فصلنامه علمی - پژوهشی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۳ ، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹

تعیین‌ترکیبات شیمیایی اسانس و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی گیاه بادرنجبویه بهشهر

سید علی رضایی جمنانی[۱]، علی میرابی*[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۱۶

چکیده

این تحقیق به‌منظور آنالیز اسانس و عصاره‌ی اتانولی و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی برگ گیاه بادرنجبویه (Melissa officinalis) منطقه هزارجریب بهشهر به عنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی انجام شد. برگ گیاه از رویشگاه‌های طبیعی آن در ارتفاعات استان مازندران و در اوایل شهریور ماه جمع‌آوری شد. در این مطالعه، تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس و عصاره اتانولی برگ گیاه با دستگاه GC/MS بررسی شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی با استفاده از روش DPPH بررسی و با آنتی‌اکسیدان سنتزی آسکوربیک اسید مقایسه شد. نتایج نشان داد که اجزای اصلی اسانس به ترتیب فنوکسی اتانول (۳۱/۶۶٪)، مجموع اناتیومر کاریوفیلن اکساید (۲۴/۷۱٪)، مجموع اناتیومر سیترال (۱۳/۸۹٪) و مجموع اناتیومر کاریوفیلن (۹/۸۸٪) و اجزای اصلی عصاره اتانولی به ترتیب کاریوفیلن اکساید (۲۸/۹۵٪)، ۲-هیدرازینو نیکوتینیک اسید (۱۱/۳۷٪)، فیتول (۸/۶۱٪) و بتا-کاریوفیلن (۷/۴۴٪) می‌باشند. همچنین Ic_{50} عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی به ترتیب ۳۹/۰۵ و ۹۸/۹۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در روش FRAP توان احیاکنندگی عصاره های اتانولی و n-هگزانی به ترتیب ۹۱/۳ و ۱۰۵/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شدند. با مقایسه‌ی نتایج به‌دست آمده، عصاره‌ها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و توانایی احیاکنندگی هستند و می‌توانند در صنعت دارویی به‌کار روند.

واژه های کلیدی: ***آنتی‌اکسیدان، اسانس ، بادرنجبویه.***

مقدمه

گرایش عمومی به استفاده از داروهای گیاهی و به‌طور کلی فراورده‌های طبیعی در جهان به ویژه در سال‌های اخیر رو به افزایش است. مهم‌ترین علل این گرایش را می‌توان اثرات داروهای شیمیایی از یک طرف و ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از مواد شیمیایی در کارخانه‌های داروسازی از سوی دیگر دانست (Martinez *et al*., 2001). امروزه علاقه فراوانی در استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی وجود دارد، چون آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از مشکلات سمیت ناشی از استفاده داروهای

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائم شهر، گروه شیمی، قائم شهر، ایران.
۲- دانشیار شیمی تجزیه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائم شهر، گروه شیمی، قائم شهر، ایران
*(نویسنده مسئول: a.mirabi@qaemiau.ac.ir)

شـــیمیایی جلوگیری می‌کنند و گیاهان، ترکیبات فیتوشـــیمیایی فراوانی دارند که منبع آنتی‌اکســـیدان‌های طبیعی هســـتند (Kulisic *et al.*, 2004).

بادرنجبویه یا بادرنگبویه یا وارنگ‌بو (*Melissa officinalis*) گیاهی معطر و علفی و از راسته لب‌گلی‌ها (*Lamiales*) و تیره نعنائیان (*Lamiaceae*) است. ملیسا (*Melissa*) نام علمی بادرنجبویه است که از واژه‌ای یونانی، به معنای زنبور گرفته شده است، چون این گیاه محبوب زنبور عسل است. بادرنجبویه را از دوران‌های باستان می‌شناختند و در واقع اطبای ایران و عرب بودند که برای نخستین بار بادربجبویه را به عنوان داروی قلب به‌کار بردند و به دنبال آن کشیش‌های کارتلیت در قرن ۱۷، الکلی ساختند که به نام آب بادرنجبویه معروف بود (Capecka, 2005). در قدیم عمده مصرف بادرنجبویه مربوط به خواص ضد نفخ و ضد تب آن بوده است (Lamaison *et al.*, 1991)، و بوعلی سینا آن را در رده داروهای تقویت قلب و همچنین موثر برای تقویت نیروی حیاتی بدن دانسته است (Ministry of Health, 2002).

این گیاه بومی مناطق شرق مدیترانه و غرب آسیا است (Zargari, 1995). در ایران نیز این گیاه در نواحی گوناگون به‌صورت خودرو، در کنار جاده‌ها است. اغلب مناطقی که بادرنجبویه از آن گزارش شده اطراف تهران، کرج، کرمانشاه، جنگل گلستان، مازندران، گیلان و آذربایجان است (Hariry, 2011). مهم‌ترین مراکز کشت و صادرات بادرنجبویه در کشورهای لهستان، مجارستان، رومانی، یونان، فرانسه و بلغارستان می‌باشد (Amoee, 2009).

ساقـــه‌هـای گیـاه بادرنجـــبویه چهـارگوش و کمـــی کرکـدار اسـت و بـه بلنـدی سـی تـا هشـــتاد سـانتی‌متـر مـــی‌رســـند. (Haji-sharifi, 2016)

برگ‌های زرد مایل به سبز آن به شکل بیضی و یا قلب هستند و لبه‌ی آنها دندانه دندانه است و وقتی برگ‌ها له شوند، بوی لیمو شیرین از آنها متصاعد می‌شود، همچنین موجب از بین رفتن افسردگی می‌شود.

از مهم‌ترین خواص این گیاه می‌توان آرام بخش بودن آن را نام برد. بادرنجبویه دارای خواص نیرودهنده و ضد تشنج است، همچنین مقوی معده، بادشکن، آرام‌بخش، تسهیل کننده عمل هضم و معرق است و به خاطر تحریک جریان خون باعث ازدیاد ادرار و عرق می‌شود (Wenying *et al.*, 2003). در درمان میگرن و هیستری مصرف می‌شود و اثرات ضد ویروس و ایدز نیز دارد که مربوط به کافئیک اسید و تانن موجود در آن است. از بادرنجبویه برای رفع دل پیچه‌های ناشی از نفخ، دردهای عصبی معده، تپش قلب، سردرد و سرگیجه، کم خونی و بیماری‌های تنفسی استفاده می‌شود. همچنین برای رفع فساد دندان مفید است و جویدن تازه آن بوی بد دهان را مرتفع می‌سازد و همچنین از برگ تازه آن برای رفع سوزش و درد، در محل گزش زنبور استفاده می‌شود (Patora & Klimek, 2002). در تحقیقات اخیر از بادرنجبویه در درمان آلزایمر نیز استفاده می‌شود (Rojhan, 1998). امروزه از اسانس و عصاره‌ی گیاه بادرنجبویه، در تهیه فراورده‌های دارویی استفاده می‌شود (Andreas *et al.*, 1990, Heins, 1980) و همچنین اثر ضد باکتریایی اسانس بادرنجبویه بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی شده است (مقتدر، ۱۳۹۲). در این

آزمایش‌ها مشخص شد که اثر اسانس گیاه بر روی باکتری‌های گرم مثبت، استافیلوکوکوس، اپیدرمیدیس و باکتری‌های گرم منفی کلبسیلا پنومونی و اشرشیاکلی، بیشتر از اثر آنتی‌بیوتیک تتراساکلین است. با توجه به درصد بالای ترکیبات سیترونلال و کارواکرول موجود در گیاه که خواص ضدباکتریایی دارند از اسانس این گیاه می‌توان برای مقابله با باکتری‌های بیماری‌زای خاص استفاده کرد (Klink, 1997). همچنین تاثیر عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه بر میزان آنزیم‌های کبدی و تغییرات پاتولوژی آن در موش‌های صرعی بررسی شد که نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد بادرنجبویه با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد تشنجی، می‌تواند آسیب‌های ناشی از داروهای شیمیایی را کاهش دهد و از بافت کبدی محافظت کند. تاثیر ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی بادرنجبویه نیز بررسی شد (هریزچی و فرخی، ۱۳۹۳). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که عصاره بادرنجبویه دارای فعالیت ضد قارچی است و مقدار IC_{50} برای عصاره بادرنجبویه ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. تحقیق حاضر با هدف بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و توانایی احیاکنندگی عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی برگ گیاه بادرنجبویه برای نخستین بار در منطقه هزارجریب بهشهر انجام گرفت و همچنین ترکیب مواد متشکله اسانس و عصاره‌ی اتانولی برگ این گیاه به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی (GC-MS) تعیین شد.

روش کار

تهیه‌ی گیاه

گیاه بادرنجبویه از منطقه هزارجریب در جنوب‌شرقی شهرستان بهشهر، بین ۳ استان مازندران، گلستان و سمنان با موقعیت جغرافیایی ۲۸-۳۶۰ تا ۴۰-۳۶۰ عرض شمالی و ۴۱-۵۳ تا ۹-۵۴ طول شرقی و در ارتفاع ۱۳۰۰ متری در استان مازندران در اوایل شهریور ماه ۱۳۹۳ جمع‌آوری شد و سپس برگ این گیاه جدا و در سایه و مجاورت هوا، خشک و به وسیله آسیاب‌برقی خرد شده و به صورت پودر درآمد.

تهیه اسانس بادرنجبویه

۴۰ گرم از پودر گیاه خشک شده پس از توزین به همراه ۶۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون بالن ته‌گرد قرار گرفت و سپس توسط دستگاه کلونجر به مدت ۵ ساعت با سرعت تقطیر یک میلی‌لیتر در دقیقه اسانس‌گیری شد. در ادامه، اسانس با سولفات سدیم بدون آب (Merck)، آبگیری و در ظرف دربسته تیره‌رنگ، دوراز نور و در یخچال نگهداری شد.

تهیه عصاره ها

در دو ظرف به صورت جداگانه ۶۵۰ گرم از برگ گیاه پودرشده ریخته و سپس در یکی ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال اتانول و در دیگری ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال n-هگزانی اضافه شد و به روش خیساندن فرآیند عصاره‌گیری انجام شد. پس از گذشت شش

روز، عصاره‌ها توسط دو صافی فلزی و کاغذی، صاف شدند و سپس حلال با روتاری پرانده شد و تا زمان انجام آزمایش در یخچال نگهداری شد.

روش تجزیه اسانس و عصاره اتانولی برگ گیاه توسط دستگاه GC-MS

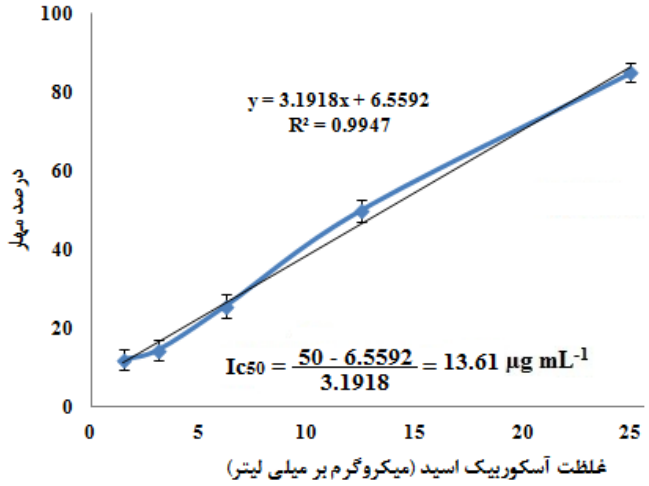
آنالیز اسانس و عصاره اتانولی برگ گیاه توسط دستگاه GC-MS از شرکت Agilent مدل Hewlett-Packard از کشور آمریکا با ستون موبینه HP-5 (طول ستون۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵ میکرومتر با ضخامت فاز ساکن ۰/۵ میکرومتر) در دانشکده شیمی دانشگاه آزاد قائم‌شهر انجام شد. برای این منظور پس از تزریق اسانس و عصاره اتانولی گیاه به دستگاه GC-MS، با استفاده از ضرایب بازداری هریک از اجزای تفکیک شده و طیف جرمی آنها، ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس و عصاره اتانولی گیاه شناسایی شدند. دمای ستون برنامه‌ریزی شد بدین صورت که برای ۲ دقیقه ابتدایی در دمای ۵۰°C و سپس با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه دما به ۱۵۰°C افزایش یافت، در ادامه دما با سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به ۲۱۰°C رسانده شد و برای ۱۰ دقیقه در این دما نگه داشته شد، همچنین دمای قسمت تزریق نمونه و آشکارساز به ترتیب در ۲۵۰°C و ۲۸۰°C تنظیم شد. از گاز هلیوم با خلوص (۹۹/۹۹۹٪) و سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و از انرژی یونیزآسیون ۷۰ الکترون‌ولت استفاده شد.

روش به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره‌های بادرنجبویه

در ابتدا ۱۲ محلول از عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی به طور جداگانه با غلظت‌های ۱۵/۷۵، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به حجم ۲ میلی‌لیتر تهیه شد و سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول DPPH (Sigma Aldrich) با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به هر یک از آنها اضافه شد. برای محلول کنترل نیز به ۲ میلی‌لیتر اتانول و n-هگزانی به طور جداگانه، ۲ میلی‌لیتر DPPH اضافه شد. برای اندازه‌گیری محلول استاندارد یا آنتی‌اکسیدان سنتزی (آسکوربیک اسید) و محلول کنترل در این آزمایش، از حلال اتانول و n-هگزانی به طور جداگانه به‌عنوان شاهد استفاده شد. برای هر عصاره نیز یک محلول شاهد تهیه شد، به این صورت که به ۲ میلی‌لیتر از هر غلظتی از عصاره، ۲ میلی‌لیتر اتانول و n-هگزانی به طور جداگانه اضافه و دستگاه اسپکتروفتومتری جذبی Jenway مدل 6550، توسط آن کالیبره شد. این محلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس جذب آن‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش-مرئی در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH از فرمول $100\times(AS/AC - 1)$ محاسبه شد. در این معادله AC جذب محلول حاوی رادیکال آزاد DPPH بدون عصاره به عنوان حلال کنترل، و AS جذب محلول حاوی رادیکال آزاد DPPH به همراه عصاره گیاه به عنوان نمونه می‌باشد و همچنین مقدار Ic_{50} از روی رگراسیون خطی منحنی کالیبراسیون و قرار دادن عدد ۵۰ بجای Y در معادله خط بدست آمد.

روش به دام‌اندازی رادیکال آزاد توسط آسکوربیک اسید

محلول استاندارد این تحقیق برای غیرفعال‌سازی رادیکال آزاد DPPH، آنتی‌اکسیدان سنتزی آسکوربیک اسید است که با غلظت‌های ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵ و ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و به ۲ میلی‌لیتر از هرکدام از آن‌ها، ۲ میلی‌لیتر رادیکال آزاد DPPH اضافه گردید. این محلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس جذب آن‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش-مرئی در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در این روش نیز از فرمول (1 – AS/AC)×100 برای محاسبه درصد مهار رادیکال آزاد DPPH توسط آنتی‌اکسیدان سنتزی آسکوربیک اسید استفاده شد که شکل ۱ این تغییرات را نمایش می‌دهد.



شکل ۱: تغییرات درصد مهار رادیکال DPPH بر حسب غلظت‌های متفاوت آسکوربیک اسید

روش سنجش توانایی احیاکنندگی عصاره گیاه (روش FRAP)

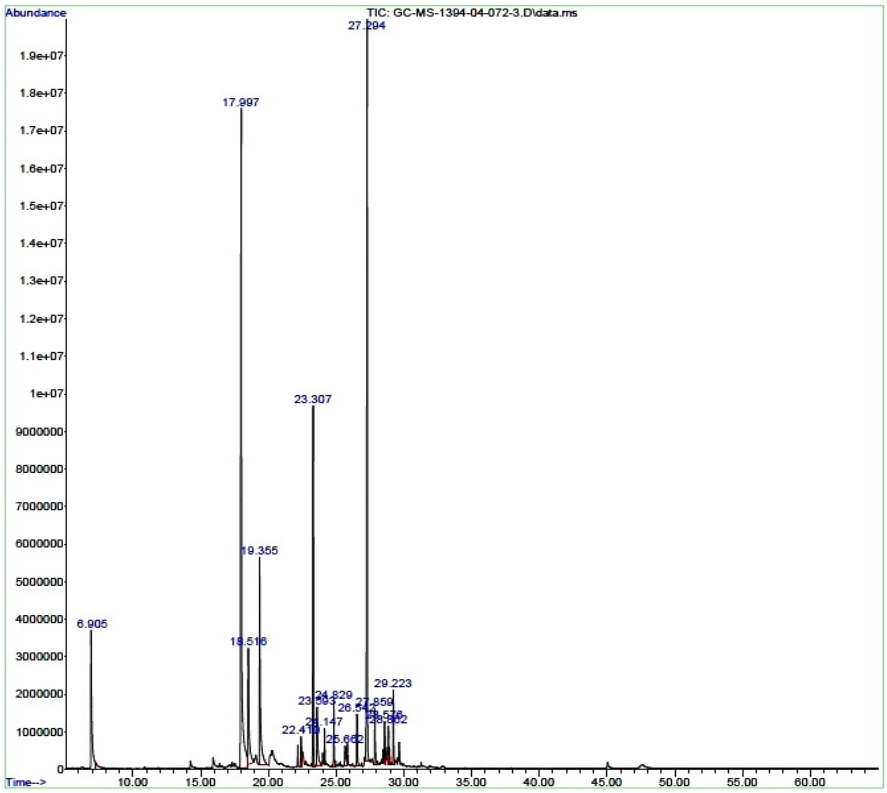
در روش FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) از رادیکال‌های آزاد برای تعیین پتانسیل آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده نمی شود، بلکه فقط توانایی احیا شدن آهن فریک (Fe^{3+}) به آهن فرو (Fe^{2+}) توسط آنتی‌اکسیدان در نمونه، اندازه‌گیری می شود، لذا پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره یک گیاه بر علیه رادیکال‌های آزاد، ضرورتاً با توانایی آن ماده در احیاء آهن فریک به آهن فرو با هم برابر نمی‌باشند، بعبارتی در این روش میزان توان‌مندی عصاره گیاه در احیاکردن کاتیون‌های آهن سنجیده می شود و شدت رنگ آبی تولید شده، نشان‌دهنده قدرت احیاکنندگی عصاره اتانولی و n-هگزانی گیاه است و هرچه میزان جذب بیشتر باشد قدرت احیاکنندگی را نشان می‌دهد. در این روش برای تعیین محلول FRAP، به ۲/۵ میلی‌لیتر محلول تری پریدل تری آزین (Sigma Aldrich)، ۲/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن (III) و ۲۵ میلی‌لیتر بافر استات با pH معادل ۳/۶ اضافه شد. سپس به ۱ میلی‌لیتر از هر یک از محلول عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی که با غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ساخته شد، به طور جداگانه ۲ میلی‌لیتر محلول FRAP اضافه شد. برای تهیه‌ی محلول کنترل، ۱

میلی‌لیتر اتانول به ۲ میلی‌لیتر محلول FRAP اضـافه شـد. برای اندازه‌گیری محلول کنترل در اسـپکتروفتومتر از محلول شـاهد شامل اتانول و محلول FRAP بدون کلرید آهن (III) استفاده شد. برای هر عصاره نیز یک محلول شاهد تهیه شد، به این صورت که به ۱ میلی‌لیتر عصاره، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول TPTZ (تری‌پریدیل‌تری‌آذین) و ۵ میلی‌لیتر بافر استات با pH معادل ۳/۶ اضافه و دستگاه اسپکتروفتومتر توسط آن کالیبره شد. این محلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس جذب یون Fe^{2+} در طول موج بیشینه ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. همچنین تمامی اندازه‌گیری‌ها برای هر نمونه سه بار تکرار شد و مقادیر به صورت خطای استاندارد (Sd) در نمودارها گزارش گردید.

نتایج

نتایج حاصل ازآنالیز اسانس برگ گیاه

آنالیز ا سانس ا ستخراج شده از برگ گیاه بادرنجبویه، تو سط د ستگاه GC-MS انجام شد که کروماتوگرام آن در شکل ۲ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود ۱۶ ترکیب در کروماتوگرام شناسایی شدند.



شکل ۲: کروماتوگرام حاصل ازآنالیز اسانس برگ گیاه بادرنجبویه

در این آنالیز مشخص شد ترکیب فنوکسی اتانول با ۳۱/۶۶٪، بیشترین درصد ترکیبات شناسایی شده موجود در اسانس را دارا می‌باشـد، پس از آن مجموع انانتیومر کاریوفیلن اکسـاید با ۲۴/۷۱٪، مجموع انانتیومر سـیترال با ۱۳/۸۹٪ و مجموع انانتیومر کاریوفیلن با ۹/۸۸٪ بیشترین ترکیبات شناسایی شده موجود را شامل می‌شوند (جدول ۱).

جدول ۱: ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس برگ گیاه بادرنجبویه

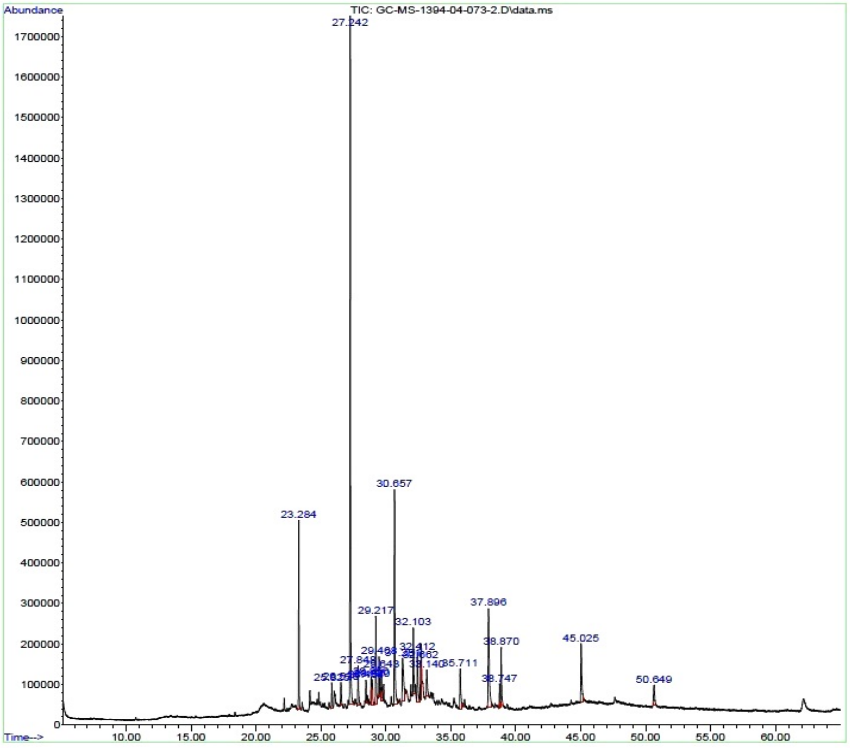
شماره پیک	نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد ترکیب
۱	Styrene	۸۵۹	٦/٦٨
۲	Phenoxy ethanol	۱۲۳۱	۳۱/٦٦
۳	Cis-citral (neral)	۱۲۵۱	۵/۲۹
٤	Trans-Citral (Geranial)	۱۲۸۰	۸/٦۰
۵	Trans-Geraniol (lemonol)	۱۳۹۲	۱/۲۹
٦	β-caryophyllene	۱٤۲۸	۸/۹۱
۷	Cyclopropanecarboxilic Acid	۱٤٤۰	۲/۹۰
۸	α –caryophyllene	۱٤٦۲	۰/۹۷
۹	(-)- Germacrene-D	۱٤۹۰	۱/٦٤
۱۰	2- Propionyl oxy tetra decane	۱۵۱۰	۱/٦۰
۱۱	Caryophyllene oxide	۱۵٦۲	۱/٦٤
۱۲	Trans- Caryophyllene oxide	۱۵۹٤	۲۳/۰۷
۱۳	Humulene epoxide II	۱٦۱۹	۱/۷۵
۱٤	2-norpinanol 3,6,6-trimethyl	۱٦۵۱	۱/۳۹
۱۵	α - Cadinol	۱٦٦۳	۱/۱۲
۱٦	z-hexadecen-7-yne	۱٦۷۸	۱/۹۸

تعیین درصد بازده عصاره‌ها

پس از انجام عمل عصاره‌گیری به روش خیساندن، وزن عصاره‌ها تعیین شد که ۲۰ و ۱۴ گرم به ترتیب عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی به طور جداگانه از ۶۵۰ گرم از برگ گیاه پودرشده تهیه شد. راندمان استخراج عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی برگ گیاه بادرنجبویه توسط فرمول ۱۰۰×(گرم برگ گیاه/گرم عصاره) محاسبه شد و درصد بازده عصاره‌ها به ترتیب ۳/۰۸٪ و ۲/۱۵٪ به صورت وزنی-وزنی پودر خشک گیاه محاسبه گردید.

نتایج حاصل از آنالیز عصاره اتانولی برگ گیاه

آنالیز عصاره اتانولی از برگ گیاه بادرنجبویه، توسط دستگاه GC-MS انجام شد که کروماتوگرام آن در شکل ۳ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود ۲۳ ترکیب در کروماتوگرام عصاره اتانولی شناسایی شدند.



شکل ۳: کروماتوگرام حاصل ازآنالیز عصاره اتانولی برگ گیاه بادرنجبویه

بیشترین درصد ترکیب شناسایی شده از عصاره اتانولی برگ گیاه بادرنجبویه، مربوط به ترکیب کاریوفیلن اکساید با ۲۸/۹۵٪ است، که به مقدار ۴/۲۴٪ از مجموع انانتیومرهای کاریوفیلن اکساید شناسایی شده از اسانس، بیشتر است. پس از آن ۲-هیدرازینو نیکوتینیک ا سید با ۱۱/۳۷٪، فیتول با ۸/۶۱٪ و بتا-کاریوفیلن با ۷/۴۴٪ مهمترین ترکیب شنا سایی شده موجود در عصاره اتانولی برگ را تشکیل می‌دهد (جدول ۲).

بررسی فعالیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد توسط آسکوربیک اسید

نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH با افزایش غلظت آ سکوربیک ا سید، زیاد می شود و با توجه به اینکه معادله خط منحنی به صورت رابطه Y=3.1918X + 6.5592 بد ست آمد، بنابراین با قراردادن عدد ۵۰ به جای Y در معادله خط، مقدار X برابر ۱۳/۶۱ بد ست آمد، که همان Ic_{50} آ سکوربیک ا سید می‌با شد و به عنوان غلظتی از آ سکوربیک اسید است که می‌تواند ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH را مهار کند، بعبارتی هر چه مقدار Ic_{50} کمتر باشد فعالیت آنتی‌اکسیدانی یا توانایی مهار رادیکال آزاد عصاره بیشتر است.

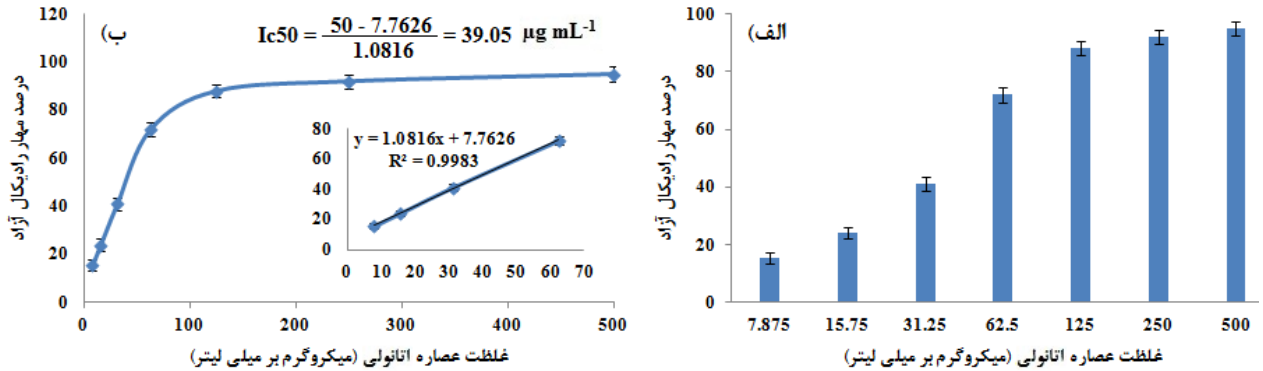
جدول ۲: ترکیب‌های تشکیل‌دهنده عصاره اتانولی برگ گیاه بادرنجبویه

شماره پیک	نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد ترکیب
۱	β – caryophyllene	۱٤۲۷	۷/٤٤
۲	δ - cadinene	۱۵۳۱	۱/۲۱
۳	β - Histine	۱۵٦۱	۱/۱٦
٤	(-) Epoxy caryophyllene	۱۵۹۲	۲۸/۹۵
۵	α- Favnesena	۱٦۱۹	۲/۲۰
٦	2.4 –Dimethyl -Methanol	۱٦٤٦	۰/۹۹
۷	2 - Bromoethanol	۱٦٦٤	۱/۲٤
۸	α -Calacorene	۱٦۷۳	۱/٤۳
۹	chembl	۱٦۸۰	٤/٦۸
۱۰	2–Methylnaphthalene	۱٦۹۲	۱/۷۲
۱۱	N,N – Dimethylmethane Sulfonamide	۱٦۹۹	۱/٦۹
۱۲	2-Hydrazino–nicotinic acid	۱۷٤۷	۱۱/۳۷
۱۳	Loliolide	۱۷۷۷	٤/۳۷
۱٤	Longi Folenaldehyde	۱۸۱۷	۳/٤۷
۱۵	4-Bromo-1-naphthylamine	۱۸۳۲	۳/۲۵
۱٦	Neophyta diene	۱۸٤٤	۱/۳۲
۱۷	2-[dimethylamino-methyl] -4- ethyl phenol	۱۸٦۸	۱/۷٦
۱۸	Palmitic acid – ethyl ester	۲۰۰۰	۲/۸۰
۱۹	Phytol	۲۱۲۰	۸/٦۱
۲۰	P - Hydroxynorephedrine	۲۱٦۸	۱/۱۷
۲۱	Linolenoic acid	۲۱۷۵	۳/۲۳
۲۲	2-(2-ethylhexoxy carbonyl)benzoic acid	۲۵۵۳	٤/۱۵
۲۳	3-Ethoxyamphetamine	۲۸۳۰	۱/۷۰

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بادرنجبویه به روش DPPH

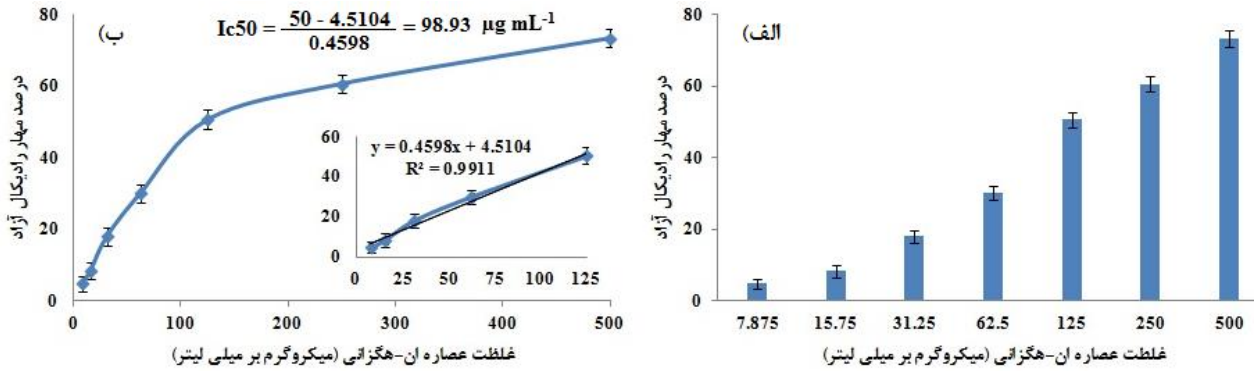
در این روش، از رنگ رادیکال آزاد (DPPH) به عنوان ن شانگر ا ستفاده شد، به این صورت که هر چه ع صاره توانایی بی‌شتری در به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH دا شته با شد از شدت رنگ بنفش مخلوط، بی‌شتر می‌کاهد و در نهایت به سمت رنگ زرد متمایل می‌شود. مزیت مصرف DPPH، این است که در زمان کوتاهی می‌توان تعداد زیادی نمونه را اندازه‌گیری نمود و همچنین از حساسیت کافی برخوردار است. نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش غلظت، تاثیر معنی‌داری بر مهار رادیکال آزاد

DPPH دارد (شکل ۴ الف)، بطوریکه با افزایش غلظت عصاره، میزان مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد. شکل ۴ ب، منحنی کالیبراسیون درصد مهار رادیکال DPPH بر حسب غلظت عصاره اتانولی می‌باشد و شیب تند قسمت ابتدایی منحنی کالیبرا سیون به این معنی ا ست که با افزایش اولیه غلظت ع صاره، مهار رادیکال آزاد DPPH تو سط ع صاره‌های اتانولی با قدرت بیشتری صورت می‌گیرد. همچنین با توجه به اینکه میزان Ic_{50} معیاری برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌با شد، بنابراین محا سبه Ic_{50} برای ع صاره اتانولی به کمک معادله منحنی کالیبرا سیون (Y=1.0816X+7.7626) انجام گرفت که معادل ۳۹/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد، و این در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی آسکوربیک اسید (۱۳/۶۱) قابل توجه است، با این توضیح که هرچه مقدار Ic_{50} عصاره کمتر باشد، توانایی قدرت مهار بیشتری دارد.



شکل ۴: الف) تغییرات درصد مهار رادیکال آزاد توسط عصاره اتانولی برگ گیاه بادرنجبویه، ب) منحنی کالیبراسیون درصد مهار رادیکال آزاد توسط عصاره اتانولی

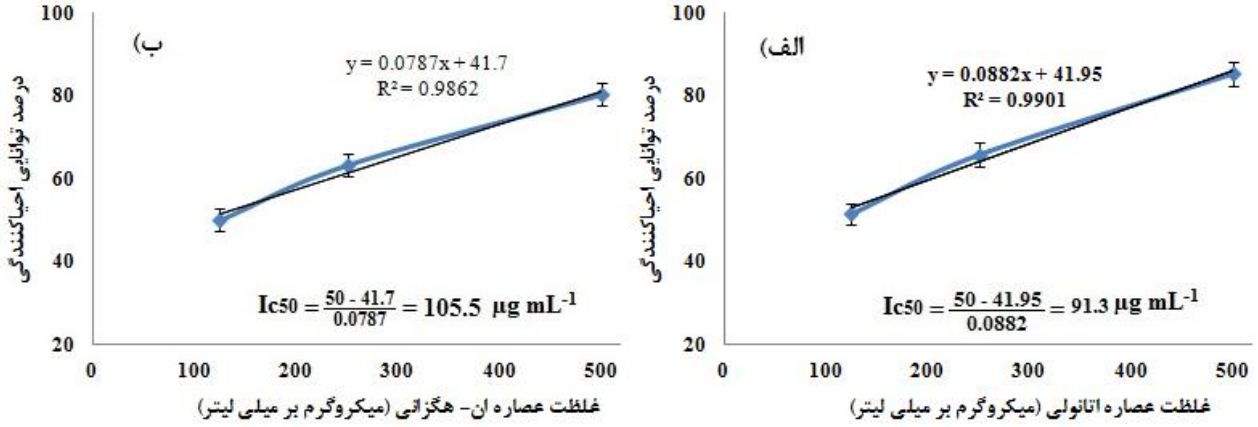
شکل ۵ الف، نیز نشانگر تغییرات درصد مهار رادیکال آزاد DPPH بر حسب غلظت عصاره n-هگزانی و شکل ۵ ب، منحنی کالیبراسیون درصد مهار رادیکال DPPH بر حسب غلظت عصاره n-هگزانی می‌باشد. فعالیت به دام‌اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره‌های n-هگزانی نیز با افزایش غلظت افزایش یافت. همچنین میزان Ic_{50} برای عصاره n-هگزانی توسط معادله منحنی کالیبراسیون (Y=0.4598X+4.5104) معادل ۹۸/۹۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که عصاره اتانولی نسبت به عصاره n-هگزانی در غلظت یکسان میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارند.



شکل ۵: الف) تغییرات درصد مهار رادیکال آزاد توسط عصاره n-هگزانی برگ گیاه بادرنجبویه، ب) منحنی کالیبراسیون درصد مهار رادیکال توسط عصاره n-هگزانی

تعیین قدرت احیاکنندگی بادرنجبویه به روش FRAP

شکل ۶ درصد توان احیاکنندگی عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی برگ گیاه بادرنجبویه برحسب غلظت‌های میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره را نمایش می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که افزایش غلظت عصاره، تاثیر معنی‌داری بر قدرت احیاکنندگی دارد و به کمک معادله خط، میزان Ic_{50} برای هر دو عصاره محاسبه شد. توان احیاکنندگی عصاره اتانولی و n-هگزانی به ترتیب ۹۱/۳ و ۱۰۵/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شدند، بعبارت دیگر عصاره اتانولی و عصاره n-هگزانی با غلظت‌های فوق، توانایی احیاء ۵۰٪ از کاتیون‌های آهن را دارد، بنابراین عصاره اتانولی قدرت احیاکنندگی بالاتری نسبت به عصاره n-هگزانی دارد و همچنین مقادیر Ic_{50} از روی رگراسیون خطی بین درصد توانایی احیاکنندگی و غلظت‌های مربوطه بدست آمد.



شکل ۶: تغییرات درصد توانایی احیاکنندگی عصاره‌های الف) اتانولی، ب) n-هگزانی برگ گیاه بادرنجبویه

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها، همواره نگرانی عوارض جانبی دارو را به همراه دارد. گیاهان دارویی با داشتن مزیت‌های متعددی از قبیل ارزان و قابل دسترس بودن، سازگاری با طبع و پذیرش بهتر توسط بیماران، برای درمان بیماری ها از جمله عفونت ها موردتوجه قرار گرفته اند (Pino *et al.*, 2006). استفاده صحیح از گیاهان دارویی مستلزم شناخت ترکیبات شیمیایی موجود در آنهاست زیرا وجود ترکیبات شیمیایی است که باعث اثر درمانی در گیاه می‌گردد. نتایج این تحقیق نشان داد که اجزای اصلی اسانس برگ بادرنجبویه به ترتیب کاریوفیلن اکساید، فنوکسی اتانول، سیترال و کاریوفیلن است. این ترکیبات با توجه به تأثیری که دارند مورد استفاده قرار می‌گیرند به عنوان مثال: کاریوفیلن اکساید مانع تجمع غیرطبیعی مایع در غشای بین یاخته‌ای بافت‌های بدن شده و ضد تومور است (Dakhili *et al.*, 2006). فنوکسی اتانول از پرکاربردترین مواد نگه‌دارنده است و می‌تواند با کمترین عوارض و مشکلات، جایگزین مناسبی برای نگه‌دارنده‌ها باشد. سیترال به عنوان طعم‌دهنده داروها و همچنین در تهیه عطر و ادکلن، مواد آرایشی، ساخت آب‌نبات، محصولات نانوایی و بستنی استفاده می‌شود (Bakkali, 2008).

کاریوفیلن می‌تواند از بروز اثرات مضر قلبی و عروقی و عصبی، دیابت، آلزایمر و بیماری اماس جلوگیری کند و دارای اثرات ضدسرطانی است (Morales & Santos, 1997). کلیمک و همکاران، با تجزیه اسانس بادرنجبویه مشاهده کردند که بیشترین ترکیب اسانس را سیترونلال، ژرانیول، ژرانیل استات، لینالول، لینالیل استات و لیمونین تشکیل می‌دهد، درحالی که در مطالعه حاضر بیشترین ترکیبات اسانس شامل: کاریوفیلن اکساید، فنوکسی اتانول، سیترال و کاریوفیلن بود و یافته‌های فوق با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی نداشت (Klimek *et al.*, 1998)، این امر احتمالاً به دلیل تفاوت شرایط اقلیمی (سرد و مرطوب)، ادافیکی و جغرافیای منطقه (ارتفاعات کوهستانی مازندران) می‌باشد. شاروپو و همکاران به بررسی ترکیبات اسانس برگ گیاه بادرنجبویه پرداختند و در این بررسی، ۱۵ ترکیب اصلی(شامل :استایرن، ژرانیال، سیترال، نرال، کاریوفیلن اکسید، لمونول، نرال، بتا کاریوفیلن) معرفی شد (Sharopov *et al.*, 2013) که با بعضی از یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت داشت. در هر دو تحقیق، فصل برداشت گیاه در تابستان (در ارتفاع بالای ۱۰۰۰ متر) و اسانس‌گیری به روش تقطیر با بخار آب توسط دستگاه کلونجر انجام شد. جلال و همکاران ترکیبات اصلی اسانس بادرنجبویه را به ترتیب کاریوفیلن‌اکساید و کاریوفیلن اعلام کردند که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (Jalal *et al.*, 2015) این نکته قابل ذکر است که در این دو مطالعه روش استخراج (تقطیر با بخار آب توسط دستگاه کلونجر)، نحوه خشک کردن برگ گیاه و ذخیره آن پس از برداشت یکسان بودند. بوزوویک و همکاران با تجزیه اسانس بادرنجبویه ترکیبات کاریوفیلن و کاریوفیلن‌اکساید را بعنوان اجزاء اصلی گزارش دادند که با نتایج مطالعه حاضر نیز هم‌خوانی دارد (Bozovic *et al.*, 2018) در هر دو تحقیق، اسانس‌گیری به روش تقطیر کلاسیک و زمان نمونه‌برداری در اواخر تابستان انجام شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب اسانس‌های به دست آمده از یک گونه خاص گیاهی براساس جغرافیای منطقه، شرایط

اقلیمی و ادافیکی، روش استخراج، نحوه خشک‌کردن، فصل برداشت، سن گیاه و مرحله رشد متفاوت است. همچنین اجزای اصلی عصاره اتانولی برگ بادرنجبویه به ترتیب کاریوفیلن اکساید، ۲-هیدرازینو نیکوتینیک اسید، فیتول و بتا-کاریوفیلن می‌باشد. همانطور که پیش‌تر اشاره شد فیتول از معروف‌ترین‌دی‌ترپنوییدخطی است، که مستقیماً از ژرانیل ژرانیل پیروفسفات حاصل می‌شود و به کلروفیل متصل است. نکته قابل توجه در آنالیز عصاره اتانولی این است که تنها دو ترکیب شناسایی شده، کاریوفیلن اکساید و بتا-کاریوفیلن به ترتیب با ۲۸/۹۵٪ و ۷/۴۴٪ با ترکیبات شناسایی شده از اسانس مشترک بودند، بتا-کاریوفیلن موجود در عصاره به مقدار ۱/۴۷٪ کمتر است. همچنین نتایج نشان می‌دهد که درصد بازده استخراج عصاره اتانولی بیشتر از عصاره n-هگزانی است. با مقایسه نتایج بدست آمده، عصاره‌های بادرنجبویه منطقه هزارجریب بهشهر، خصوصاً عصاره اتانولی دارای اثر آنتی‌اکسیدانی قابل قبولی نسبت به خاصیت آنتی‌اکسیدانی سنتزی آسکوربیک اسید هستند و می‌توانند پس از آزمایش‌های تکمیلی در صنعت دارویی به‌کار روند. آسکوربیک اسید یک ترکیب آلی طبیعی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که به خوبی در آب حل می‌شود و از نیازهای غذایی انسان است و کمبود آن موجب بیماری آسکوربوت می‌شود (Nonomura & Benson, 1992)، نام دیگر آن ویتامین C است. همچنین با روش FRAP مشخص شد که عصاره‌ی اتانولی و n-هگزانی برگ گیاه بادرنجبویه توانایی احیاکنندگی خوبی دارند، به‌عبارت دیگر گیاهانی که قدرت احیاء آهن بالایی دارند قادرند به‌راحتی رادیکال‌های آزاد موجود در بدن را خنثی کنند. نتایج این مطالعه به طورکلی نشان داد که عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی برگ گیاه بادرنجبویه در هر دو روش DPPH و FRAP، دارای خصوصیات آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند. با توجه به مهار رادیکال‌های آزاد که سبب تخریب سلول‌های بدن می‌شوند، این عصاره‌ها می‌توانند به عنوان یک فرآورده گیاهی طبیعی در صنایع دارویی به‌کار روند و همچنین جایگزین مناسبی برای آنتی‌اکسیدان سنتزی قرارگیرند، از طرف دیگر به دلیل طعم لیمویی بادرنجبویه امکان استفاده از غلظت-های بالاتر این عصاره در صنایع غذایی وجود دارد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان مقاله، از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم‌شهر که زحمت فراوانی برای فراهم نمودن امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی مورد نیاز این پروژه تحقیقاتی کشیده‌اند، مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

منابع

مقتدر، م. (۱۳۹۲) شناسایی ترکیب‌های شیمیایی و بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس گیاه بادرنجبویه، اولین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار.

هریزچی، ل.، فرخی، ف. (۱۳۹۳) تاثیر لاموتریژین و عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه بر میزان آنزیم‌های کبدی و تغییرات پاتولوژی آن در موش‌های صرعی تجربی با پنتیلن تترازول. مجله دانشگاه علوم پزشکی قم، دوره هشتم، شماره ۵، صفحه ۵۶-۴۸.

Amoee, A.M. (2009). Cultivation of Medicinal and Aromatic Plants. Publications of the Institute of Applied Higher Education of Agriculture Jahad.

Andreas, A.R. Lazaro, J.J. Chueca, A. Hermoso, R. and Lopez Gorge, J. (1990). Effect of alcohols on the association of photosynthetic FBPase to thylakoid membrances. Physiologia Plantarum, 78: 409-413.

Ashrafi, B. Ramak, P. Taleie, Gh. and Rashidipor, M. (2015). Investigation of antioxidant properties of Dracocephalum kotschyi Bios. 2th national conference on Biology and Horticultural of Iran: Tehran.

Bakkali, F. (2008). Biological effects of essential oils-a review. Food and Chemical Toxicology, 46(2): 446-475.

Bozovic, M. Garzoli, S. Baldisserotto, A. Romagnoli, C. Pepi, F. and Cesa, S. (2018). Melissa officinalis L. subsp. altissima (Sibth. & Sm.) Arcang. essential oil: Chemical composition and preliminary antimicrobial investigation of samples obtained at different harvesting periods and by fractionated extractions. Industrial Crops and Products, 117: 317-321.

Capecka, E. and Mareczek, A. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some lamiaceae species. Food Chemistry, 93(2): 223-6.

Dakhili, M. Zahrai Salehi, T. Torabi Goodarzi, M. and Khavari, A. (2006). Evaluation of antimicrobial effects of 4 medicinal plants against salmonella typhymurium and comparison them with common antibiotics in veterinary medicine. J Med Plants, 5(20): 21-24.

Haji-sharifi, A. (2016). Secrets of Medicinal Plants. Publication of Hafez Novin, Tehran.

Hariry, R.E. (2011). Anticonvulsant effects of hydroalcoholic extract of Melissa officinalis on pentylenetetrazole (PTZ) model of convulsion in mice. Journal of Medicinal Plants Research, 5(16): 3803-3809.

Heins, R. (1980). Inhibition of ethylene synthesis is and senescence incarnation by ethanol. Journal of American Society Horticulture. Science, 105: 141-144.

Jalal, Z. Atki, YE. Lyoussi, B. and Abdellaoui, A. (2015). Phytochemistry of the essential oil of Melissa officinalis L. growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 5: 458-461.

Klimek, B. Majda, T. and Patora, J. (1998). Investigation of essential oil and phenolic compounds of lemon balm (Melissa officinalis L.) Cultivated in poland. VIIth conference on the application of chromatographic methods in phytochemical and biomedical research lublin, poland. Herbpolonica, 44(4): 324-31.

Klink, B. (1997). Alternative medicine: is natural really better. Drug Top, 141: 99-100.

Kulisic, T. Radonic, A. and Katalinic, V. (2004). Use of different methods for testing antioxidative of oregano essential oil. Journal of Food Chemistry, 85: 633-640.

Lamaison, J.L. Petitjean-Freytet, C. Duband, F. and Carnat, A.P. (1991). Rosemarinic acid content and antioxidant activity of French lamiaceae. Fitoterapia, 62: 166-171.

Martinez-Tome, M. Jimenez, A. Ruggieri, S. Frega, N. Strabbioli, R. and Murcia, M. (2001). Antioxidant properties of mediterranean spices compared with common food additives. Journal of Food Protection, 64: 1412-1419.

Ministry of Health. (2002). Iranian Herbal Pharmacopoeia.Tehran. Ministry of Health Pub: 121-41.

Morales, J.P. and Santos, B.M. (1997). Effects of different ethanol concentration on the initial growth of lettuce (Lactuca sativa). Proceeding of the Caribbean Food Crop Society, 33: 442-447.

Nonomura, A. and Benson, A. (1992). The path of carbon photosynthesis improved crop yields with methanol. Proceeding National Academic Science USA, 15: 9794-9798.

Patora, J. Klimek, B. (2002). Flavonoids from lemon balm (Melissa officinalis L., Lamiaceae). Acta Poloniae Pharmaceutica, 59(2): 139-43.

Pino, JA. Rosado, A. and Fuentes, V. (1999). Composition of the essential oil Melissa officinalis L. From Cuba. J Essent Oil Res, 11(3): 363-4.

Ren, W. Qiao, Zh. Wong, H. Zhu, L. and Zhang, L. (2003). Flavonoids: Promising Anticancer Agents. Medicinal Research Reviews, 23(4): 519-53.

Rojhan, M. (1998). Treated by Medicinal Plants. Aya cultural center publishing, Tehran.

Sharopov, FS. Wink, M. Khalifaev, DR. Zhang, H. Dosoky, NS. and Setzer, WN. (2013). Composition and bioactivity of the essential oil of Melissa officinalis L. Growing wild in Tajikistan. Int J Trad Nat Med, 2(2): 86-96.

Zargari, A. (1995). Medicinal Plants. 5th ed. Tehran: Tehran University, Pp. 77-81.

Analyzing of chemical composition of the essential oil and study of antioxidant activity of extract of *Melissa officinalis* from Behshahr-Iran

S.A. rezaei Jamnani[1], A. Mirabi[2*]

Received: 2019.9.23

Accepted:2020.9.6

Abstract

This research has been conducted to analyze essential oil and ethanol extract and investigate the antioxidant activity of the ethanol and n-hexane extracts of the *Melissa officinalis* leaves collected from Hezar Jarib area of Behshahr. *Melissa officinalis* leaf can be considered as a substitute of the synthetic antioxidants. The leaves of the plant were collected from its natural habitats in the heights of Mazandaran province in early September. In this study, chemical composition of the essential oil and ethanol extract of the *Melissa officinalis* leaf were analyzed by GC/MS. The antioxidant activity of the ethanol and N-hexane extracts is investigated using method of DPPH and compared to the synthetic antioxidant of ascorbic acid. The results showed that the main components of essential oil are: Phenoxyethanol (31.66%), total of Carryophyllene Oxide enantiomer (24.71%), totoal of Citral enantiomer (13.89%) and totoal of Caryophyllene enantiomer (9.88%) also the main components of ethanol extract are: Carryophyllene Oxide (28.95%), totoal of 2-Hydrazino–Nicotinic acid (11.37%), Phytol (8.61%) and β-Caryophyllene (7.44%) respectively. Also the Ic_{50} of the ethanol and n-hexane extracts are determined 39.05 and 98.93 µg/ml respectively, and in the FRAP method the ability of reducing of the ethanol and n-hexane extracts were 91.3 and 105.5 µg/ml respectively. By comparing the results, extracts have antioxidant effect and ability of reducing so can be used in medicine industries.

Keywords: Antioxidant, Essential oil , *Melissa officinalis*

1- Graduated from the Islamic Azad University, Ghaemshahr Branch, Department of Chemistry, Ghaemshahr, Iran.
2- Associate Professor of Analytical Chemistry, Islamic Azad University, Ghaemshahr Branch, Department of Chemistry, Ghaemshahr, Iran
*(Corresponding author : a.mirabi@qaemiau.ac.ir)