانیکی فراصوت سبب نفوذ حلال به درون مواد سلولی شده و انتقال جرم را بهبود می‌بخشد. همچنین بازیافت پلی‌فنول‌ها از مواد گیاهی توسط قطبیت حلال مورد استفاده جهت فرآیند استخراج تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Raza et al., 2017) افزایش تحقیقات متعددی در زمینه به کارگیری روش استخراج با کمک امواج فراصوت در استخراج مواد مختلف از قبیل ایزوفلاون‌ها از ریشه *Radix puerariae*، پلی‌ساکاریدها از پوست میوه *Longan*، ترکیبات فنولی از غلات صورت گرفته است (Ma et al., 2008). در این تحقیقات به این نتیجه رسیدند که روش امواج فراصوت به طور قابل ملاحظه‌ای موجب افزایش کارایی استخراج، کاهش زمان و کاهش حجم حلال مصرفی شده است. یافته‌های Sadeghi et al. (2010) در زمینه استخراج ترکیب‌های

Table 4. The concentration of components extracted of *Satureja avromanica* Maroofi

Component	Concentration (mg/l)	Component	Concentration (mg/l)
Gallic acid	3.2	Rutin	7.97
Chlorogenic acid	2.11	Ferulic acid	9.12
Caffeic acid	3.28	Quercetin	1.03
P-Coumaric acid	0.75		

در لیتر برخلاف تحقیق حاضر مقدار ناچیزی بود (Ebrahimi et al., 2017). گالیک اسید نوعی اسید فنولی است که با مقدار آن ۳/۲ میلی گرم در لیتر گزارش شد. این ترکیب در سایر گونه‌های مرزه مانند *S. bachtiarica*، *S. icarica*، *S. coerulea* یافت نشد (Askun et al., 2012). کلروژنیک اسید به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در سیستم عصبی فعالیت می‌کند و عوامل ایجادکننده التهاب در سیستم عصبی را سرکوب می‌نماید و به‌عنوان یک ملین در افراد مبتلا به یبوست کاربرد دارد. مقدار این ترکیب در تحقیق حاضر ۲/۱۱ گزارش شد که در تحقیقات (Ebrahimi et al., 2017) و (Askun et al., 2012) یافت نشد. کوئرستین یک فلاون گیاهی از گروه فلاونوئیدهاست که در بیشتر میوه‌ها، سبزیجات، برگ‌ها و دانه‌ها یافت می‌شود. دارای طعم تلخ و به‌عنوان ترکیب اصلی در نوشیدنی‌ها و غذاها استفاده می‌شود. مقدار آن در این پژوهش برابر ۱/۰۳ میلی گرم در لیتر بود که کمتر از مقدار گزارش شده توسط (Ebrahimi et al., 2017) روی گونه *S. bachtiarica* بود. همچنین مقدار پاراکوماریک اسید در تحقیق حاضر با ۰/۷۵ کمتر از مقدار آن در تحقیق (Ebrahimi et al., 2017) روی گونه *S. bachtiarica* با ۲ میلی گرم در لیتر گزارش شد.

نتیجه‌گیری

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ممکن است در جلوگیری از آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو مفید باشند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که گونه مرزه اورامانی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی است. با توجه به نتایج به‌دست آمده، روش حلال - امواج فراصوت کارایی بالاتری نسبت به روش حلال در استخراج ترکیبات گونه مرزه اورامانی دارد به‌طوری‌که اختلاف بین ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و اثر بازدارندگی دو روش یادشده معنی‌دار بود. همچنین در ترکیبات شناسایی شده گونه مرزه اورامانی در حلال‌های مختلف نشان داد که حلال آب و حلال ۷۵ درصد آب نسبت به

(Metrouh-Amir et al., 2015) نشان دادند که متانول و اتانول ۵۰ درصد بهترین حلال‌ها جهت استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی گل بابونه است. Mozdasta et al. (2015) حلال آب را به‌عنوان بهترین حلال جهت استخراج محتوای فنولی و فلاونوئیدی عصاره گیاه دارویی مورد معرفی کردند که همسو با تحقیق حاضر است. مقادیر فنول کل در گیاهان دارویی آویشن دنایی و مرزنجوش به ترتیب ۹۷ و ۱۴۰ میلی گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک بود که بیشتر از مقادیر به‌دست آمده در تحقیق حاضر بود. همچنین مقدار فلاونوئید کل در این گیاهان به ترتیب برابر ۴۰ و ۶۱ میلی گرم کوئرستین در گرم وزن خشک بود (Mirzaee et al., 2011).

ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی

ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی شناسایی شده توسط دستگاه HPLC در عصاره نمونه‌های نمونه‌های عصاره آبی و امواج فراصوت این تحقیق به ترتیب شامل فرولیک اسید، روتین، کافئیک اسید، گالیک اسید، کلروژنیک اسید، کوئرستین و پاراکوماریک اسید بودند. بیشترین مقدار ترکیب شناسایی شده برابر ۹/۱۲ میلی گرم در لیتر مربوط به فرولیک اسید بود. فرولیک اسید نوعی آنتی‌اکسیدان است که در دیواره سلولی گیاه یافت می‌شود. این ترکیب در محافظت از گیاهان و خودمراقبتی نقش کلیدی و تعیین‌کننده دارد. فرولیک اسید این امکان را دارد تا در درمان مبتلایان به دیابت کارایی بیشتری داشته باشد و اثر مهاری روی رشد سلول‌های سرطان پستان و سلول‌های عصبی دارد. روتین از دیگر ترکیب اصلی عصاره مرزه اورامانی است که مقدار آن در تحقیق حاضر ۷/۹۷ میلی گرم بر گرم بود. مقدار این ماده در *S. bachtiarica* برابر ۱۳/۷۵ میلی گرم در لیتر بود. کافئیک اسید (با مقدار ۳/۲۸ میلی گرم در لیتر در تحقیق حاضر) یک ترکیب ارگانیک است که در تمام گیاهان یافت می‌شود، زیرا یک ترکیب کلیدی در بیوسنتز لیگنین است. مقدار کافئیک اسید در گونه *S. bachtiarica* با ۰/۰۹ میلی گرم

حلال‌های ۵۰ درصد آب، ۷۵ درصد متانول مقدار ترکیبات بیشتری استخراج کرده است که نشان می‌دهد روش حلال آب نسبت به بقیه روش‌ها هم از لحاظ کارایی و هم از لحاظ هزینه روش مناسب‌تری برای استخراج ترکیبات گونه مرزه اورامانی است. فرولیک اسید بالاترین درصد ترکیبات استخراج شده در عصاره

مرزه اورامانی می‌باشد.

سپاس‌گزاری

از مرکز تحقیقات استان کردستان برای جمع‌آوری نمونه‌های مرزه اورامانی و همچنین آقای دکتر اسماعیل خسروپور جهت همکاری در بخش آزمایشگاهی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌نمایم.

References

- Askun, T., Tumen, G., Satıl, F. and Karaarslan, D. (2012). Active constituents of some *Satureja L.* species and their biological activities. *African Journal of Microbiology Research*, 6(22), 4623-4633.
- Blois, M. S. (1985). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S. and Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296-302.
- Ebrahimi, N., Ketabchi, S. and Rowshan, V. (2017). Antibacterial effect and chemical composition of *Satureja bachtiarica*. *Plant Protection Journal of Islamic Azad University of Shiraz*, 9(1), 85-106. [In Farsi]
- Ganzera, M., Zhao, J. and Khan, I. A. (2002). Hypericum perforatum-Chemical profiling and quantitative results of St. John's Wort products by an improved high-performance liquid chromatography method. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(3), 623-630.
- Gavara, R., Lima, J. C. and Rodriguez, L. (2016). Effect of solvent polarity on the spectroscopic properties of an alkynyl gold (I) gelator. The particular case of water. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 15(5), 635-643.
- Hossain, M. A. and Shah, M. D. (2015). A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(1), 66-71.
- Karami, Z., Emam Jomeh, Z., Mirzaie, H., Sadeghi A., Khamiri, M. and Aidani, A. (2011). Comparison of Ultrasonic and Soxhlet extraction methods in extraction of phenolic compounds from licorice root. *Food Processing and Maintenance Journal*, 3(2), 22-1. [In Farsi]
- Ma, Y., Ye, X., Hao, Y., Xu, G., Xu, G. and Liu, D. (2008). Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(3), 227-232.
- Maroofi, H. (2010). Two new plant species from Kurdistan province, West of Iran. *The Iranian Journal of Botany*, 16(1), 76-80. [In Farsi]
- Menendez-Baceta, G., Aceituno-Mata, L., Reyes-Garcia, V., Tardio, J., Salpeteur, M. and Pardo-de-Santayana, M. (2015). The importance of cultural factors in the distribution of medicinal

- plant knowledge: A case study in four Basque regions. *Journal of Ethnopharmacology*, 161(4), 116-127.
- Metrouh-Amir, H., Duarte, C. M. and Maiza, F. (2015). Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant, and antibacterial activities of *Matricaria pubescens*. *Industrial Crops and Products*, 67(2), 249-256.
- Mirzaee, A., Jaberi, H. and Madani, A. (2011). Antioxidant activities, total phenols and total Flavonoids assay of *Origanum vulgare*, *Teucrium polium* and *Thymus daensis*. *Hormozgan Medicinal Journal*, 90(4), 285-294.
- Mozdasta, Sh., Ebrahimzadeh, M. A. and Eslami, Sh. (2015). Effect of increasing the polarity of solvent on total phenol and flavonoid contents and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis* L.). *Journal of Mazandaran University of Medicinal Sciences*, 25(126), 68-81. [In Farsi]
- Mustapa, A. N., Martin, A., Gallego, J. R., Mato, R. B. and Cocero, M. J. (2015). Microwave-assisted extraction of polyphenols from *clinacanthus nutans* Lindau medicinal plant: Energy perspective and kinetics modeling. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 97(4), 66-74.
- Nandes, F. A. N., Linhares, F. E. and Rodrigues, S. (2008). Ultrasound as pretreatment for drying of pineapple. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(6), 1049-1054.
- Noshkam, A., Majnoonhoseini, N., Hadian, J., Jahansoz, M. R., Salehnia, A. and Hedaiatpour, S. (2015). The effect of irrigation regimes on qualitative and quantitative yield of *Satureja khozestanica* and *S. Rechingeri* in west of Lorestan. *Plant Productions*, 38(2), 77-88. [In Farsi]
- Pourmorad, F., Hosseini Mehr, S. J. and Shahabimaj, D. N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(11), 1142-1145.
- Raza, A., Li, F., Xu, X. and Tang, J. (2017). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant polysaccharides from the stem of *Trapa quadrispinosa* using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94(1), 335-344.
- Sadeghi, A., Ebrahimzadeh, A. M., Qurbani, M. and Qarakhabi, M. (2010). Comparison of different methods of extraction of phenolic and flavonoid compounds from *Urtica dioica*. *Research of Iranian Medicinal Plants and Herbs*, 26(3), 389-405. [In Farsi]
- Sefidkon, F., Askari, F., Sadeghzadeh, L. and Olia, P. (2009). Effect of essential oil of *Satureja* (*S. mutica*, *S. edmondi*, *S. bachtiarica*) on *Salmonella paratyphi*. *Iranian Biology Journal*, 22(2), 258-249.
- Sherafati-chaleshati, R., Sherafati-chaleshati, F., Sherafati-Chaleshati, A. and Ashrafi, K. (2009). Antimicrobial effect and determination of phenolic and flavonoid compounds of *Scrophularia striata* ethanol extract. *The Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 11(4), 37-32.
- Siahmansour, Sh., Ismaili, A. and Nazarian Firouzabadi, F. (2018). Effect of different elicitor treatments on hairy root of medicinal plant poppies (*Papaver somniferum* L.). *Plant Productions*, 41(1), 31-42. [In Farsi]
- Sultana, B., Anwar, F. and Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14(6), 2167-2180.
- Wojdyło, A., Oszmianski, J. and Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 105(3), 940-949.

Wu, J., Lin, L. and Chau, F. T. (2001). Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(4), 347-352.