Navid No 25-82 (2022) 38-49
https://doi.org/10.22038/NNJ.2021.56968.1279

Navid No

Journal homepage: https://nnj.mums.ac.ir/

Original Article

Evaluation of total phenolic and flavonoid compounds of *Lavandula angustifolia* and *Melissa officialis* and their antibacterial properties using different solvents and extraction methods

Parichehr Hanachi[1]*, Nasim Ghorbany[2], Hojjat Sadeghi-Aliabadi[3], Khadijeh Kiarostami[4], Fakhri Sadat Hosseini[5]

1. Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
2. MSc Student, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Sciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4. Associate Professor, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
5. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

* Corresponding author: *p.hanachi@alzahra.ac.ir*

Received: 11 April 2021; Revised: 9 October 2021; Accepted: 21 November 2021

Abstract

Background and Aims: Secondary metabolites of plants such as phenols and flavonoids can neutralize free radicals and antioxidant and cytotoxic activities of plants are related to their polyphenolic compounds. Antibiotic resistance has become a major problem in the treatment of infectious diseases and led to the usage of medicinal plants. The purpose of the current study was to investigate the total phenolic and flavonoid compounds of Lavandula angustifolia and Melissa officialis, and evaluate their antibacterial effects on Staphylococcus aureus and Escherichia coli.

Materials and Methods: Two extraction method of lyophilization and the water bath method were used in the extraction of Lavandula angustifolia and Melissa officialis. Folin-ciocalteu and aluminum chloride methods were used for the determination of total phenolic and flavonoid compounds and microdilution broth and disc diffusion methods were used for the evaluation of the antibacterial effect.

Results: The results showed that the total phenolic compounds of Lavandula angustifolia with the amount of 24 ± 0.04 mg /g DW using the lyophilization method and methanol solvent and the total flavonoid compounds of Lavandula angustifolia with the amount of 17.85 ± 0.011 mg /g DW using leophilization and ethanol solvent were the highest amounts among others. Methanol extract of Lavandula angustifolia was the most effective extract with a 9.5 and 7.5 mm zone of inhibition and on Escherichia coli and Staphylococcus aureus respectively.

Conclusion: It can be concluded that Lavandula angustifolia and Melissa officialis contain phenolic and flavonoid compounds that can be used as medicinal plants in the treatment of infectious diseases caused by Staphylococcus aureus and Escherichia.

Keywords
Antibacterial; Flavenoids; Phenol; Lavandula angustifolia; Melissa officinalis.

Cite this article as: Hanachi P, Ghorbani N, Sadeghi AliAbadi H, Kiarostami K, Hosseini FS. Evaluation of total phenolic and flavonoid compounds of Lavandula angustifolia and Melissa officialis and their antibacterial properties using different solvents and extraction methods. Navid No, 2022; 25(82): 38-49. https://doi.org/10.22038/NNJ.2021.56968.1279

E-ISSN: 2645-5927 / P-ISSN: 2645-5919

Copyright: © 2022 by the author.

Open Access: This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Punlisher's Note: Mashhad University of Medical Sciences remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

نوید نو، دوره ۲۵، شماره ۸۲، تابستان ۱۴۰۱، صفحه ۳۸-۴۹
https://doi.org/10.22038/NNJ.2021.56968.1279

نوید نو

Navid No

Journal homepage: https://nnj.mums.ac.ir/

Mashhad University of Medical Sciences

کمیته تحقیقات دانشجویی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد

مقاله پژوهشی

سنجش میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره گیاهان بادرنجبویه و اسطوخودوس با استفاده از حلال‌ها و روش‌های عصاره‌گیری مختلف و بررسی خواص ضدباکتریایی آنها

پریچهر حناچی[۱*]، نسیم قربانی[۲]، حجت صادقی علی آبادی[۳]، خدیجه کیارستمی[۴]، فخری سادات حسینی[۵]

۱. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران.

۲. دانشجوی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران.

۳. دانشیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۴. دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران.

۵. استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران.

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: *p.hanachi@alzahra.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱/۲۲؛ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۷/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۳۰

چکیده

مقدمه و هدف: متابولیت‌های ثانویه گیاهان مانند فنل و فلاونوئیدها توان بالقوه بالایی برای خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد دارند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیکی گیاهان به ترکیبات فنلی یا فلاونوئیدی آنها مرتبط است. امروزه مقاومت آنتی-بیوتیکی به یک مشکل اساسی در درمان بیماری‌ها تبدیل شده است. وقوع مقاومت دارویی در برابر داروهای ضدمیکروبی باعث شده است تا از گیاهان دارویی در معالجه عفونت استفاده شود. هدف از این مطالعه تعیین میزان تام ترکیبات فنلی و فلاونوئیدهای دو گیاه بادرنجبویه و اسطوخودوس و بررسی بهترین حلال و روش عصاره‌گیری و ارزیابی اثرات ضدباکتریایی آنها بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی است.

مواد و روش‌ها: گیاهان بادرنجبویه و اسطوخودوس با دو روش لیو فیلیزه و خیساندن عصاره‌گیری شد و مقدار فنل و فلاونوئید تام عصاره‌ها با استفاده از روش‌های رنگ‌سنجی فولین سیکالتو و کلرید آلومینیوم تعیین شد. فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها با استفاده از روش‌های مایع میکرودایلوشن و انتشار دیسک تعیین گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که مقدار کل ترکیبات فنلی اسطوخودوس با مقدار mg/g DW ۰/۰۴ ± ۲۴ با روش لیوفیلیزه و حلال متانول و میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی اسطوخودوس با میزان mg/g DW ۰/۱۱ ± ۱۷/۸۵ با روش لیوفیلیزه و حلال اتانول بالاترین میزان را دارا بودند. عصاره متانولی گیاه اسطوخودوس بر باکتری اشریشیاکلی با قطر هاله ۱۹ mm بیشترین اثر را نسبت به حلال‌های آبی و اتانولی داشته است. همچنین عصاره متانولی اسطوخودوس با قطر هاله ۱۵ mm بهترین اثر را بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس داشته است.

نتیجه‌گیری: بادرنجبویه و اسطوخودوس حاوی ترکیبات فعال زیستی مانند ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی هستند. بهترین حلال برای عصاره‌گیری این گیاهان، در این مطالعه تعیین گردید که می‌توانند به عنوان گیاهان دارویی برای درمان عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی

ضدباکتریایی، اسطوخودوس، بادرنجبویه، فلاونوئید، فنول.

مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنلی یک گروه ویژه از متابولیت‌های ثانویه را تشکیل می‌دهند که نقش مهمی درحفاظت بافت‌ها در مقابل اثرات اکسیدکنندگی رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سایر عناصر فعال ایفا می‌کنند (۱). آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند از بروز بیماری‌های متعددی از جمله بیماری‌های التهابی، سرطان، دیابت، سکته قلبی، آلزایمر جلوگیری نمایند (۲). امروزه داروهای تجویزی به دلیل هزینه زیاد و عوارض جانبی ناخواسته مانند بسیاری از عوارض جانبی شیمی‌درمانی در معالجه سرطان ترجیح داده نمی‌شوند. در حال حاضر بیماران به دنبال داروهای گیاهی و سایر مواد طبیعی برای درمان بیماری‌ها هستند (۳). عصاره ترکیب‌های طبیعی حاوی مخلوطی از اجزای ترپنیک بوده که دارای خواص ضدمیکروبی و عوارض جانبی کمتر در مقایسه با داروهای شیمیایی می‌باشد. در پژوهش مقتدر و همکاران (۲۰۱۳) اثر ضدباکتری عطرمایه کلپوره و فعالیت ضدباکتری آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که گیاه کلپوره دارای اثر ضدباکتری قابل ملاحظه‌ای می‌باشد. گیاهان خانواده نعناع از جمله کلپوره به سبب وجود ترکیبات ترپنوئیدی گوناگون عطرمایه و ترکیبات فنلی به‌خصوص فلاونوئیدها از لحاظ اثر ضدباکتری بسیار موردتوجه می‌باشد. نتایج بررسی اثرات ضدباکتری این گیاه بر روی باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و باکتری‌های گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا، شیگلا فلکسنری، کلبسیلا پنومونی، سالمونلاتیفی، سراشیا مارسسنس و اشرشیا نشان داد که این گیاه دارای اثرات ضدباکتری قابل‌توجهی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین است (۴).

استافیلوکوکوس‌ها از عوامل بیماری‌زای مهمی برای انسان محسوب می‌شوند و موجب بروز گستره وسیعی از بیماری‌های خطرناک سیستمیک در انسان (از قبیل عفونت‌های پوست، بافت‌های نرم، استخوان ها و مجرای ادرار و عفونت‌های فرصت طلب) می‌شوند. (۵). استافیلوکوک‌ها پس از معرفی پنی‌سیلین، به سرعت نسبت به آن مقاومت نشان دادند و امروزه کمتر از ۱۰ درصد از سویه‌های استافیلوکوک نسبت به این آنتی‌بیوتیک حساس می‌باشند. پنی‌سیلین‌های نیمه سنتتیک مقاوم به بتا لاکتاماز (متی‌سیلین، نفسیلین، اگزاسیلین، دی‌کلوگزاسیلین) تولید شدند که متاسفانه استافیلوکوک‌ها به این گروه آنتی‌بیوتیک‌ها هم مقاومت نشان دادند. استافیلوکوک‌ها توانائی قابل‌توجهی در ایجاد مقاومت در برابر اکثر آنتی‌بیوتک‌ها را دارند. در حال حاضر تنها آنتی‌بیوتیک موثر بر استافیلوکوکوس‌ها، ونکومایسین است (۶). باکتری‌های اشریشیاکلی بیماری‌های متعددی را در انسان ایجاد می‌کنند که از میان آن‌ها ۳۰ تا ۳۵ درصد کل سپتی‌سمی‌ها، بیش از۷۰ درصد عفونت‌های مجرای ادراری و اکثر عفونت‌های روده‌ای را می‌توان نام برد (۷).

گیاه اسطوخودوس *(Lavandula angustifolia)* گیاهی بوته مانند تا ارتفاع حداکثر۶۰ سانتی‌متر از تیره نعنا است. لینالیل‌استات، لینالول، نرول، بورنئول، تانن، ژرامبول، اسیدپروپیونیک، اسیدوالریک، اسیدبوتیریک، فلاونوئیدها و فنل‌ها، کومارین، کادینن، گرانیول برخی از ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده‌ی گیاه اسطوخودوس می‌باشند. پریلیل‌الکل به مقدار خیلی‌کم در گیاه اسطوخودوس یافت می‌شود که براساس تحقیقات انجام‌شده اثر مهارکننده‌ای روی سرطان‌های متعددی از خود نشان می‌دهد (۸). اسطوخودوس گیاهی است دائمی با برگ‌های باریک که در درمان عفونت‌های ریه، مهبل، معالجه خروسک، آسم، گزش حشرات، آماس مثانه، بازدارندگی بر رشد قارچ *Botrytis cinerea* تایید شده است (۹). برومند و همکاران (۲۰۰۸) اثر ضدباکتریایی اسانس گیاه اسطوخودوس را روی باکتری های گرم منفی و مثبت بررسی و نشان دادند که اسانس

اسطوخودوس می‌تواند جایگزین داروهای شیمیایی برای درمان عفونت‌های میکروبی گردد (۱۰).

گیاه بادرنجبویه (*Meliss officialis*) گیاهی دارویی، علفی و پایا، پرشاخه، به ارتفاع ۳۰ تا ۸۰ سانتی‌متر از تیره نعناست. ترکیبات شیمیایی برگ گیاه حاوی یک ماده تلخ، تانن، کامفر، قندهای مختلف، مواد رزینی، مواد پکتیکی، اسانس ملیس که مایعی بیرنگ با بوی مطبوع شبیه بوی لیمو، می‌باشد. از خواص درمانی آن می‌توان به خاصیت ضدتشنج، مقوی معده، اثر آرام‌کننده، بهبودکننده سردرد و سرگیجه، بی‌خوابی، هیستری، دردهای رماتیسمی اشاره نمود (۱۱). بازده استخراج شیمیایی به نوع حلال با قطبیت‌های مختلف و روش عصاره‌گیری 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. علاوه‌بر 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 (۱۲). هدف از این تحقیق، استفاده از برگ گیاهان بادرنجبویه و اسطوخودوس جهت انتخاب بهترین روش عصاره‌گیری و حلال در استخراج ترکیبات بیوشیمیایی مانند ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی گیاهان و بررسی خواص ضدباکتریایی آن‌ها می‌باشد.

روش کار

تهیه نمونه

گیاهان مورد بررسی شامل بادرنجبویه و اسطوخودوس از باغ گیاهان دارویی فیروزه در تهران تهیه گردید. برگ گیاهان در فصل بهار جمع‌آوری و در تاریکی، خشک و آسیاب گردید. پودر تهیه‌شده در دمای اتاق و دور از نور و رطوبت حفظ گردید. تمامی حلال های مورد استفاده برای عصاره‌گیری و سنجش‌های بیوشیمیایی از شرکت مرک و سیگمای آلمان تهیه شد.

روش تهیه پودر لیوفلیزه

در این روش تهیه نمونه، ۱۰ گرم از پودر خشک گیاهان در ۲۵۰ میلی‌لیتر حلال ریخته شد و سپس ۹۰ دقیقه در دمای۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از سانتریفوژ در ۳۰۰۰ دور و به مدت ۱۰ دقیقه و پس از گذراندن از صافی محلول حاصل توسط دستگاه روتاری تغلیظ گردید و به مدت دو هفته داخل فریزر در دمای ۷۰- درجه فریز شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت توسط دستگاه لیوفلیزه به پودر لیوفلیزه تبدیل گردید. پودر حاصل داخل ویال‌های ۵ میلی‌لیتری دربسته و دور از نور و در دمای ۴ درجه تا زمان آنالیز نگهداری شد (۱۳).

روش عصاره‌گیری

مقدار ۲ گرم از نمونه اولیه و لیوفلیزه را در ۲۰ میلی‌لیتر حلال (آب، اتانول ۸۰٪، متانول ۸۰٪) ریخته شد و درون دستگاه بن‌ماری در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. پس از آن، نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در سانتریفیوژ قرار گرفت. در آخر، مایع رویی حاصل از سانتریفوژ از صافی گذرانده شد. عصاره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز نگهداری شد (۱۴). در این مطالعه از سه حلال مختلف (آب، اتانول ۷۰٪، متانول ۷۰٪) و دو روش عصاره‌گیری (لیوفیلیزه و خیساندن) استفاده گردید تا بهینه حلال و روش عصاره‌گیری در استخراج ترکیبات ضدمیکروبی مقایسه گردد.

تعیین محتوای فنلی‌تام

محتوای ترکیبات فنلی‌تام براساس روش رنگ‌سنجی Folin-Ciocalteu با استفاده از گالیک‌اسید به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. به ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول‌های عصاره‌های گیاهی، ۱/۸میلی‌لیتر آب‌مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر

معرف فولین-سیوکالتیو رقیق (v/v۱:۱۵) اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه، با افزودن ۳ میلی‌لیتر از محلول ۷٪ کربنات‌سدیم حجم مخلوط واکنش با آب‌مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد و بعد از ۹۰ دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه جذب نوری آن‌ها در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده و از جذب محلول های استاندارد، منحنی استاندارد آن رسم گردید (۱۵).

تعیین محتوای فلاونوئیدتام گیاهان

محتوای فلاونوئیدتام به روش رنگ‌سنجی کلریدآلومینیوم با استفاده از کوئرستین به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. ابتدا محلول‌های استاندارد با غلظت‌های (صفر تا۱۰۰) میلی‌گرم بر لیتر از محلول استوک کوئرستین در متانول مطلق تهیه گردید. سپس به ۰/۲ میلی‌لیتر محلول استاندارد ۰/۲ میلی‌لیتر کلریدآلومینیوم و ۰/۱ میلی‌لیتر استیک‌اسید ۳۳٪ آبی افزوده و به خوبی هم‌زده شد. درنهایت مخلوط واکنش با اتانول ۹۶٪ به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد و در دمای ۲۵ درجه به مدت ۳۰ دقیقه حفظ گردید. سپس در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده و منحنی استاندارد رسم شد (۱۶).

تعیین حساسیت ضدمیکروبی به روش انتشار از دیسک

سویه‌های مورد مطالعه که قبلا با محیط کشت نوترینت-براث آماده شده بود، بر روی محیط مولرهینتون‌آگار (شرکت مرک) به منظور به‌دست آوردن تک‌کلونی، به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر در سطح پلیت ریخته و با سوآپ استریل در جهات مختلف پخش گردید. پلیت داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید. پلیت‌های آماده‌شده شامل سه دیسک بلانک و یک دیسک آنتی‌بیوتیک (دیسک جنتامایسین mcg ۱۰) در داخل خانه‌ها به صورت کاملا استریل قرار گرفت. آنگاه ۵۰ میکرولیتر از عصاره قبلا تهیه‌شده با غلظت‌های ۴۰،۵۰،۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در سه حلال آب، اتانول، متانول را پس از عبور از فیلتر با قطر ۰/۲ میکرون به صورت کاملا استریل به ترتیب روی دیسک بلانک گذاشته شده بر محیط کشت حاوی باکتری تلقیح شد. درنهایت پلیت‌ها را داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه انکوبه نموده و پس از ۲۴ ساعت نتایج برسی شد (۷).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی (MIC ,MBC)

درون میکروتیوپ‌های ۲ تا ۹، مقدار ۴۵۰ میکرولیتر از محیط اضافه شد و میزان ۴۵۰ میکرولیتر از عصاره‌های گیاهی به درون چاهک‌های ۱و ۲ اضافه شد. سپس از میکروتیوپ شماره ۲، ۴۵۰ میکرولیتر به میکروتیوپ شماره ۳ ریخته شد و سری رقت به همین ترتیب تا میکروتیوپ شماره ۸ ساخته شد و در آخر ۴۵۰ میکرولیتر از میکروتیوپ شماره ۸ دور ریخته شد. در مرحله بعد به تمام میکروتیوپ‌ها به میزان ۱۰۰میکرولیتر از میکروارگانیسم اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، به میزان ۱۰ میکرولیتر از هر میکروتیوپ بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت برده شد. در این مطالعه کنترل مثبت، میکروتیوپ حاوی باکتری و محیط کشت و کنترل منفی، میکروتیوپ حاوی باکتری و عصاره گیاهی می‌باشد. در پایان، باتوجه‌به غلظت‌های به‌دست آمده از تست MIC، میزان MBC برای هر غلظت از عصاره محاسبه شد (۱۴و۱۷).

تجزیه و تحلیل آماری

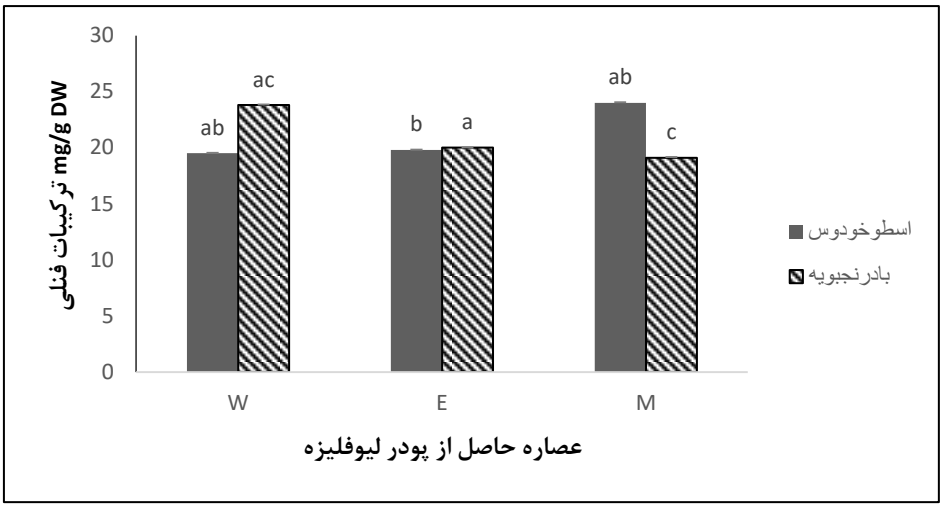
تمام آزمایش‌های انجام‌شده برای سنجش ترکیبات فنلی - کل در این پژوهش براساس طرح آماری بلوک‌های کاملا تصادفی در ۳ تکرار طراحی شده‌اند. بعد از انجام هر سنجش، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ در سطح احتمال $P<0/05$ تحلیل شدند. براساس نوع عوامل مورد آزمایش به کمک تجزیه واریانس یک‌طرفه برای طرح

یک عامل (ANOVA) میانگین‌ها مقایسه و معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها تعیین گردید و داده‌ها به کمک آزمون چنددامنه‌ای دانکن گروه‌بندی شدند.

یافته‌ها

مقایسه محتوای ترکیبات فنلی حاصل از پودر لیوفلیزه گیاهان

نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین محتوای ترکیبات فنلی در عصاره حاصل از پودر لیوفلیزه گیاه اسطوخودوس به ترتیب در عصاره متانولی mg/g DW ۰/۰۴ ± ۲۴، و کمترین ترکیب فنلی در عصاره آبی پودر لیوفلیزه گیاه اسطوخودوس mg/g DW ۰/۰۳۵ ± ۱۹/۵ به‌دست آمد. بیشترین و کمترین محتوای فنلی در عصاره حاصل از پودر لیوفلیزه در گیاه بادرنجبویه به ترتیب در حلال آبی این گیاه mg/g DW ۰/۰۶ ± ۲۳/۸ و کمترین مقدار در این گیاه در عصاره متانولی به میزان mg/g DW ۰/۰۲ ± ۱۹ به‌دست آمد. در سنجش ترکیبات فنلی پودر لیوفلیزه این دو گیاه، بیشترین ترکیب در عصاره متانولی گیاه اسطوخودوس و کمترین مقدار در عصاره آبی این گیاه بود.

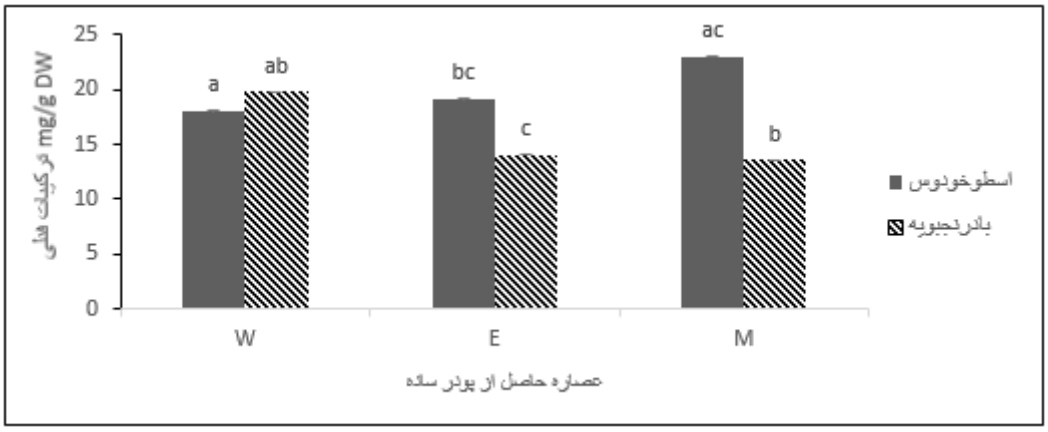


شکل ۱- میزان ترکیب فنلی در عصاره حاصل از پودر لیوفلیزه آبی (w)، اتانولی (E)، متانولی(M) در گیاه اسطوخودوس و بادرنجبویه

مقادیر بین میانگین‌ها با حروف متفاوت در ستون‌های مشابه، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

مقایسه محتوای فنلی حاصل از پودر اولیه گیاهان

نتایج حاصل از بررسی میزان ترکیبات فنلی عصاره‌های حاصل از پودر اولیه از برگ گیاهان اسطوخودوس و بادرنجبویه که در حلال‌های آبی، اتانولی، متانولی که به روش خیساندن عصاره‌گیری گردید، نشان داد که در گیاه اسطوخودوس عصاره متانولی mg/g DW ۰/۰۹ ± ۲۳ بیشترین مقدار ترکیبات فنلی را داشته است و این مقدار در عصاره اتانولی و آبی به ترتیب mg/g DW ۰/۰۳ ± ۱۹ و mg/g DW ۰/۰۲ ± ۱۸ می‌باشد. در گیاه بادرنجبویه نیز عصاره آبی بیشترین مقدار ترکیب فنلی mg/g DW ۰/۰۱۴ ± ۱۹/۸را داشته و این ترکیب در عصاره اتانولی و متانولی به ترتیب mg/g DW ۰/۰۱۱ ± ۱۴ و mg/g DW ۰/۰۱۷ ± ۱۳/۶ بوده است. نتایج کلی نشان داد بیشترین ترکیب فنلی از پودر اولیه در عصاره متانولی گیاه اسطوخودوس mg/g DW ۰/۰۹۲ ± ۲۳ و کمترین مقدار در عصاره متانولی گیاه بادرنجبویه mg/g DW ۰/۰۱۷ ± ۱۳/۶ به‌دست آمد.

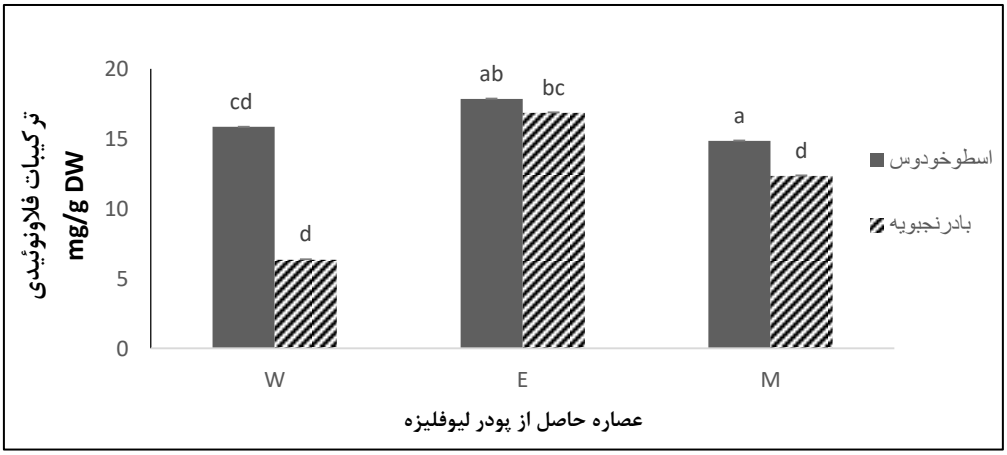


شکل ۲- میزان ترکیب فنلی در عصاره حاصل از پودر اولیه، آبی(w)، اتانولی(E)، متانولی(M) به ترتیب در گیاه اسطوخودوس و بادرنجبویه

مقادیر بین میانگین‌ها با حروف متفاوت در ستون‌های مشابه، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

مقایسه محتوای ترکیبات فلاونوئیدی استخراج‌شده از پودر لیوفلیزه

نتایج حاصل از محاسبه میانگین ترکیبات فلاونوئیدی گیاه اسطوخودوس و بادرنجبویه در حلال‌های آبی، اتانولی، متانولی به روش خیساندن نشان داد که در اسطوخودوس بیشترین و کمترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی به ترتیب ۱۷/۸۵ ±۰/۰۱۱ mg/g DW در عصاره اتانولی، ۰/۰۲۳± ۱۵/۸۵ mg/g DW در عصاره آبی و ۰/۰۲۵± ۱۴/۸۵ mg/g DW در عصاره متانول این گیاه می‌باشد و در گیاه بادرنجبویه به ترتیب در عصاره اتانولی ۰/۰۲۳± ۱۶/۸۵ mg/g DW، عصاره متانولی ۰/۰۴۶± ۱۲/۳ mg/g DW و عصاره آبی ۰/۰۰۷± ۶/۳۵ mg/g DWبه‌دست آمد. بیشترین ترکیب فلاونوئیدی در عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس ۰/۰۱۱± ۱۷/۸۵ mg/g DW و کمترین میزان در عصاره آبی گیاه بادرنجبویه ۰/۰۰۷± ۶/۳۵ mg/g DW به‌دست آمد.

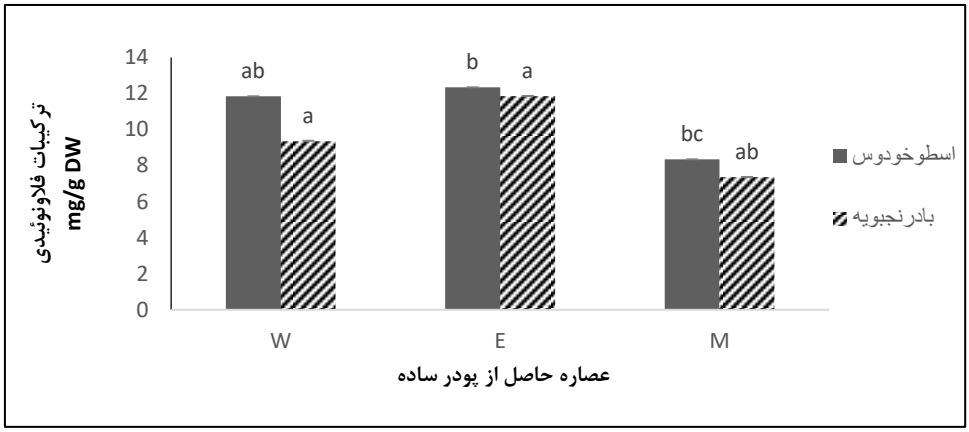


شکل ۳- ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره حاصل از پودر لیوفلیزه آبی (W)، اتانولی (E)، متانولی (M) در گیاه اسطوخودوس و بادرنجبویه

مقادیر بین میانگین‌ها با حروف متفاوت در ستون‌های مشابه، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

مقایسه محتوای ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده از پودر اولیه گیاهان

نتایج حاصل از محاسبه میانگین محتوای ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌های تهیه‌شده از پودر اولیه برگ گیاهان اسطوخودوس و بادرنجبویه در حلال‌های آبی، متانولی، اتانولی، که به روش خیساندن عصاره‌گیری شد، نشان داد در گیاه اسطوخودوس بیشترین و کمترین مقدار به ترتیب، در عصاره اتانولی این گیاه ۱۲/۳۵ ±۰/۰۱ mg/g DW، عصاره آبی ۱۱/۸۵ ±۰/۰۲ mg/g DW، عصاره متانولی ۸/۳۵ ±۰/۰۵۷ mg/g DW، به‌دست آمد. در گیاه بادرنجبویه نیز میزان ترکیب فلاونوئیدی به ترتیب در عصاره آبی ۹/۳۵ ±۰/۰۲۵ mg/g DW، در عصاره اتانولی ۱۱/۸۵ ±۰/۰۸۱ mg/g DW، عصاره متانولی ۰/۰۱۷ ± ۷/۳۵ mg/g DW به‌دست آمد. مقایسه نتایج نشان داد عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس ۱۲/۳۵ ±۰/۰۱۱ mg/g DW بیشترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی و عصاره متانولی بادرنجبویه ۷/۳۵ ±۰/۰۱۷ mg/g DW کمترین میزان را داشته است.



شکل ۴- میزان ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره حاصل از پودر اولیه، آبی(W)، اتانولی(E)، متانولی(M) در گیاه اسطوخودوس و بادرنجبویه

مقادیر بین میانگین‌ها با حروف متفاوت در ستون‌های مشابه، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

نتایج حاصل از روش انتشار دیسک و MIC

عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی، حاصل از پودر لیوفلیزه بادرنجبویه و اسطوخودوس به منظور تعیین خصوصیات ضدمیکروبی در مقابل باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی بررسی گردید.

عصاره متانولی گیاه اسطوخودوس بر روی باکتری اشریشیاکلی با قطر هاله ۱۹ mm بیشترین اثر را نسبت به حلال‌های آبی و اتانولی داشته است. همچنین عصاره متانولی اسطوخودوس با قطر هاله ۱۵ mm بهترین اثر را بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس داشته است. نتایج MIC و MBC نشان داد عصاره متانولی و اتانولی بادرنجبویه نیز مانند اسطوخودوس و عصاره آبی با غلظت (۶۰ mg/ml) هر دو گیاه بر رشد باکتری اشریشیاکلی اثر نداشته است. عصاره متانولی و اتانولی دو گیاه بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نیز نشان داد که اثر بازدارندگی رشد داشته و کدورت تشکیل نشده است. ولی عصاره آبی (۶۰ mg/ml) هر دو گیاه نشان داد هیچ اثری بر باکتری-های مورد مطالعه نداشته است.

جدول ۱- قطر هاله عدم رشد دو گیاه بر باکتری اشریشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس

گیاهان	حلال	قطر هاله (mm) در باکتری *Staphylococcus aureus*			قطر هاله (mm) در باکتری E. Coli		
		۴۰ mg/ml	۵۰ mg/ml	۶۰ mg/ml	۴۰ mg/ml	۵۰ mg/ml	۶۰ mg/ml
اسطوخودوس	آب	۰	۰	۰	۰	۰	۷
	اتانول	۱۱	۱۳	۱۳	۱۳	۱۵	۱۵
	متانول	۹	۱۱	۱۵	۱۱	۱۷	۱۹
بادرنجبویه	آب	۰	۰	۷	۰	۰	۸
	اتانول	۱۱	۱۱	۱۱	۹	۱۳	۱۳
	متانول	۷	۹	۱۳	۱۱	۱۱	۱۳

بحث

گیاهان دارویی حاوی ترکیبات فعال زیستی از جمله فلاونوئید، پلی‌فنل‌ها، آلکالوئید و پلی‌ساکاریدها با ساختار-های متفاوتی هستند که ویژگی‌های فارماکولوژیکی مانند آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدالتهابی، کاهش فشارخون، ضداسترس، فعالیت ضدسرطانی و آرام‌بخش آن‌ها به خوبی شناخته شده است. استخراج این ترکیبات به عوامل متعددی بستگی دارد که مهم‌ترین آن‌ها نوع حلال و روش استخراج می‌باشند. انتخاب روش استخراج (لیوفیلیزه و خیساندن) و حلال (آب، اتانول و متانول) بستگی به قسمت‌های مختلف یک گیاه و نیز مواد متشکله آن دارد. انتخاب حلال مخصوص برای هر دسته از ترکیبات گیاهی بسیار مشکل است. زیرا همراه با این ترکیبات مواد دیگری نیز وجود دارد که بر روی درجه حلالیت آن ها تاثیرگذار می‌باشند (۶). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که حلال‌ها با ترکیب شیمیایی و درجه قطبیت متفاوت توانایی استخراج ترکیبات مختلفی از گیاه را دارند که روی خواص آن تاثیرگذار است. نتایج تحقیق حاج مهدی پور و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد کارایی استخراج ترکیبات فنلی توسط حلال‌های قطبی به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است. بنابراین آب به دلیل قطبیت بالا در بیشتر استخراج‌ها نسبت به اتانول و متانول بیشترین ترکیبات فنلی را استخراج نموده است. در تحقیق حاضر نیز مقایسه نتایج استخراج ترکیبات فنلی با سه حلال آب، اتانول و متانول در گیاه بادرنجبویه نشان داد که در هر دو روش استفاده از پودر لیوفلیزه و پودر اولیه گیاه عصاره آبی گیاه بادرنجبویه بیشترین ترکیب فنلی را استخراج نموده است و در گیاه اسطوخودوس عصاره اتانولی و متانولی نسبت به عصاره آبی کمی بهتر عمل نموده‌اند. بنابراین باتوجه‌به اینکه در تحقیق حاج مهدی پور و همکاران نیز نتیجه مشابه حاصل شد؛ می‌توان نتیجه گرفت حلال آبی و متانولی برای استخراج ترکیب فنلی برخی گیاهان بهتر است و این از لحاظ اقتصادی نیز به‌صرفه می‌باشد. جداسازی ترکیبات موثره توسط حلال به ساختار شیمیایی و درجه قطبیت آن‌ها در محل ذخیره‌سازی در اندامک‌های گیاهی وابسته است. درنتیجه برای فهم کارایی حلال‌ها، دانش کافی در مورد ساختار ترکیبات گیاهی ضروری است (۲). در پژو هش Flamini و همکاران (۲۰۰۱) بازده استخراج عصاره دارچین توسط حلال متانول در هر دو روش حلال سرد و سوکسله بالاتر از حلال استون تعیین شد. در مقایسه کلی بین دو حلال و دو روش استخراج، عصاره متانولی حاصل از

روش سوکسله بیشترین راندمان استخراج را داشت. در مطالعه حاضر نیز در گیاه اسطوخودوس بیشترین ترکیب فنلی در هر دو روش پودر اولیه و لیوفلیزه در عصاره متانولی به‌دست آمد (۱۸). در پژوهش حاضر محتوای ترکیبات فنلی توسط حلال‌ها با قطبیت بیشتر به‌طور معنا-داری بالاتر از حلال‌های غیرقطبی بود. سیستم حلال آب بیشترین محتوای فنلی را در گیاه بادرنجبویه داشت و با این واقعیت که حلال‌های قطبی به دلیل داشتن ثابت دی-الکتریک بالا مطلوب‌تر هستند، جهت استخراج منطبق بود (۱۸). در سال ۲۰۰۱، Williams و همکاران گزارش کردند که حلال اتانول- آبی نسبت به متانول و استن برای عصاره‌گیری فلاونوئیدها از گیاه چای مناسب‌تر است و برای استخراج ترکیبات فنلی از پوست بادام زمینی اتانول و متانول از آب بهتر می‌باشد (۱۹). نتایج به‌دست آمده از استخراج ترکیبات فلاونوئیدی اسطوخودوس و بادرنجبویه نشان داد حلال اتانول در گیاهان مورد مطالعه بیشترین مقدارفلاونوئید را داشته است و مقایسه پودر لیوفلیزه و اولیه نشان داد در پودر لیوفلیزه ترکیبات فلاونوئیدی بیشتری استخراج شده است. بنابراین نتایج تحقیق حاضر با تحقیق Williams که حلال اتانولی برای استخراج فلاونوئید بهتر بوده، منطبق است (۱۷). نتایج مطالعه Kumar و همکاران (۲۰۱۳) در استخراج ترکیبات فنلی از سبوس جو نشان داد که محتوای فنلی استخراج‌شده توسط متانول حدود ۳ برابر بالاتر از استون و ۴ برابر بیشتر از هگزان بود (۲۰). Golluce و همکاران در سال ۲۰۰۷ در تحقیقی بر روی گیاه جنسینگ و مقایسه حلال‌های مختلف دریافتند که عصاره‌های اتانولی، حاوی مقدار بالاتری از فنل و فلاونوئیدتام نسبت به عصاره متانولی و آب می‌باشد. ولی در مطالعه حاضر حلال آب در گیاه بادرنجبویه و حلال متانول در اسطوخودوس، بیشترین ترکیب فنلی را استخراج کرد. عصاره اتانولی پژوهش حاضر، مشابه تحقیق Golluce در همه عصاره‌ها بیشترین ترکیب فلاونوئیدی را داشته است (۲۱). برخی از این ترکیبات فنلی بر غشای پلاسمایی یا روی مهار آنزیم‌های غشایی میکروارگانیسم‌ها موثر است. روش‌های استخراج و محتوی لیپیدی گیاهان بر فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های گیاهی تاثیر زیادی داشته است؛ اگرچه عصاره‌های بدون لیپید روی باکتری‌های گرم منفی مثل اشریشیاکلی بی‌اثر بوده است (۲۲).

نتیجه‌گیری

در این تحقیق باتوجه‌به اینکه عصاره متانولی گیاه اسطوخودوس ترکیب فنلی بالاتری نسبت به دو حلال دیگر داشته و این عصاره خاصیت ضدباکتریایی بیشتری بر باکتری اشریشیاکلی داشته است؛ درنتیجه ارتباط مستقیمی بین ترکیب فنلی و خاصیت ضدباکتریایی این گیاه می‌تواند وجود داشته باشد. پیشنهاد می‌شود برای تایید این موضوع، تاثیر ترکیب خالص فنلی این گیاه بر باکتری‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

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.

حمایت مالی

این پژوهش از طرف 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.

مراجع

[1] 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 1;13(2). 19

[2] Hajimehdipoor H, Khanavi M, Shekarchi M, Abedi Z, Pirali Hamedani M. Investigation of the best method for extraction of phenolic compounds from Echinaceae purpurea L.(Moench). *Journal of Medicinal Plants*. 2009 Dec 15;4(32):145-52.

[3] 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*. 2018 Dec 31;22(4).

[4] Moghtader M, Salari H, Farahmand A. Anti-bacterial Effects of the Essential Oil of Teucrium polium L. on Human Pathogenic Bacteria. *Iranian Journal of Medical Microbiology.* 2013; 7 (2) :1-7

[5] Darabpour E, Motamedi H, Nejad SM. Antimicrobial properties of Teucrium polium against some clinical pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2010 Feb 1;3(2):124-7.

[6] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*. 2004 Aug 1;94(3):223-53.

[7] Oliveira JL, Diniz MD, Lima ED, Souza EL, Trajano VN, Santos BH. Effectiveness of Origanum vulgare L. and Origanum majorana L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2009 Feb;52(1):45-50.

[8] Azadmehr A, Hajiaghaee R, Rezazadeh S, Afshari A, Baradaran B, Ebrahimi P. Evaluation of Lavandula officinalis extract on Lymphocyte proliferation and tumor necrosis factor-alpha production. *Journal of Medicinal Plants*. 2011 Oct 10;2(38):142

[9] Roller S, Ernest N, Buckle J. The antimicrobial activity of high-necrodane and other lavender oils on methicillin-sensitive and-resistant Staphylococcus aureus (MSSA and MRSA*). The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2009 Mar 1;15(3):275-9.

[10] Boroumand A, Hamedi M, Emam JZ, Razavi SH, Golmakani M. Investigation on the antimicrobial effects of essential oils from dill and coriander seeds on Staphylococcus aureus, Escherichia coli O157: H7 and Salmonella Typhimuruim. *The Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 2008: 59-68.

[11] 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.

[12] 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.

[13] Ebrahimzadeh MA, Azadbakht M. Extraction and camparison of amount of pectin, degree of estrification and galacturonic acid content in some citrus fruit peels. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences.* 2006 Oct 15;16(54):52-9.

[14] Behbahani BA, Yazdi FT, Mortazavi A, Zendeboodi F, Gholian CM, Vasiee A. Effect of aqueous and ethanolic extract of Eucalyptus camaldulensis L. on food infection and intoxication microorganisms “in vitro”. *Journal of Paramedical Sciences.*2013;4(3):2008-4978.

[15] Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. 2005 Jul;40(3):255-60.

[16] Beketov EV, Pakhomov VP, Nesterova OV. Improved method of flavonoid extraction from bird cherry fruits. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2005 June 1;39(6):316-8.

[17] Vukovic N, Milosevic T, Sukdolak S, Solujic S. Antimicrobial activities of essential oil and methanol extract of Teucrium

montanum. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2007;4(S1):17-20.

[18] Flamini G, Cioni PL, Morelli I, Maccioni S, Monti G. Composition of the essential oil of Teucrium fruticans L. from the Maremma Regional Park (Tuscany, Italy). *Flavour and fragrance journal.* 2001 Sep;16(5):367-9.

[19] Williams CA, Greenham J, Harborne JB. The role of lipophilic and polar flavonoids in the classification of temperate members of the Anthemideae. Biochemical Systematics and Ecology. 2001 Oct 1;29(9):929-45.

[20] Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal.* 2013; 2013.

[21] Gulluce M, Sahin F, Sokmen MU, Ozer H, Daferera D, Sokmen AT, Polissiou M, Adiguzel A, Ozkan H. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. longifolia. *Food chemistry.* 2007 Jan 1;103(4):1449-56.

[22] 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.