دوره ۲۵، شماره ۸۱، بهار ۱۴۰۱، صفحات: ۳۶-۲۵

مقاله پژوهشی

استخراج و مقایسه برخی ترکیبات بیوشیمیایی برگ بادرنجبویه (Melissa officinalis) و برگ و گل حنا (Impatiens walleriana)

پریچهر حناچی[1*]، رویا صحت[2]، ریحانه رمضانی[3]

[1] دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

[2] کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

[3] استادیار، گروه پژوهشی بیومدیکال،بخش پژوهشکده زنان،دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۰ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۰۷/۰۲

چکیده

مقدمه: عصاره‌های گیاهی و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی آنها دارای خواص ضد میکروبی و ضد سرطانی شناخته شده‌ایی هستند اما روش‌های استخراج و نیز حلال‌های مختلف می‌تواند روی خواص آنها اثرگذار باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی برخی ترکیبات بیولوژیک گیاه گل‌حنا و مقایسه آن با گیاه بادرنجبویه بود.

روش کار:گیاهان از بازار گل محلاتی تهران در سال ۱۳۹۷ تهیه شده و پس از جداسازی اجزای آن و خشک‌کردن در سایه (رطوبت کمتر از ۱٪) آسیاب گردید. پساز تهیه عصاره‌های مختلف از جمله اتانل و متانول، آب و استون به روش خیساندن و اولتراسونیک، به بررسی ترکیبات بیوشیمیایی و مقایسه آن پرداخته شد. تعیین میزان ترکیبات فنلی کل به روش رنگ‌سنجی Folin-Ciocalteu و تعیین محتوای فلاونوئیدی کل به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید و سنجش میزان آنتوسیانین و کاروتنوئید کل در این پژوهش انجام گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که روش عصاره‌گیری خیساندن نسبت به اولتراسونیک در استخراج مواد گیاهان مورد مطالعه موثرتر است و ترکیب اتانول/ متانول با درصد خلوص (نسبت ۱ به ۱) ۷۰ درصد به‌عنوان مناسب‌ترین حلال می‌باشد. بادرنجبویه دارای محتوای فلاونوییدی بیش‌تر به میزان ۰/۱ ±۱ ۸/۷۵ میلیگرم/میلی‌لیتر و برگ حنا محتوای فنلی بیشتری به میزان ۰/۲± ۱۲/۶۶ میلی‌گرم/میلی‌لیتر نسبت به دو ترکیب دیگر داشت. گل حنا به‌علت ترکیب رنگی خود، حاوی آنتوسیانین بیش‌تر به میزان ۰/۰۲± ۲/۰۹ میلی مول/گرم نسبت به دو ترکیب دیگر بود و از بادرنجبویه کاروتنوئید بیش‌تری به مقدار ۰/۰۶± ۵/۰۷ میلی‌گرم/میلی‌لیتر استخراج گردید.

نتیجه گیری: عصاره گیاهان مورد مطالعه، حاوی میزان قابل توجه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد؛ لذا توصیه می‌شود تحقیقات بیش‌تری در زمینه شناسایی کامل این ترکیبات و قدرت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها انجام گیرد.

کلمات کلیدی: بادرنجبویه، حنا، فنل ، فلاونویید، آنتوسیانین، کاروتنوئید

* **نویسنده مسئول:** پریچهر حناچی گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران تلفن۰۲۱۸۸۰۴۴۰۴۰ ایمیل: p.hanachi@alzahra.ac.ir

مقدمه

امروزه بسیاری از متخصصین تغذیه برای تأمین آنتی-اکسیدان‌های مورد نیاز بدن، مصرف گیاهان، میوه‌جات و سبزیجات را توصیه می‌نمایند، زیرا معمولاً مصرف آنتی-اکسیدان‌های گیاهی عوارض جانبی کمتر و درمان بهتری ایجاد می‌نمایند. نظر به این‌که گیاهان یکی از منابع مهم آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشند، تحقیقات در این زمینه روبه افزایش می‌باشد. گیاهانی که غنی از ترکیبات آنتی-اکسیدان بوده، می‌توانند باعث حفاظت سلول‌ها از آسیب اکسیداتیو شوند (۱). آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی باعث افزایش قدرت آنتی‌اکسیدان‌های پلاسما و کاهش ابتلا به برخی بیماری‌ها مانند سرطان، بیماری‌های قلبی و سکته مغزی می‌شوند. متابولیت‌های ثانویه مانند فنل و فلاونوئید تام مشتق از گیاهان دارای پتانسیل قوی برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌باشند که در تمام قسمت‌های مختلف گیاهی مانند برگ، میوه، دانه، ریشه و پوست وجود دارد وگیاهان، دارای طیف گسترده‌ای از ترکیبات بیوشیمیایی می‌باشند (۲). امروزه به‌علت اثرات جانبی متعدد و هزینه‌ی بالای داروهای شیمیایی، علاقه به مصرف داروهای گیاهی روبه افزایش است. این گیاهان برای درمان و یا پیشگیری از بیماری‌های مختلف بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. در بسیاری از کشورهای اروپایی، داروهای گیاهی به‌عنوان داروی اصلی تجویز می‌شوند، اما در ایران و ایالت متحده از داروهای گیاهی به‌عنوان مکمل غذایی استفاده می‌گردد (۳). بادرنجبویه Melissa officinalis، از قدیمی‌ترین و رایج ترین گیاهان دارویی است که متعلق به خانواده نعناعیان Lamiaceae می‌باشد. بوی لیمو از مشخصات این گیاه استوایی است به‌همین دلیل به آن Lemon balm هم گفته می‌شود. در مطالعات متعددی که بر روی این گیاه انجام گرفت است، خواص گوناگونی برای آن به اثبات رسیده است. از رایج‌ترین این خواص می‌توان به آرام-بخشی، آنتی‌اکسیدانی، ضداسپاسمی، ضدنفخ، ضدباکتری، ضدویروسی و ضدالتهابی آن اشاره کرد (۴). از ترکیبات فنول بادرنجبویه می‌توان به رزمارین اسید، تانن، فلاونوئیدهایی هم‌چون اپی‌ژنین-7 -اکسید-گلوکوزید، لوتئولی-7- اکسید-گلکیوزید و سه فلاونول شامل رامنوسیترین، رامنازین و ایزوکوئرسیترین اشاره کرد. نتایج مطالعات اخیر نشان داد که عصاره گیاه بادرنجبویه حاوی اسید رزمارین کی، تری ترپنوئیدها، اولینول کی اسید و اسید اورسال است که از فعالیت گاما-آمینو بوتریک اسید ترانس آمیناز (GABA-T) ممانعت می‌کنند (۵). گیاه گل حنا متعلق به خانواده بالسامیناسه می‌باشد که بومی شرق آفریقای گرمسیری است؛ جنس Impatiens دارای گونه‌های یک ساله حساس یا نیمه مقاوم، مقاوم و حتی درختچه‌های همیشه سبز است. بوته این گل، علفی و ساقه‌های آن گوشتی، آبدار، شفاف و منشعب است. نام جنس گل حنا که به زبان فرانسوی به‌معنی بی‌حوصله است؛ به این دلیل به آن داده شده که در اثر لمس‌کردن کپسول میوه یک‌باره باز شده و بذرها پراکنده می‌شوند (۶). از این گیاه برای درمان بیماری‌های پوستی به‌عنوان یک داروی موضعی استفاده شده است. گونه Impatiens balsamina دارای خاصیت تقویت گردش خون، ضد-قارچی، آنتی‌هیستامین و ضد عفونت می‌باشد (۷).

هدف از این پژوهش سنجش میزان ترکیبات فنلی کل و فلاونوییدی و آنتوسیانین و کاروتنوئید کل در برگ گیاه بادرنجبویه و گل و برگ حنا در حلال‌های متفاوت و روش عصاره‌گیری مختلف و درنهایت مقایسه میزان ترکیبات بیوشیمیایی و انتخاب بهینه روش عصاره گیری در دوگیاه است.

مواد و روش ها

تهیه نمونه

گیاهان مورد آزمایش با نام‌های Melissa Officinalis و Impatiens walleriana در سال ۱۳۹۷ از باغ گل محلاتی تهران تهیه شدند. برگ و گل مورد آزمایش ابتدا در سایه خشک (رطوبت کمتر از ۱٪) و سپس توسط آسیاب خرد شد.

روش استخراج

گیاهان به دو روش خیساندن (Maceration) و اولتراسونیک (Ulrasound Assisd Exracion) با سه حلال آب و استون ۹۹٪ و مخلوط اتانل/ متانل با درصد خلوص (۱ به ۱) ۷۰ درصد به نسبت مساوی عصاره‌گیری شدند. در روش عصاره‌گیری UAE، به ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه ۱۰ میلی‌لیتر از حلال (آب مقطر، اتانول و متانول ۷۰٪ و استون) اضافه شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک با قدرت ۴۰ کیلوهرتز و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از آن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و در آخر روشناور توسط کاغذ صافی جدا گردید (۸).

در روش خیساندن یا Maceration به ۱۰۰ میلی گرم از نمونه، ۱۰ میلی لیتر از حلال (آب، اتانول و متانول ۷۰٪ و استون) اضافه شد و مخلوط به مدت یک ساعت و نیم در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد درون حمام بن ماری قرارداده شد. سپس نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و در آخر روشناور به وسیله کاغذ صافی جدا گردید (۹).

اندازه گیری میزان ترکیبات فنلی تام

محتوای فنلی کل براساس روش رنگ‌سنجی Folin-ciocalteauو با استفاده از گالیک اسید به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. اساس کار در این روش احیاء معرف فولین سیوکالتو توسط ترکیبات فنلی در محیط قلیایی است که با ایجاد یک کمپلکس آبی رنگ همراه است که حداکثر جذب خود را در طول موج ۷۵۰ نانومتر نشان می‌دهد. ابتدا محلول‌های استاندارد با غلظت ۲۵-۲۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از محلول مادر گالیک اسید در آب مقطر تهیه شد. سپس به ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول استاندارد، ۱ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو رقیق شده اضافه گردید. بعد از ۳۰ ثانیه هم‌زدن ۰/۸ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۷ ٪ به آن اضافه شد و بعد از نگهداری به مدت۹۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و تاریکی، جذب آن‌ها در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد و منحنی استاندارد آن‌ها رسم گردید. سپس مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از هریک از عصاره‌های گیاهی را برداشته و مطابق مراحل ذکر شده، محتوای فنلی آن‌ها بر-حسب میلی‌گرم/میلی‌لیتر محاسبه شد (۱۰).

اندازه گیری میزان ترکیبات فلاونوئیدی تام

محتوای فلاونوئیدی کل به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید و با استفاده از کوئرستین به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. ابتدا محلول استاندارد با غلظت ۱۰-۱۰۰ µg/ml از محلول اصلی و اولیه کوئرستین در متانول مطلق تهیه شد. سپس به ۰/۵ ml از محلول استاندارد، ۱/۵ ml متانول، ۰/۱ ml سدیم کربنات ۱۰ ٪ اتانولی و ۰/۱ ml پتاسیم استات اضافه شد و در نهایت به محلول حاصل ۲/۸ ml آب‌مقطر اضافه شد. محلول نهایی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و میزان

جذب نوری آن در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده و منحنی استاندارد آن را رسم شد. سپس ۰/۵ ml از هریک از عصاره های گیاهی برداشته شده است و پس از طی مراحل ذکر شده برای رسم منحنی استاندارد، فلاونوئید کل برحسب mg/g DW به‌دست آمد (۱۰).

اندازه‌گیری محتوای آنتوسیانین کل

برای سنجش میزان آنتوسیانین کل، مقدار ۰/۰۲ گرم از بافت خشک گیاهی با ۴ میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک ۱٪در متانول در یک هاون چینی ساییده شد. محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس، محلول به مدت ۱۰ دقیقه و در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. فاز رویی را برداشته و جذب محلول‌ها در طول موج ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. از محلول اسید کلریدریک ۱٪ در متانول به‌عنوان شاهد استفاده گردید. میزان آنتوسیانین برای هر عصاره با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (۱۱).

$$A = A\,530 - (0/25 \times A\,657) \quad (1)$$

A : جذب محلول(اعداد اندیس نشانگر طول موج‌هایی است که جذب در آن‌ها اندازه‌گیری شده است)

سنجش محتوای کاروتنوئید کل

برای سنجش میزان کاروتنوئید کل، مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تازه گیاهی با ۵ میلی‌لیتر استون در یک هاون چینی سرد و در حمام یخ هموژن شد. سپس به هموژنات حاصل ۱ گرم سولفات سدیم بدون آب افزوده و با استفاده از کاغذ صافی، صاف گردید. محلول صاف‌شده با استون به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و به مدت ۱۰ دقیقه و در ۲۶۰۰ دور سانتریفوژ گردید. فاز رویی برداشته و جذب محلول در طول موج‌های ۶۶۲ و ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری و از استون به عنوان شاهد استفاده شد. میزان کاروتنوئید برای هر عصاره با استفاده از فرمول-های زیر محاسبه گردید (۱۱).

$$C_a = 11/24\ A662 - 2/04\ A645 \quad (2)$$
$$C_b = 20/13\ A645 - 4/19\ A662 \quad (3)$$
$$C_t = 1000\ A470 - 1/9\ A\ C_a - 63/14\ C_b / 214 \quad (4)$$

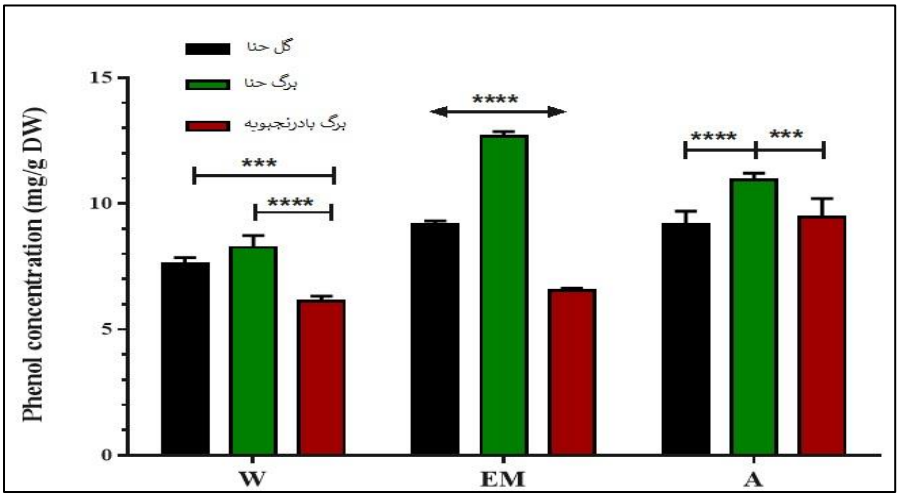
(C_a: میزان کلروفیل A و C_b : میزان کلروفیل B و C_t: میزان کاروتنوئید کل می‌باشد)

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ در سطح معنی‌داری $P<0/05$ تجزیه و تحلیل شدند .تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه برای طرح یک عامل (ANOVA) میانگین‌ها مقایسه و معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها تعیین گردید و داد ها به کمک آزمون چنددامنه ای دانکن گروه‌بندی شدند.

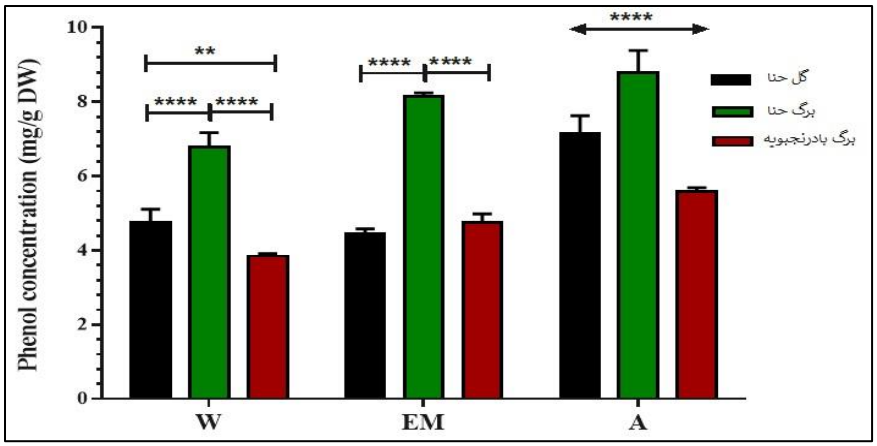
یافته‌ها

نتایج نهایی نشان داد که میزان محتوای فنلی در حلال-های اتانل/متانل و استون عصاره برگ حنا از سایر گروه‌ها و حلال آب به‌صورت معنادار بیش‌تر است (شکل۱).



شکل۱: میزان ترکیبات فنلی به روش خیساندن: میزان محتوای فنلی در حلال‌های اتانل/متانل **(EM)** و استون **(A)** عصاره برگ حنا از سایر گروه‌ها و حلال آب **(W)** به‌صورت معنادار بیش‌تر است

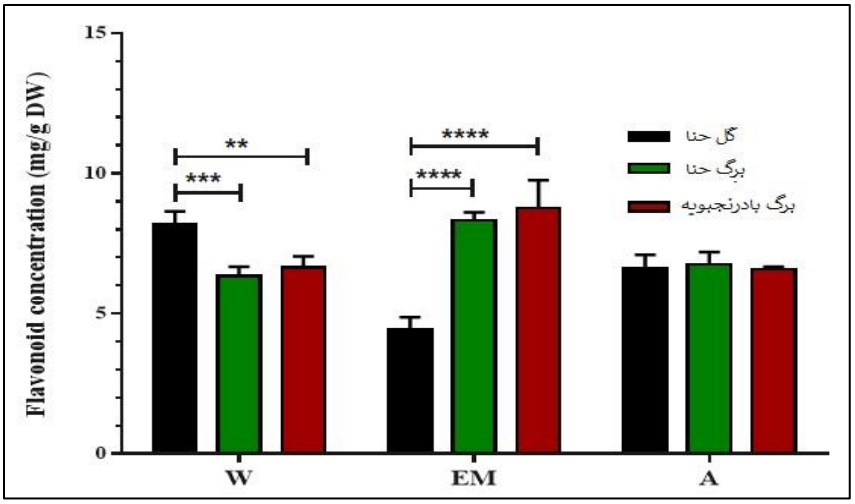
میزان ترکیبات فنولی حاصل از روش عصاره‌گیری اولتراسونیک تحت‌تاثیر نوع گیاه و نوع عصاره حاصل از آن (آبی، اتانولی/متانولی و استونی) قرار دارد (P<۰/۰۵) (شکل۲). نتایج نهایی نشان داد که میزان محتوای فنلی در حلال A و EM عصاره برگ حنا از سایر گروه‌ها و حلال W به‌صورت معنادار بیش‌تر است.



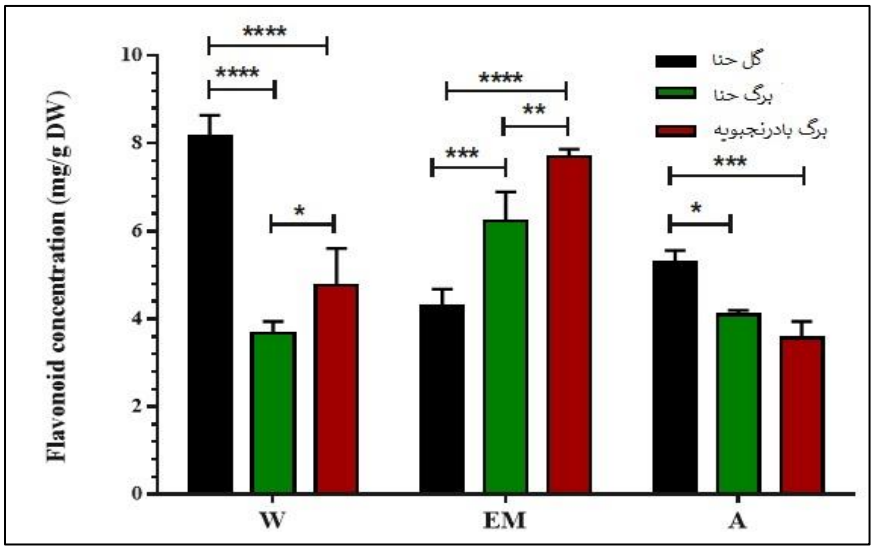
شکل۲: میزان ترکیبات فنلی با حلال‌های مختلف در روش اولتراسونیک: میزان محتوای فنلی در حلال استون**(A)** و اتانل/متانل**(EM)** عصاره برگ حنا از سایر گروه‌ها و حلال آب **(W)** به‌صورت معنادار بیش‌تر است

نتایج نشان داد که روش خیساندن در این زمینه بهتر از روش اولتراسونیک بوده و حلال EM برای روش خیساندن و حلال A برای اولتراسونیک مناسب‌تر می‌باشند و حلال W کم‌ترین بازده را داشت.

میزان محتوای فلاونوئیدی در حلال W عصاره گل حنا و حلال EM عصاره برگ بادرنجبویه و برگ حنا از سایر گروه‌ها و حلال‌ها به‌صورت معنادار (P<۰/۰۵) بیش‌تر است (شکل ۳،۴).

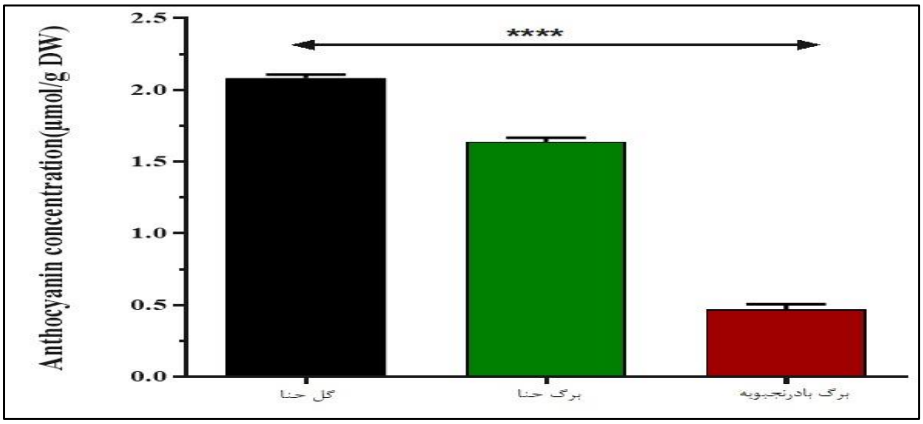


شکل۳: میزان ترکیبات فلاونوئیدی با حلال‌های مختلف در روش خیساندن: میزان محتوای فلاونوئیدی در حلال آب **(W)** عصاره گل حنا و حلال اتانل/متانل **(EM)** عصاره برگ بادرنجبویه و برگ حنا از سایر گروه‌ها و حلال‌ها به‌صورت معنادار بیش‌تر است.



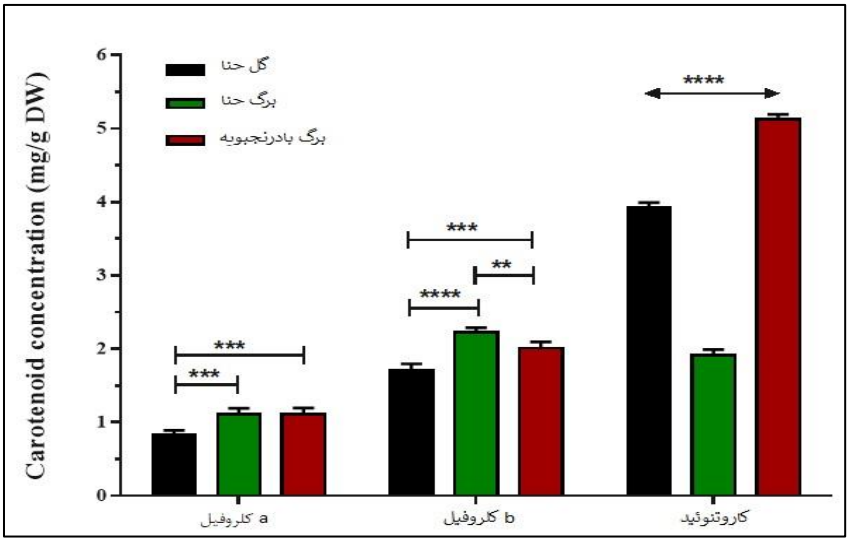
شکل۴: میزان ترکیبات فلاونوئیدی با حلال‌های مختلف در روش اولتراسونیک: میزان محتوای فلاونوئیدی در حلال آب (W) عصاره گل حنا و حلال اتانل/متانل (EM) عصاره برگ بادرنجبویه از سایر گروه‌ها و حلال‌ها به‌صورت معنادار بیش‌تر است.

نتایج نشان داد که روش خیساندن در این زمینه بهتر از روش اولتراسونیک بوده و حلال EM و تا حدی A برای هر دو روش استخراج و حلال W برای اولتراسونیک مناسب‌تر می‌باشند.نتایج حاصل از مقایسه بین گروهی با استفاده از تست تعقیبی Tukey نشان داد که میزان آنتوسیانین استخراجی در گل حنا بصورت معنادار ($P<۰/۰۵$) از سایر گروه ها بیشتر است (شکل ۵).



شکل5: میزان آنتوسیانین: میزان آنتوسیانین استخراجی در گل حنا به‌صورت معنادار ($P<۰/۰۵$) از سایر گروه‌ها بیش‌تر است.

میزان کاروتنوئید استخراجی در برگ بادرنجبویه به‌صورت معنادار ($P<۰/۰۵$) از سایر گروه‌ها بیش‌تر است (شکل۶).



شکل6: میزان کلروفیل **a**، **b** و کاروتنوئید: میزان کاروتنوئید استخراجی در برگ بادرنجبویه به‌صورت معنادار از سایر گروه‌ها بیش‌تر است.

بحث و نتیجه‌گیری

آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنلی یک گروه ویژه از متابولیت-های ثانویه را تشکیل می‌دهند که نقش مهمی در حفاظت بافت‌ها در مقابل اثرات اکسیدکنندگی رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سایر عناصر فعال ایفا می‌کنند. (۱۲). در مورد ترکیبات شیمیایی گیاه بادرنجبویه، برگ آن حاوی یک ماده تلخ، تانن، کامفر، قندهای مختلف، مواد رزینی، مواد پکتیکی، اسانس ملیس که مایعی بی‌رنگ با بوی مطبوع شبیه بوی لیمو می‌باشد (۱۳). در مطالعه Hanganu و همکاران، ۶

ترکیب پلی‌فنلی شامل کافاتوریک اسید، کافئینک اسید، پیکوماریک اسید، فولیک اسید، لوتئولین و اپی ژنین گزارش شد (۱۴). سایر ترکیبات فعال گیاه بادرنجبویه که توسط Ibragić و همکاران گزارش شد که شامل کافئین اسید، اسید کلروژنیک، رزماریک اسید، سوکسینیک اسید، اسید اوسولیک و تیمول بود (۱۵). در مورد گیاه گل حنا نیز حضور ترکیبات فعال گزارش شده است و در این رابطه نشان داده شده که جنس Impatiens دارای ترکیبی به نام ۲- متوکسی ۱ و ۴– نفتوکینون است که این ترکیب برای گونه‌های این جنس دارای خواص ضدقارچی و ضدالتهابی می‌باشد (۱۶). در مطالعه An-Na Li و همکاران که بررسی محتوای فنلی گیاهان دارویی می‌باشد، ترکیباتی مانند گالیک اسید، پروتوکاتوئیک اسید و اپی‌کاتنین در گیاه گل حنا گزارش شده که خواص آنتی‌اکسیدانی داشتند (۱۷). برای افزایش کیفیت استخراج و جداسازی متابولیت‌های گیاهان بادرنجبویه و گل حنا شامل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از دو روش خیساندن و اولتراسونیک به‌همراه سه حلال W، EM و A با درجه قطبیت متفاوت استفاده شد و نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که حلال‌ها با ترکیب شیمیایی و درجه قطبیت متفاوت، توانایی استخراج ترکیبات مختلف از گیاه را دارند که روی خواص آن‌ها تاثیر گذار است. در این پژوهش، استخراج با روش معمول خیساندن در مقایسه با روش اولتراسونیک کارایی بهتری داشته و اثرات کم‌تری روی تخریب محتوای فنلی و فلاونوئیدی داشت. اما در هر روش و باتوجه به نوع گیاه، حلال‌های مختلف کارایی مناسب‌تری داشتند که در این راستا، استخراج هر دو ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی با روش خیساندن به‌ترتیب در حلال EM و A برای فنل‌ها و حلال‌های EM، W و تا حدی A برای فلاونوئیدها کارایی بهتری را نشان دادند. همچنین میزان ترکیبات فنلی در هر دو روش استخراجی به ترتیب در برگ حنا، گل حنا و برگ بادرنجبویه بیش‌ترین میزان را نشان داد، اما میزان ترکیبات فلاونوئیدی در هر عصاره بسته به نوع روش و حلال متفاوت بود. امواج اولتراسونیک یک تکنیک مفید است که نیازمند ابزارهای پیچیده نیست و کم‌هزینه است و می‌تواند در هر دو مقیاس کوچک و بزرگ در استخراج صنعتی داروهای گیاهی استفاده شود (۱۸). اما از طرفی در یک مطالعه مقایسه‌ای نشان داده شد که امواج اولتراسونیک باعث تخریب کمتر فنل‌ها می‌شود و فرایند استخراج ترکیبات فنلی از توت‌فرنگی در مقایسه با روش‌های استخراج دیگر شامل استخراج بحرانی زیر آب، جامد-مایع و مایکروویو سریع تر بود (۱۹). این دو مطالعه نشان می‌دهند که احتمالا شرایط فیزیکی گیاه روی استخراج ترکیبات فنلی با روش اولتراسونیک موثر است و این روش متناسب با نوع گیاه باید بهینه شود و Turrini و همکاران جهت استخراج ترکیبات فنلی از برگ گیاه بنفشه این بهینه-سازی را مورد بررسی قرار دادند (۲۰). در مطالعه حاضر نیز مشخص شد که استخراج ترکیبات فنلی با روش خیساندن بهتر و موثرتر از روش اولتراسونیک بوده که احتمالا به‌دلیل بهینه‌نبودن شرایط اولتراسونیک برای گیاهان مورد مطالعه بوده است. همچنین بازیابی ترکیبات فنلی از مواد گیاهی تحت‌تاثیر زمان استخراج و دما قرار می‌گیرد که این بازیابی از فعالیت متناقض انحلال و تخریب آنالیت از طریق اکسیداسیون است (۲۱). در مطالعه حاضر، در روش خیساندن زمان و دمای استخراج بیشتر از روش اولتراسونیک بوده و احتمالا دلیل دیگری که سبب شده است تا بازده روش خیساندن بهتر شود، پارامتر زمان و دمای استخراج بوده است. از جمله عوامل دیگر که روی استخراج فنلی و فلاونوئیدی موثر است، حلال‌ها می‌باشند. بازده استخراج شیمیایی به نوع حلال با قطبیت‌های مختلف بستگی دارد. مواد گیاهی ممکن است دارای فنل‌های مختلف از ساده مثل اسیدهای فنلی و آنتوسیانین تا مواد پلی مریزه شده بالا مثل تانن در مقادیر مختلف باشد. علاوه بر این فنل‌ها همچنین با دیگر مواد

گیاهی مانند پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها در ارتباط هستند. بنابراین هیچ روش استخراج جهانی که مناسب برای استخراج تمام فنل‌های گیاهی باشد، وجود ندارد. بسته به نوع سیستم حلال مورد استفاده در طول استخراج مخلوطی از فنل‌های محلول در حلال استخراج می‌شوند و این ممکن است دارای بعضی مواد غیرفنلی شامل قندها، اسیدهای آلی و چربی‌ها باشند و بنابراین ممکن است یک مرحله اضافی برای حذف ترکیبات ناخواسته افزوده شود. انواع حلال‌ها مانند آب، متانل، اتانل، استون و اتیل استات و یا ترکیبی از آن‌ها برای استخراج ترکیبات فنلی از مواد گیاهی و اغلب با نسبت های متفاوت از آب استفاده می‌شود. انتخاب حلال درست در میزان و مقدار پلی‌فنل‌ها تاثیر می گذارد (۲۲). در مطالعه Kajdzanoska و همکاران مشخص شد که حلال استونی برای استخراج فنل‌ها از بافت‌نرم توت‌فرنگی بسیار مناسب است (۲۳). همچنین در مطالعه Gouri Dhar و همکاران جهت ارزیابی حلال‌های مختلف روی فنل‌ها و فلاونوئیدهای دو گیاه بنگالی Artocarpus chaplasha، Carissa carandas، مشخص گردید که ترکیبات فلاونوئیدی در حلال‌های EM و A بهتر استخراج و جداسازی می‌شود (۲۴). نتایج این مطالعات با مطالعه حاضر همخوانی داشته و مشاهده شد که فنل‌ها در حلال A وW و فلاونوئیدها در حلال‌های EM و A بهتر جداسازی می‌شوند.

در مطالعه حاضر، میزان ترکیبات آنتوسیانین دو گیاه گل حنا و بادرنجبویه مورد آنالیز قرار گرفت و نتایج نشان داد که میزان ترکیبات آنتوسیانینی در گل و برگ گیاه Impatiens walleriana به ترتیب بیشتر از برگ گیاه بادرنجبویه می‌باشد. آنتوسیانین‌ها مسئول رنگ در گل حنا می‌باشند به‌همین دلیل میزان این ترکیبات در گل گیاه Impatiens walleriana بیشتر از سایر عصاره‌ها بود. همچنین نتایج مطالعه Tatsuzawa و همکاران که به بررسی رابطه بین رنگ گل و ترکیبات فلاونوئیدی روی ۱۰ گونه گیاه Impatiens walleriana پرداخته شد، نشان داد که بیش از ۱۳ نوع ترکیب آنتوسیانینی در این گیاهان وجود دارد و یک نوع آنتوسیانین جدید به نام Peonidin-3-O-glucoside نیز در برگ گونه Impatiens walleriana کشف شد (۲۵). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Aslanipour و همکاران جهت بررسی میزان آنتوسیانین و فلاونوئیدی گیاه بادرنجبویه انجام شد، مشخص گردید که میزان این ترکیبات در برگ گیاه بالا بوده و به آن خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز می‌دهند (۲۶). این نتایج با یافته-های مطالعه حاضر همخوانی داشته و نشان‌دهنده میزان بالای ترکیبات آنتوسیانین در این گیاهان می‌باشد. در بررسی انجام‌شده روی میزان ترکیبات کارتنوئیدی، نتایج نشان داد که این ترکیبات به‌ترتیب در برگ بادرنجبویه بیشتر از گل حنا و برگ آن می‌باشد. در مطالعه Deng و همکاران که جهت ارزیابی تری‌ترپنوئیدهای بادرنجبویه انجام شد، یک تری‌ترپنوئید جدید تحت‌عنوان 2α,3α-dihydroxy-11α,12α-epoxy-urs-28,13β-olide با خاصیت ضدالتهابی قوی کشف گردید (۲۷). در دو مطالعه Yousefzadeh و Mohtashami و همکاران جهت ارزیابی اثرات اقلیم‌های مختلف و شرایط کشت روی خصوصیات بیوشیمیایی بادرنجبویه نشان داد که میزان ترکیبات کارتنوئیدی تحت‌تاثیر اقلیم و شرایط کشت می-باشد (۲۸و۲۹). همچنین در مطالعه Smith و همکاران جهت ارزیابی اثرات شرایط محیطی بر روی ترکیات کارتنوئیدی گیاه گل حنا، مشخص شد که شرایط کشت گیاه و ریزمغذی‌های محیطی روی میزان این ترکیبات موثر است (۳۰).

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که در مجموع روش عصاره‌گیری خیساندن نسبت به اولتراسونیک دراستخراج مواد گیاهان

مورد مطالعه ارجعیت دارد و ترکیب اتانل/ متانل با درصد خلوص (نسبت ۱ به ۱) ۷۰ درصد به‌عنوان مناسب‌ترین حلال انتخاب گردید. بادرنجبویه دارای بیشترین محتوای فلاونوییدی و برگ حنا دارای بیشترین محتوای فنلی است. گل حنا به‌خاطر ترکیبات رنگی خود حاوی آنتوسیانین بیشتر نسبت به دو ترکیب دیگر است و بادرنجبویه بیشترین میزان کاروتنوئید را دارا است. عصاره گیاهان مورد مطالعه نیاز به تحقیقات بیشتری در زمینه شناسایی کامل ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند.

حمایت مالی

این پژوهش از سوی دانشگاه الزهرا حمایت مالی شده است.

ملاحظات اخلاقی

در این پژوهش تمام اصول اخلاقی رعایت شده است.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی دانشکده علوم زیستی دانشگاه الزهرا می‌باشد. بدین‌وسیله از تمامی اساتید و پژوهشگرانی که در انجام این مطالعه یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Zarringhalami R, Hanachi P, Ramezani Tamijani R. Cytotoxic effect of Tilia dasystyla and Polygonatum orientale Desf extracts on AGS and SKOV-3 cancer cell lines. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2020;16(4):9-16.
2. Zarringhalami R, Hanachi P, Kaya E, Ağan AF, Ağan K, Donmez M. Investigation of total phenolic content of Tilia dasystyla and Polygonatum orientale desf extracts and their cytotoxic effect on the osteogenic sarcoma (Saos-2) cancer cell line. International Journal of Cancer Management. 2020 Feb 29;13(2).
3. Rafieian-Kopaei M. Medicinal plants and the human needs. Journal of HerbMed Pharmacology. 2012;1.
4. Miraj S, Rafieian-Kopaei, Kiani S. Melissa officinalis L: A Review study with an antioxidant prospective. Journal of evidence-based complementary & alternative medicine. 2017 Jul;22(3):385-94.
5. Ibarra A, Feuillere N, Roller M, Lesburgere E, Beracochea D. Effects of chronic administration of Melissa officinalis L. extract on anxiety-like reactivity and on circadian and exploratory activities in mice. Phytomedicine. 2010 May 1;17(6):397-403.
6. Hanachi P, Salehizadeh S, Ramezani R, Zarringhalami R. Comparison of antioxidant and anti-bacterial activities of Ocimum basilicum and Impatiens walleriana and their anticancer properties on SKOV-3 cancer cell line. Food Science and Technology. 2020 Nov 10;17(106):95-107.
7. Kang SN, Goo YM, Yang MR, Ibrahim RI, Cho JH, Kim IS, Lee OH. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extract from the stem and leaf of Impatiens balsamina L.(Balsaminaceae) at different harvest times. molecules. 2013 Jun;18(6):6356-65.
8. Mokhtarpour A, Naserian AA, Valizadeh R, Mesgaran MD, Pourmollae F. Extraction of phenolic compounds and tannins from pistachio by-products. Annual Research & Review in Biology. 2014 Jan 8:1330-8.
9. Nadernejad, Nazi, Ali Ahmadimoghadam, Javad Hossyinifard, and Shahram Poorseyedi. "Study of the rootstock and cultivar effect in PAL activity, production of phenolic and flavonoid compounds on flower, leaf and fruit in pistachio (Pistacia vera L.)." 2013: 95-109.
10. Hanachi P, Zarringhalami R, Tamijani RR. Investigation of Antioxidant Properties of Polygonatum orientale Desf and Tilia dasystyla Extracts by Different Methods and Solvents. Hormozgan Medical Journal. 2019 Feb 3;22(4):e86504-.

11. Hanachi P, Saboora O. Investigation of soluble and insoluble tannins and anthocyanins assay in two Cultivar pistachio (Pistacia vera L). Food Science and Technology. 2016 Jun 10;14(63):179-86.
12. Maizura M, Aminah A, Wan Aida WM. Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (Polygonum minus), ginger (Zingiber officinale) and turmeric (Curcuma longa) extract. International Food Research Journal. 2011 May 1;18(2).
13. Sharopov FS, Wink M, Khalifaev DR, Zhang H, Dosoky NS, Setzer WN. Composition and bioactivity of the essential oil of Melissa officinalis L. growing wild in Tajikistan. International Journal of Traditional and Natural Medicines. 2013;2(2):86-96.
14. Hanganu D, Vlase L, Filip L, Sand C, Mirel S, Indrei LL. The study of some polyphenolic compounds from Melissa officinalis L.(Lamiaceae). Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2008 Apr 1;112(2):525-9.
15. Ibragić S, Salihović M, Tahirović I, Toromanović J. Quantification of some phenolic acids in the leaves of Melissa officinalis L. from Turkey and Bosnia. Bull. Chem. Tech. Bosnia Herzegovina. 2014;42:47-50.
16. Brill S, Dean E. Identifying and harvesting edible and medicinal plants in wild (and not so wild) places. Hearst Books; 1994.
17. Li AN, Li S, Li HB, Xu DP, Xu XR, Chen F. Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. Journal of functional foods. 2014 Jan 1;6:319-30.
18. Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrasonics sonochemistry. 2001 Jul 1;8(3):303-13.
19. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules. 2010 Oct;15(10):7313-52.
20. Turrini F, Boggia R, Leardi R, Borriello M, Zunin P. Optimization of the ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from Oryza sativa L.'Violet nori'and determination of the antioxidant properties of its caryopses and leaves. Molecules. 2018 Apr;23(4):844.
21. Haider F, Ullah N. Antioxidant and Antimicrobial activity of Impatiens walleriana local to Malaysia. Moroccan Journal of Chemistry. 2019 Aug 2;7(3):7-3.
22. Abascal K, Ganora L, Yarnell E. The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2005 Aug;19(8):655-60.
23. Kajdzanoska M, Petreska J, Stefova M. Comparison of different extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries. Journal of agricultural and food chemistry. 2011 May 25;59(10):5272-8.
24. Dhar G, Akther S, Sultana A, May U, Islam MM, Dhali M, Sikdar D. Effect of extraction solvents on phenolic contents and antioxidant capacities of Artocarpus chaplasha and Carissa carandas fruits from Bangladesh. J Appl Biol Biotechnol. 2017 May;5(03):39-44.
25. Tatsuzawa F, Suzuki Y, Sato M, Kato K. Flower colors and pigments in the cultivars of Impatiens walleriana. Horticultural Research (Japan). 2016;15(2):115-22.
26. Aslanipour B, Heidari R, Farnad N. Phenolic Combination and Comparison of Antioxidant Activity in Three Different Alcoholic Extracts of Dracocephalum moldavica L. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology. 2017 Mar 26;5(3):199-206.
27. Deng Y, Hua J, Wang W, Zhan Z, Wang A, Luo S. Cytotoxic Terpenoids from the Roots of Dracocephalum taliense. Molecules. 2018 Jan;23(1):57.
28. Mohtashami S, Babalar M, Mirjalili MH. Phenological variation in medicinal traits of Dracocephalum moldavica L.(Lamiaceae) under different growing conditions. Journal of herbs, spices & medicinal plants. 2013 Oct 2;19(4):377-90.
29. Yousefzadeh S, Sefidkon F. Investigation of quantitative and qualitative traits of dragonhead (Dracocephalum moldavica L.) in several habitats of East and West Azerbaijan provinces. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 2016;32(4).
30. Smith BR, Fisher PR, Argo WR. Growth and pigment content of container-grown impatiens and petunia in relation to root substrate pH and applied micronutrient concentration. HortScience. 2004 Oct 1;39(6):1421-5.

Volume 25, Issue 81, Spring 2022, Pages: 25-36

Original Article

Extraction and comparison of some biochemical compounds of *Melissa officinalis* leaves and *Impatiens walleriana* leaves and flowers

Parichehr Hanachi[1]*, Roya Sehat[2], Reihaneh Ramezani[3]

[1]Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
[2] MSc, Department of Bitechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Biomedical Science, Women Research Center, Alzahra University, Tehran, Iran.

Received: 30 April 2021 **Accepted:** 24 September 2021

Abstract

Introduction: Plant extracts and their phenolic and flavonoid compounds have known anti-microbial and anti-cancer properties, but extraction methods and solvents can affect their properties. The aim of this study was to evaluate and comparison of the biological properties of *Impatiens walleriana* and *Melissa officinalis*.

Materials and Methods: Plants were prepared from Tehran local flower market in 2018, isolated, dried in shade (less than 1% moisture) and milled. After preparation of various extracts including ethanol / methanol, aqueous and acetone by maceration and ultrasonic methods, the compounds were examined. The biochemical compounds were compared. Compounds include total phenolic content determined by Folin-Ciocalteu method, total flavonoid content by aluminum chloride method, anthocyanin and total carotenoids by colorimeter methods. The results showed that the maceration extract method was superior to the ultrasonic extraction in studied plants and ethanol / methanol with purity (1: 1 ratio) of 70% was selected as the most suitable solvent.

Results: *Melissa officinalis* had higher flavonoid content of 8.75±1.01 mg / g DW and Impatiens walleriana leaf had more phenolic content of 12.66 ± 0.2 mg / g DW than the other two compounds. Impatiens walleriana flowers had more anthocyanins due to their color composition (2.09 ± 0.02 µmol / g DW) than the other two compounds and *Melissa officinalis* contained the most carotenoid (5.07 ± 0.06 mg / g DW).

Conclusion: Extracts of the studied plants contain significant ($P<0.05$) amount of antioxidant compounds. Therefore, further research is recommended to fully identify these compounds and their antioxidant potency.

Keywords*:* Anthocyanin, Carotenoids, Flavonoid, *Impatiens walleriana*, *Melissa officinalis*, Phenolic

Corresponding Author: Parichehr Hanachi. Department of Biotechnology, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran Tel: 021-88044040; Email: p.hanachi@alzahra.ac.ir