



بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی، اتانولی برگ گیاه دارویی رزماری (*Rosmarinus officinalis*) تحت تاثیر امواج فراصوت

راحله نجفی^{۱*}، دکتر شاهپور خانقلی^۲

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران

۲. استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران

*نویسنده مسئول: rahelehnaajafi@ut.ac.ir

چکیده

رزماری گونه‌ای با اثر آنتی اکسیدانی بالاست، که به طور گسترده به عنوان یک ادویه پذیرفته شده است. این آزمایش به منظور بررسی عصاره‌های متانولی و اتانولی تحت تاثیر امواج فراصوت بر برخی از صفات کیفی برگ گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) انجام شد. عصاره‌ها با حلال‌های متانول ۸۰٪ و اتانول ۸۰٪ در حمام اولتراسوند با شدت ثابت و فرکانس ۴۰ هرتز در دمای ۳۱ درجه سانتیگراد در ۴ سطح زمانی (۰،۳۰،۶۰،۹۰) دقیقه بدست آمدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار به اجرا درآمد. نتایج آزمایش نشان داد که میزان عملکرد عصاره، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها، فلاونوئید کل در بین دو نوع حلال دارای اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ می‌باشند. بیشترین عملکرد عصاره، خاصیت آنتی اکسیدانی و فنول کل مربوط به حلال اتانول بود. میزان فنول کل در تیمار امواج فراصوت در سطح ۵٪ معنی دار شد. بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی در آزمون مهار رادیکالهای آزاد (DPPH) مربوط به عصاره اتانولی در زمان ۳۰ دقیقه امواج فراصوت بود. بیشترین مقدار فلاونوئید کل مربوط به عصاره متانولی در زمان ۹۰ دقیقه امواج فراصوت بود. کلمات کلیدی: رزماری (*Rosmarinus officinalis*)، خواص آنتی اکسیدان، اولتراسونیک، عصاره.

مقدمه

رزماری (*Rosmarinus officinalis*) گیاهی متعلق به خانواده نعناعیان و جزء گیاهان دارویی و خاص است که بومی مناطق مدیترانه می‌باشد. به صورت کاشته شده در تهران، سمنان، دامغان یافت می‌شود. برگها و گلهای این گیاه حاوی مواد موثره هستند از این رو ساختار رویشی رزماری از بوی مطبوعی برخوردار است. عصاره رزماری به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی قوی که دارد در صنایع غذایی بسیار کاربرد داشته و این خاصیت به دلیل وجود ترکیباتی مثل کارنوزیک اسید، کارنوزول، رزمانول، کوئینون و رزماری فنول است که این ترکیبات زنجیره تولید رادیکالهای آزاد را با دادن یک اتم هیدروژن می‌شکنند و متعاقب آن اکسیداسیون چربی را به تاخیر می‌اندازد. طبق مطالعات صورت گرفته، رزماری ۴ برابر بتا هیدروکسی اسید (BHA) و بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) خاصیت آنتی اکسیدانی دارد (Leung and Katial, 2008).

رادیکال‌های آزاد با دارا بودن الکترونهای تک، بسیار واکنش پذیرند و آسیبهای فراوانی را به مولکولهای زیستی مانند پروتئینها، لیپیدها، نوکلئیک اسیدها و کربوهیدراتها وارد می‌کنند. گزارش شده است کارنوزیک اسید که فراوان ترین ترکیب فنولیک دی ترپن موجود در برگ های رزماری است، بیشترین اثر آنتی اکسیدانی را در میان سایر ترکیبات فنولیک داراست و خاصیت ضد میکروبی عصاره رزماری به اثبات رسیده است (Cadun et al., 2008).

امواج فراصوت کاربردهای زیادی در کشاورزی دارد، از اینرو هدف از این تحقیق، مطالعه همزمان در زمینه فعالیت آنتی اکسیدانی و امواج فراصوت در گیاه دارویی رزماری انجام شد. در این مطالعه به بررسی توانایی مهار کنندگی رادیکالهای آزاد و سایر صفات توسط عصاره‌های مختلف متانولی و اتانولی تحت تاثیر امواج فراصوت در گیاه مذکور پرداخته شد.



مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه: برگ‌های گیاه رزماری در بهمن ماه سال ۱۳۹۵ از دانشگاه شاهد تهران جمع‌آوری شد و در آون در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳ روز خشک شدند. نمونه‌های خشک شده برای عصاره‌گیری توسط خرد کن آسیاب شدند. و سپس عصاره‌گیری به روش ماسراسیون انجام گرفت. برای تهیه عصاره متانولی و اتانولی گیاه رزماری تحت تاثیر امواج فراصوت میزان ۲ گرم از نمونه با ۳۰ میلی‌لیتر از حلال (متانول ۸۰٪ و اتانول ۸۰٪) با ۳ تکرار با یکدیگر مخلوط شده و به صورت تصادفی درون دستگاه حمام اولتراسوند در ۴ سطح زمانی (۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه) در معرض امواج اولتراسوند با شدت ثابت و فرکانس ۴۰ هرتز در دمای ۳۱ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. بعد از عصاره‌گیری صفات ذیل مورد بررسی و آزمایش قرار گیرند.

(الف) عملکرد عصاره: پس از صاف کردن و تبخیر حلال‌ها (متانول و اتانول) عصاره باقی مانده به شکل یک عصاره سبز رنگ بدست آمد. و درصد وزن عصاره (عملکرد عصاره) محاسبه شد.

(ب) بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی با روش مهار رادیکال آزاد (DPPH): از روش (Burits and Bucar, 2000) استفاده شد.

(ج) تعیین محتوای کلی فنول: محتوای ترکیبات فنولی از طریق متد فولین سیو کالتیو مورد بررسی قرار گرفت (Ordon et al., 2008). و نتایج به صورت مقادیر هم‌ارز با استاندارد گالیک اسید بیان شد.

(د) تعیین محتوای کلی فلاونوئیدی (TFC): مقدار کل فلاونوئیدها (TFC) بر اساس روش توصیف شده توسط Tan و Zarina (۲۰۱۳) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار به اجرا درآمد. تجزیه واریانس داده‌های توسط نرم افزار SAS مدل ۹/۱ انجام شد. میانگین داده‌ها نیز با آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۵٪ مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث:

مقایسه میانگین اثر امواج بر عصاره نشان داد که تیمار امواج فراصوت بر مقدار پلی فنول برگ گیاه رزماری در سطح احتمال ۵٪ تاثیر معنی‌دار بوده و با افزایش مدت زمان امواج فراصوت درصد وزن عصاره‌ها، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار فلاونوئید افزایش یافت. بین زمان‌های مختلف امواج فراصوت بر درصد وزن عصاره‌ها و خاصیت آنتی‌اکسیدانی اختلاف معنی‌داری ایجاد نشد و مقدار فلاونوئید با افزایش مدت زمان امواج فراصوت افزایش یافت، که زمان ۹۰ دقیقه امواج فراصوت با ۱۰۶/۶۲ میلی‌گرم بر لیتر بر گرم عصاره بیشترین میزان را داشته و کمترین میانگین مربوط به زمان صفر بود. بالاترین میانگین زمان‌های امواج فراصوت بر میزان فنول کل مربوط به زمان ۳۰ دقیقه و زمان شاهد کمترین مقدار را داشت (جدول ۱). نتایج نشان داد که اثر حلال بر میزان عملکرد عصاره، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها، فلاونوئید کل در سطح احتمال ($p < 0/05$) معنی‌دار است. مقایسه میانگین اثر حلال‌ها بر عملکرد عصاره نشان داد که حلال اتانول بیشترین میزان تاثیر را بر میزان عملکرد عصاره، فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشته و در صفت فلاونوئید بیشترین میزان تاثیر مربوط به عصاره متانولی بوده است (جدول ۲).

در اثر متقابل بین این دو فاکتور (شکل ۱) مشاهده شد که با کاهش مدت زمان امواج فراصوت و حلال اتانول میزان عملکرد عصاره افزایش یافت. و میزان عملکرد عصاره با حلال متانولی و کاهش مدت زمان امواج فراصوت کاهش یافت. در شکل (۲) اثرات متقابل بین این دو تیمار بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که زمان‌های (۹۰، ۳۰، ۰) امواج فراصوت تفاوتی با یکدیگر نداشته و بالاترین میزان را داشتند و کمترین میانگین مربوط به عصاره متانولی و زمان ۶۰ دقیقه امواج فراصوت با (۸۳/۰۱۷ درصد) بود. با توجه به (شکل ۳) بالاترین میانگین اثر متقابل این دو فاکتور بر صفت فنول کل مربوط به تیمار عصاره اتانولی و زمان ۳۰ دقیقه امواج فراصوت بود. و در شکل (۴) مشاهده شد که صفت فلاونوئید در زمان ۹۰ دقیقه امواج فراصوت و حلال متانول مقدار بیشترین میزان بود، این امر بدین معنی

است که حلال‌های غیر قطبی‌تر مانند متانول توانایی بیشتری در استخراج فلاونوئید داشتند. که با نتایج Jalali و همکاران (۱۳۹۲)، Casazza و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت دارد. و با کاهش مدت زمان امواج فراصوت و حلال اتانولی مقدار فلاونوئید کاهش یافت.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر امواج فراصوت بر صفات مورد مطالعه در برگ گیاه رزماری

فلاونوئید (میلیگرم بر لیتر بر گرم عصاره)	پلی فنول (میلیگرم بر لیتر بر گرم عصاره)	آنتی اکسیدان (درصد)	عملکرد عصاره (درصد)	تیمار امواج فراصوت(دقیقه)
۱۰۶/۶۲ a	۱۰۷/۷۰ a	۸۴/۵۲۵a	۱۲/۴۸۳ a	شاهد (U1)
۹۴/۶۶ab	۸۸/۲۴ab	۸۶/۰۲۹a	۱۲/۶۲۵ a	۳۰ (U2)
۹۲/۱۲ab	۸۸/۱۶ab	۸۶/۰۴۰ a	۱۲/۷۵۰ a	۶۰ (U3)
۷۰/۱۴b	۷۱/۷۸b	۸۶/۱۴۳a	۱۲/۸۰۸ a	۹۰ (U4)

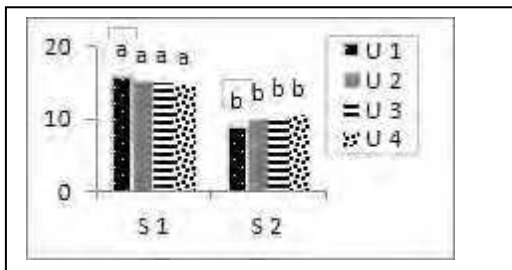
میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر نوع حلال بر صفات مورد مطالعه در برگ گیاه رزماری

فلاونوئید (میلیگرم بر لیتر بر گرم عصاره)	پلی فنول (میلیگرم بر لیتر بر گرم عصاره)	آنتی اکسیدان (درصد)	عملکرد عصاره (درصد)	تیمار نوع حلال
۸/۷۱۲ b	۹۲/۶۷۳a	۸۷/۱۹۱a	۱۵/۳۰۸ a	اتانول (S1)
۱۷۳/۰۶a	۸۱/۷۶۷a	۸۶/۱۷۸b	۱۰/۰۲۵ b	متانول (S2)

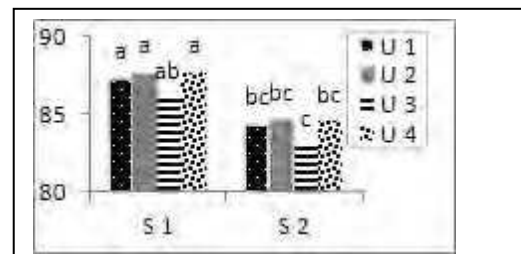
میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

درصد عملکرد عصاره



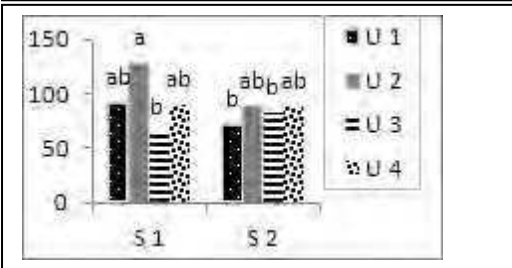
شکل ۱: اثر متقابل امواج و حلال بر عملکرد عصاره رزماری

درصد آنتی اکسیدان



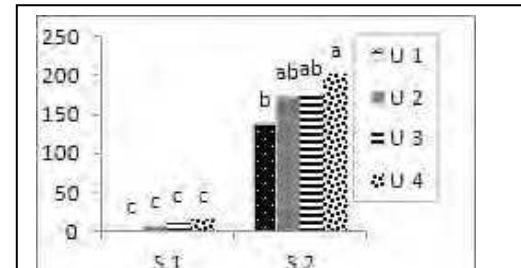
شکل ۲: اثر متقابل امواج و حلال بر آنتی اکسیدان رزماری

پلی فنول (میلیگرم بر لیتر بر گرم عصاره)



شکل ۳: اثر متقابل امواج و حلال بر فنول کل رزماری

فلاونوئید (میلیگرم بر لیتر بر گرم عصاره)



شکل ۴: اثر متقابل امواج و حلال بر فلاونوئید رزماری



Sharififar و همکاران (2007) مطرح کردند که استفاده از حلال‌های آلی مثل اتانول باعث می‌شود یک محیط نسبتاً قطبی تشکیل گردد که می‌تواند مقادیر و انواع بیشتری از ترکیب‌های فنولی با قطبیت متوسط را استخراج کند. از طرف دیگر حضور عواملی مثل امواج فراصوت موجب افزایش سطح تماس بین ماتریکس گیاهی و حلال و در نتیجه افزایش استخراج می‌گردد. بر اساس این مطالعه اظهار شد که عصاره قطبی آویشن شیرازی دارای اثر آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشد که این موضوع با یافته‌های ما نیز مطابقت دارد.

Jamshidi و همکاران (۲۰۱۰) عصاره‌ی متانولی چند گیاه بومی مازندران را از نظر میزان ترکیبات فنلی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه آن‌ها نشان دادند که ارتباط مناسبی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات پلی‌فنلی گیاه وجود دارد. در پژوهشی، Chegani و همکاران (۱۳۹۴) بیشترین میزان فلاونوئید را به عصاره متانولی در برگ گیاه شوید مطرح کردند. امواج در یک فرکانس و شدت معینی می‌توانند رشد و تقسیم سلول‌ها را در گیاه افزایش دهند. طبق این فرضیه تحریک صوتی نه تنها صدمه‌ای به سلول‌ها وارد نمی‌کند بلکه می‌تواند رشد آنها را هم افزایش دهد. زمان استخراج نیز تأثیر معنی‌داری بر میزان ترکیب‌های فنولی کل داشت زیرا با گذشت زمان حلال فرصت پیدا می‌کند که به درون بافت گیاهی نفوذ کرده و ترکیب‌های فنولی نیز فرصت کافی برای جدا شدن و ورود به حلال داشته باشند (Wang et al., 2002). Tang و همکاران در (2011) اثر استخراج آنتوسیانین‌های شاه توت با کمک اولتراسوند را در زمان‌های مختلف بررسی کردند که مشخص شد مقدار استخراج آنتوسیانین از زمان ۲۰ تا ۴۰ دقیقه افزایش پیدا می‌کند.

نتیجه گیری

در مجموع نتایج حاصل از این آزمایش نشان داده است که عصاره گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) به طور قابل ملاحظه‌ای دارای مقادیر بالایی از ترکیبات فنولیک می‌باشد مطالعات نشان داده که افزایش سطح این مواد در رژیم غذایی منجر به کاهش برخی از بیماری‌ها در انسان می‌شود. ترکیب فنولی (رزمارینیک اسید) می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره‌های تهیه شده از گیاه را توجیه نماید. لذا پیشنهاد می‌شود تحقیقاتی جامع با تیمارهای مختلفی مانند: انتخاب نوع حلال، مدت زمان امواج فراصوت، شدت امواج، فرکانس‌های بالاتر از ۴۰ کیلو هرتز و اثر دماهای مختلف انجام گیرد تا بر میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی این گیاه متمرکز باشد.

منابع

1. Chegani, M., Babakhani, B, and Sarpooshan, F., 1394. Evaluation of the antioxidant activity of methanolic, ethanolic and aqueous extracts of plant leaves (*Anethum graveolens L.*). The first National Conference on Medicinal Plants and Herbal Medicines of Shahid Beheshti University. Tehran, 7 Khordad, 6 p.
2. Cadun, A., Kışla, D., & Çaklı, Ş. (2008). Marination of deep-water pink shrimp with rosemary extract and the determination of its shelf-life. *Food Chemistry*, 109(1), 81-87.
3. Casazza, A.A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G. and Perego, P., 2010. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using nonconventional techniques. *Journal of Food Engineering*, 100(1): 50-55.
4. Jalali, R., Niazmand, R, and Noughabi, M., 1392. Antioxidant activity of methanolic, aqueous and ethanolic extracts of purple seed in Iran. Abstracts of the 21st national congress of science and technology of iran. Shiraz, 7-9 Aban: 4p.
5. Jamshidi M, Ahmadi HR, Rezazadeh Sh, Fathi F, Mazanderani M. (2010). Study on phenolic and antioxidant activity of some selected plant of Mazandaran province. *Medic Plan* 2010; 9(34) 177-183.
6. Leung, S, Katial.K (2008). The Diagnosis and Management of *Acute and Chronic Sinusitis*. The Diagnosis and Management of Acute and Chronic Sinusitis. *Prim Care Clin Office Pract* 35 (2008) 11–24.
7. Sharififar F, Moshafi MH, Mansouri SH, Khodashenas M, Khoshnoodi M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora. Boiss.* *Food Control* 2007; 18: 800-5.
8. Tang, Z., OuYang, H., He, M. Z., (2011). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Anthocyanins from *Mulberry*, Using Response Surface Methodology. *Int. J. Mol. Sci.* pp:3006-3017.
9. Wang, X., Wang, B., Jia, Y., Duan, C.H. and Akio, S., 2002. Effect of sound water on synthesis of nucleic acid and protein in *chrysanthemum*. *Colloids and Surfaces, B: Biointerface*, 29: 99-102.