Eco–phytochemical
Journal of Medicinal Plants
Print ISSN: 2322-3235
Online ISSN: 2783-4697
Islamic Azad University Gorgan Branch
Iranian Society of Medical Plants

Investigate the effect of different extraction methods on the amount of antioxidant, phenolic and flavonoid compounds of *Ziziphora tenuior* L. extract and essential oil

Malihe Amini[1], Sharareh Mohseni[2*]
[1]Dept of Applied Chemistry, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
[2]Dept of Applied Chemistry, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran, Email: sh_mohseni2003@yahoo.com

Article type:
Research article

Article history
Received: 2-09-2023
Revised: 25-02-2024
Accepted: 18-04-2024

Keywords
Antioxidant
Essential oil
Flavonoid compounds
Plant extracts

Abstract

Plants are a rich source of antioxidant compounds that can help prevent oxidative stress. The present study aimed to evaluate the antioxidant properties of different extracts obtained from *Ziziphora tenuior* L. Leaves and stems of the plant were collected from the mountains around Quchan in the spring of 2022 and subsequently dried. Extraction of the dried plant powder was performed using maceration (cold), hot, and microwave methods, employing solvents such as water, methanol, ethanol, a water-ethanol mixture (1:1), acetone, and dichloromethane. We measured the total content of phenolic and flavonoid compounds, as well as the antioxidant activity of the extracts using the DPPH method. Additionally, the chemical compounds in the essential oil derived from the leaves and stems were identified using the Cloninger method with a GC/MS device. The results revealed that the methanolic extract, obtained through the warm extraction method, contained the highest amount of phenolic compounds (74.26 mg/g) and the highest amount of flavonoid compounds (108.12 mg/g) through maceration. Furthermore, the warm methanolic extract exhibited strong inhibitory activity (69.52%). In terms of the essential oil's composition, the highest percentages of known chemical compounds were found to be polygon (49.05%), piperitone (11.61%), and menthone (9.23%). Overall, our findings indicate that employing various extraction methods can effectively enhance the extraction of antioxidant compounds from this plant. Given its high antioxidant properties, *Z. tenuior* L. shows potential for use as a natural antioxidant in the food and pharmaceutical industries.

Cite this article as: Amini, M., Mohseni, Sh. (2023). Investigate the effect of different extraction methods on the amount of antioxidant, phenolic and flavonoid compounds of *Ziziphora tenuior* L. extract and essential oil. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants.*, 12(3):1-16.

©The author(s)
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch

اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی
شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۳۲۳۵
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۹۷
دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان
انجمن گیاهان دارویی ایران ثبت ۱۸۹۶۳

بررسی اثر روش های مختلف استخراج بر میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی، فنلی و فلاونوئیدی عصاره و اسانس گیاه دارویی *Ziziphora tenuior* L.

ملیحه امینی[۱]، شراره محسنی[۲]*

[۱] گروه شیمی کاربردی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان، قوچان، ایران
[۲] گروه شیمی کاربردی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان، قوچان، ایران، رایانامه: sh_mohseni2003@yahoo.com

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت:۱۴۰۲/۶/۱۱
تاریخ بازنگری:۱۴۰۲/۱۲/۶
تاریخ پذیرش:۱۴۰۳/۱/۳۰

چکیده

گیاهان منبع غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی به شمار می آیند که می توانند مانع از استرس اکسیداتیو شوند. پژوهش حاضر به منظور ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف حاصل از *Ziziphora tenuior L* انجام شده است. برگ و ساقه گیاه در فصل بهار سال ۱۴۰۱ از کوه های اطراف قوچان جمع آوری و خشک شد. عصاره گیری از پودر گیاه خشک شده به کمک روش های ماسراسیون (سرد) ، گرم و مایکروویو و حلال های آب، متانول، اتانول، آب و اتانول (۱:۱) ، استون و دی کلرومتان انجام شد. محتوای تام ترکیبات فنلی، فلاونوییدی و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با روش DPPH مورد سنجش قرار گرفت. هم چنین ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس حاصل از برگ و ساقه گیاه به روش کلونجر به کمک دستگاه GC/MS شناسایی شد. حداکثر مقدار ترکیبات فنلی در عصاره متانولی با استفاده از روش استخراج گرم (۷۴/۲۶ mg/g) به دست آمد. عصاره متانولی به روش ماسراسیون بالاترین میزان ترکیبات فلاونووئیدی (۱۰۸/۱۲ mg/g)) را نشان داد. عصاره متانولی (روش گرم) حاکی از فعالیت مهارکنندگی قوی (۶۹/۵۲ درصد) می باشد. بالاترین درصد ترکیبات شیمیایی شناخته شده در اسانس گیاه، پولگون (۴۹ /۰۵ درصد) و پیپریتنون (۱۱/۶۱ درصد)، منتون (۹/۲۳ درصد) بودند. به طور کلی نتایج نشان داد که استفاده از روش های مختلف عصاره گیری می تواند بر میزان استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود در گیاه موثر باشد. به دلیل خواص آنتی اکسیدانی بالا در گیاه کاکوتی می توان از آن به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی در صنایع غذایی و دارویی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی:
آنتی اکسیدان
اسانس
ترکیبات فلاونوئیدی
عصاره‌های گیاهی

استناد: امینی، ملیحه؛ محسنی، شراره. (۱۴۰۳). بررسی اثر روش های مختلف استخراج بر میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی، فنلی و فلاونوئیدی عصاره و اسانس گیاه دارویی *Ziziphora tenuior* L. *فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی*، ۱۲ (۳)، ۱۶-۱.

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

یکی از علل بسیاری از بیماری‌های مزمن، استرس های اکسیداتیو ناشی از فعالیت رادیکال‌های آزاد می باشد. صدمات اکسیداتیو به مولکول‌های زیستی بدن مانند اسیدهای چرب، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک سبب جهش در ژن‌ها خواهد شد . (Bronisław and Mateusz,2023) مهم ترین عامل دفاعی علیه رادیکال‌های آزاد، ترکیبات آنتی اکسیدانی هستند. گیاهان حاوی ترکیبات فعال از جمله آلکالوئیدها، استروئیدها، تانن‌ها، گلیکوزیدها، روغن‌های فرار، فنول ها و فلاونوئیدها می‌باشند که در بخش های مختلف مانند برگ، گل، پوست، بذر، میوه و ریشه تجمع می یابند. اثرات دارویی‌گیاهان معمولاً ناشی از ترکیب این فرآورده‌های زیست فعال می‌باشد. (salmanian et al.,2014) بسیاری از گونه های گیاهی دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی مشابهی با آنتی اکسیدان های سنتزی هستند و به دلیل نداشتن اثرات جانبی به عنوان یک جایگزین مناسب مورد استفاده قرار می گیرند. گیاه کاکوتی با نام علمی . *Ziziphora tenuior L* گیاهی یکساله از خانواده نعناعیان است که دارای ساقه‌های کوتاه حدود پنج تا پانزده سانتی متری بوده و دارای خواص آنتی باکتریالی و ضد قارچی می باشد. (Azadmehr et al.,2014) این گیاه به عنوان مسکن و آرام بخش استفاده شده و در درمان بیماری های قلبی و ترمیم زخم ها نیز موثر است. Nasiri (Tarzejani et al.,2020) تنوع گونه های کاکوتی و درصد متفاوت ترکیبات شیمیایی در آن منجر به کاربردهای فراوان گیاه در علم پزشکی و داروسازی شده است. به همین دلیل مطالعات زیادی بر روی اسانس و عصاره این گیاه در مناطق مختلف صورت گرفته است. در بررسی انجام شده توسط پالپ و همکاران بر روی کاکوتی کوهی مشخص شده است که گیاه حاوی ترکیبات فلاونوییدی، پلی فنلی و میزان بالایی از آسیدهای آمینه است (Alp et al.,2016) حضرتی و همکاران اسانس‌های جدا شده از اندام‌های گل‌دهنده هوایی گیاه کاکوتی را بررسی و توانستند، ۲۱ ترکیب از آنالیز اسانس شناسایی کنند. اصلی ترین ترکیباتی شناسایی شده در این پژوهش پولگون و لیمونن گزارش شده است. (Hazrati et al.,2020)

در سال ۲۰۱۹ تاثیر عصاره الکلی گیاه کاکوتی بر کاهش قند خون موش های صحرایی مورد مطالعه قرار گرفت که می تواند اهمیت استفاده ازآن را به عنوان داروی گیاهی نشان دهد .(Mothagi et al.,2019) بر اساس این تحقیق تاثیر ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود در گیاه کاکوتی عاملی بر کاهش قند خون می باشد.

با توجه به مصرف گسترده گیاه کاکوتی در طب سنتی و خواص مفید درمانی آن و تفاوت در میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی گونه های مختلف و محل رویش آن ها، در این پژوهش قدرت آنتی اکسیدانی عصاره ها ی مختلف گیاه کاکوتی که با نام محلی آنوخ استفاده می شود، مورد بررسی قرار گرفته است. تا کنون مقایسه ای بین میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف کاکوتی انجام نشده است. هم چنین در این پژوهش، بررسی بر روی ترکیبات شیمیایی اسانس حاصل از برگ و ساقه گیاه کاکوتی جمع آوری شده در شهرستان قوچان در هنگام گل دهی برای اولین بار انجام شده است.

مواد و روش ها

برگ و ساقه گیاه کاکوتی مورد استفاده در این پژوهش از کوه های اطراف شهرستان قوچان در بهار سال ۱۴۰۱ جمع آوری شد. جهت تایید گونه گیاه از هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد استعلام و شماره شناسایی E 1041-FUMH به گیاه اختصاص داده شد. متانول، اتانول، دی کلرو متان، از شرکت مرک و

DPPH ، کوئرستین و فولین سیوکالتیو از شرکت سیگما آلدریچ تهیه گردید.

عصاره گیری از گیاه

گیاه در زمان گل دهی از کوه های اطراف قوچان جمع آوری، سپس برگ و ساقه آن جداسازی و پس از شستشو با آب در دمای محیط خشک و پودر شد. مقدار ۰/۱ گرم از پودر گیاه خشک در هر بار عصاره گیری استفاده شد. در عصاره گیری به روش سرد یا ماسراسیون، ۲۰ میلی لیتر حلال مورد نظر با گیاه مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط روی هم زن مغناطیسی مدل C MAG MS4 ساخت IKAآلمان قرار گرفت پس از ۲۴ ساعت، عصاره ها توسط کاغذ صافی فیلتر و در یخچال تا زمان استفاده نگهداری شدند. عصاره گیری به روش گرم در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و زمان ۲۰ دقیقه و استخراج با مایکروویو با توان ۴۰W و مدت زمان ۶ دقیقه انجام شد. در عصاره گیری به روش مایکروویو، هر عصاره به مدت ۱ دقیقه در معرض امواج مایکروویو قرار گرفته و یک دقیقه در حالت استراحت بود. در مجموع هر عصاره ۳ دقیقه در معرض امواج قرار گرفت. حلال های آب (۱۰۰٪) ، متانول (۱۰۰٪)، آب : متانول (۵۰:۵۰)، اتانول (۱۰۰٪)، آب: اتانول (۵۰:۵۰)، آب: اسید کلریدریک ۰/۱ ٪ (۵۰:۵۰) ، آب : دی کلرو متان (۵۰:۵۰)، استن (۱۰۰٪)، مورد استفاده قرار گرفتند. عصاره گیری با هر یک از این حلال ها برای کاهش میزان خطا در سه تکرار انجام شد.

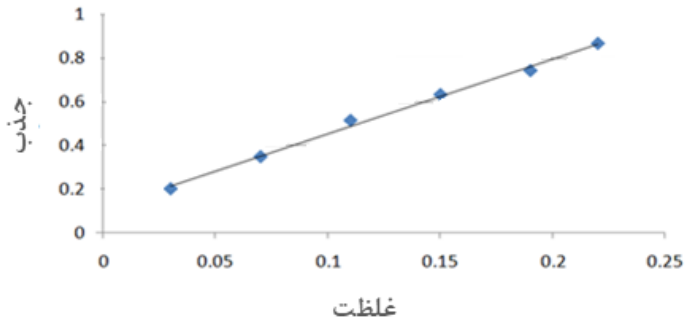
اسانس گیری از گیاه: اسانس گیری ساقه و برگ های گیاه جمع آوری شده به روش تقطیر با بخار آب و به کمک دستگاه کلونجر انجام شد.

قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد ۲،۲ دی فنیل پیکریل هیدرازیل(DPPH): جهت بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ابتدا غلظت های مشخص از عصاره های حاصل(۲۵-۱۵۰میکروگرم برمیلی لیتر) تهیه شد. یک میلی لیتر از محلول متانولی DPPH با غلظت یک میلی مولار به ۳ میلی لیتر از متانول و عصاره افزوده و مخلوط فوق به شدت همزده شد . لوله های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند و جذب آن پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در محیط تاریک درطول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید. هم چنین یک سل مبنا تهیه شد که حاوی تمام ترکیبات به جز رادیکال DPPH بود. علاوه برسل مبنا یک نمونه شاهد هم تهیه گردید که حاوی تمامی مواد بجز عصاره بود و جذب نمونه و شاهد نسبت به سل مبنا سنجیده شد. (Shojaee et al.,2015) فعالیت مهار رادیکال DPPH توسط عصاره که معیاری از میزان فعالیت آنتی اکسیدانی آن است مطابق فرمول زیر محاسبه شد:

$$I\% = (Ablank - Asample/ Ablank) * 100$$

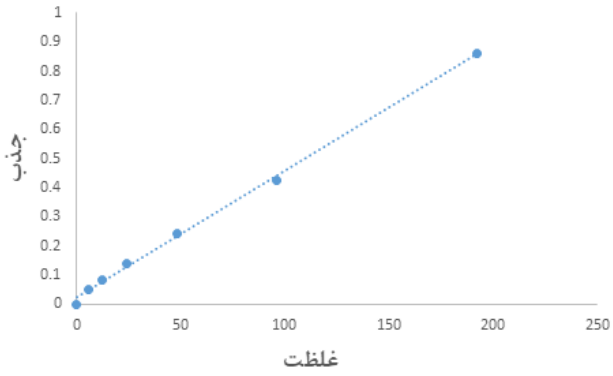
(Senhaji et al.,2020)

تعیین میزان ترکیبات فنلی کل : میزان ترکیبات فنلی کل با استفاده از روش فولین سیوکالتو اندازه گیری شد. در این روش میزان ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۱/۱۶ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد. پس از ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم۲۰٪ به آن ها افزوده شد. میزان جذب پس از ۳۰ دقیقه به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت شد. منحنی استاندارد با استفاده از گالیک اسید رسم شد. (شکل ۱) میزان ترکیبات فنولی کل موجود در عصاره با استفاده از معادله حاصل از منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه و نتایج بر حسب میلی گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره بیان شد. آزمایش ها در سه تکرار انجام و میانگین آن ها گزارش شد. در بیشتر تحقیقات از گالیک اسید به عنوان استاندارد استفاده می شود و نتیجه نهایی به صورت معادل گالیک اسید بر حسب میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک ماده بیان می گردد. (Sadeghi et al.,2015)



شکل ۱ : منحنی استاندارد گالیک اسید جهت اندازه گیری ترکیبات فنولی تام عصاره گیاه کاکوتی

تعیین میزان ترکیبات فلاونوئیدی: میزان کل محتوی فلاونوئیدی با استفاده از معرف کلرید آلومینیم اندازه گیری شد. به نیم میلی لیتر از هر عصاره (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی لیتر از محلول آلومینیم کلراید ۱۰ درصد در اتانول، ۰/۱ میلی از استات پتاسیم یک مولار و ۲/۷ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. پس از گذشت نیم ساعت در دمای محیط، جذب مخلوط در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. (شکل ۲) میزان فلاونوئید بر اساس میزان معادل "میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره" گزارش گردید. (Zhao et al.,2018)



شکل ۲: منحنی استاندارد کوئرستین جهت اندازه گیری ترکیبات فلاونوئیدی عصاره گیاه کاکوتی

تعیین ترکیبات شیمیایی با کروماتوگرافی گازی: شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس موجود در برگ و ساقه گیاه کاکوتی (آنوخ) رویش یافته در کوه های اطراف قوچان توسط آنالیز گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی (GC-MS) Agilent 6890 Gas Chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) انجام شد. نوع ستون DB-5، طول ستون ۳۰ m و قطر داخلی ۰/۲۵ mm بود. برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ۵۰ تا ۲۵۰ درجه سانتیگراد با سرعت افزایش دمای ۶ درجه سانتیگراد در دقیقه انجام گرفت. گاز حامل هلیوم ۹۹/۹۹٪ و مقدار تزریق ۱ µl و سرعت جریان

گاز ml ۱۵ در دقیقه تنظیم شده بود. حجم µl ۱ از اسانس گیاه به منظور شناسایی ترکیبات شیمیایی به دستگاه GC-MS تزریق شد. ترکیبات شیمیایی بر اساس محاسبه اندیس کواتس واطلاعات کتابخانه دستگاه مورد شناسایی قرار گرفتند. (Abbasi et al.,2015).

آنالیز آماری

مقایسه بین نتایج حاصل توسط آزمون های آماری چند دامنه ای دانکن و آنالیز واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام گرفت و نمودارها به وسیله نرم افزار۲۰، Excel رسم شد.

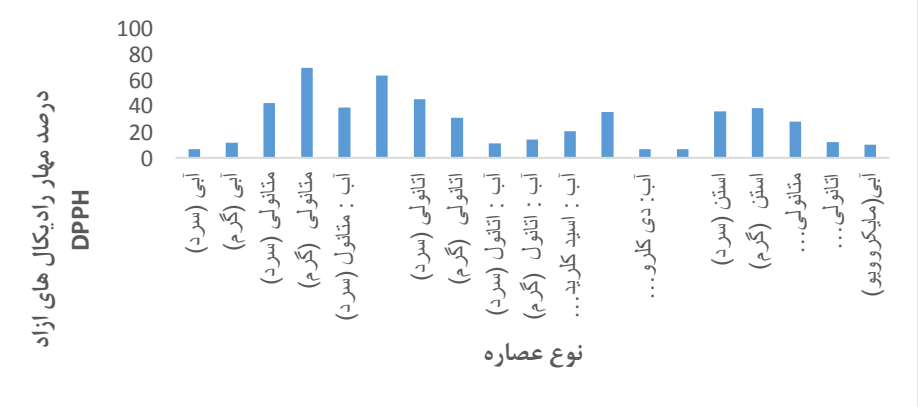
نتایج

قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH: به منظور تعیین قدرت مهار رادیکال های آزاد نتایج بر حسب درصد کاهش در میزان جذب محلول های DPPH در حضور عصاره نسبت به محلول DPPH فاقد عصاره بیان می گردد .(Sharma and Bhat, 2009) مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال های آزاد عصاره های مختلف درجدول ۱ نشان داده شده است. درصد بازدارندگی عصاره های مختلف در محدوده ۶۵/۹۲-۶/۶۴ می باشد.

جدول ۱: مقایسه درصد مهار رادیکال‌های آزاد عصاره های مختلف

ردیف	عصاره	روش عصاره گیری	درصد بازدارندگی
۱	آبی		
۲	آبی	سرد	۶/۸۲
۳	متانولی	گرم	۱۱/۸۲
٤	متانولی	سرد	٤۲/٤۰
٥	آب : متانول	گرم	٦۹/٥۲
٦	آب : متانول	سرد	۳۸/۷۰
۷	اتانولی	گرم	٦۳/٥۹
۸	اتانولی	سرد	٤٥/۲٦
۹	آب : اتانول	گرم	۳۱/۱۸
۱۰	آب : اتانول	سرد	۱۱/۲٦
۱۱	آب : اسید کلرید ریک	گرم	۱٤/۰۳
۱۲	آب : اسید کلرید ریک	سرد	۲۰/۷۳
۱۳	آب: دی کلرو متان	گرم	۳٥/۳۱
۱٤	آب: دی کلرو متان	سرد	٦/۹۳
۱٥	استن	گرم	٦/٦٤
۱٦	استن	سرد	۳٦/۰۸
۱۷	متانولی	گرم	۳۸/٥۷
۱۸	اتانولی	مایکروویو	۲۸/۱٥
۱۹	آب	مایکروویو	۱۲/۳۱
		مایکروویو	۱۰/۱۲

در شکل ۱ نموداری از مقایسه خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف گیاه کاکوتی نمایش داده شده است. در این نمودار عصاره متانولی گرم بیش ترین در صد مهار رادیکال های آزاد را دارد.



شکل ۳ : مقایسه خاصیت انتی اکسیدانی عصاره های مختلف گیاه کاکوتی

تعیین کمی ترکیبات فلاونوئیدی: نتایج حاصل از تعیین میزان ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره‌های مختلف به دست آمده از گیاه کاکوتی در جدول ۲ گزارش شده است.

جدول ۲: میزان ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره های به دست آمده به روش های مختلف استخراج از گیاه کاکوتی

ردیف	عصاره	روش عصاره گیری	جذب	میزان ترکیبات فلاونوئیدی (mg QE/g dry sample)
۱	آبی	سرد	۰/۰۸٤	۱۷/۳۹
۲	آبی	گرم	۰/۱٥٤	۳۰/۱٤
۳	متانولی	سرد	۰/٤۷۷	۱۰۸/۱۲
٤	متانولی	گرم	۰/۸۰۲	۱۷۷/٤
٥	آب : متانول	سرد	۰/٤٥٦	۹۸/۷
٦	آب : متانول	گرم	۰/۸٥۱	۱٦٥/۸
۷	اتانولی	سرد	۰/٥۱٦	۱۱۲/۳٥
۸	اتانولی	گرم	۰/٥۲۹	۷۹/٥
۹	آب : اتانول	سرد	۰/۱٤۸	۲۸/۷۲
۱۰	آب : اتانول	گرم	۰/۱۷٥	۳٤/۸۷
۱۱	آب : اسید کلرید ریک	سرد	۰/۲۳٤	٤۸/۲٦
۱۲	آب : اسید کلرید ریک	گرم	۰/٤۰۷	۸۷/٥٤
۱۳	آب: دی کلرو متان	سرد	۰/۰۸۹	۱٥/۲٥
۱٤	آب: دی کلرو متان	گرم	۰/۰۸٦	۱٤/٦٥
۱٥	استن	سرد	۰/٤۲۱	۹۰/۷٥
۱٦	استن	گرم	۰/٤٤۱	۹٥/۳٦
۱۷	آبی	مایکروویو	۰/۳۳۲	۷۰/٥۱
۱۸	متانولی	مایکروویو	۰/۱٦۸	۳۳/۲٦

۱۹	آب : متانول	مایکروویو	۰/۱۰۷	۱۹/۵
۲۰	اتانولی	مایکروویو	۰/۱۲۹	۲٤/٥٤

تعیین کمی ترکیبات فنلی: بـرای انـدازه گیـری کـل ترکیبات فنلی عصاره های بدست آمده از گیاه کاکوتی، از معرف فولین سیوکالتو استفاده شد. گالیک اسید نیز به عنوان مرجع استفاد گردید و مقدار ترکیبات فنلی با ضریبی از گالیک اسید بیان شد. (Gerjan et al.,2018) اطلاعات جدول ۳ نشان می دهد که میانگین فنل تـام محاسبه شده برای عصاره های مختلف گیاه کاکوتی در محدوده ۷٤/۲٦- ۱٤/۲٦ محاسبه شده است.

جدول ۳: میزان ترکیبات فنولیک استخراج شده از گیاه کاکوتی با استفاده از روش ها و حلال های مختلف [a]

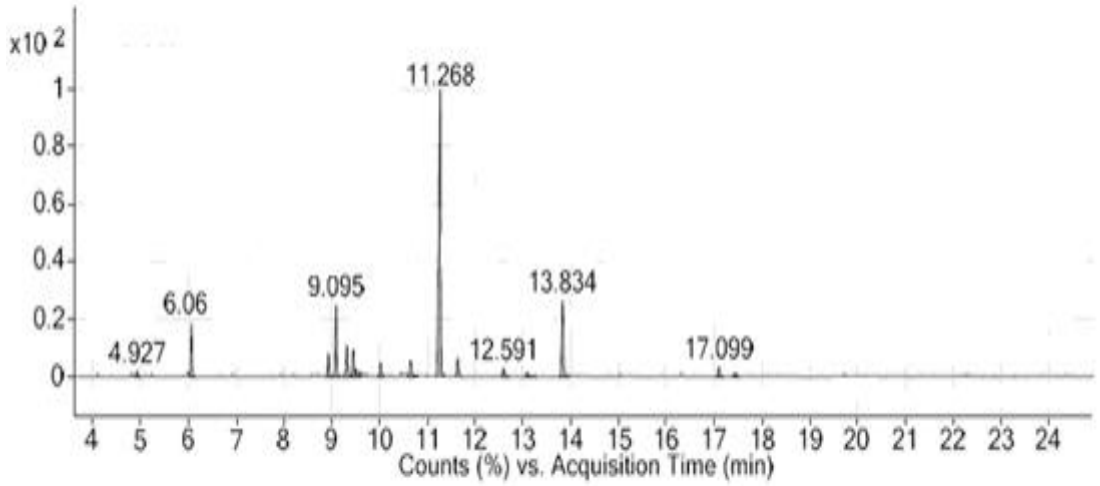
	نوع عصاره	روش عصاره گیری	جذب	میزان فنل تام (mg GAE/g dry sample)
۱	آبی	سرد	۰/۷۳	۱٥/٤۲
۲	آبی	گرم	۱/۳۸	۳۱/۰٥
۳	متانولی	سرد	۲/۷٥	٦۰/۷٤
٤	متانولی	گرم	۳/٤۱	۷٤/۲٦
٥	آب : متانول	سرد	۲/٥۲	٥۱/٤۲
٦	آب : متانول	گرم	۳/۲۷	۷۰/۷۹
۷	اتانولی	سرد	۲/۹۸	٦۳/۸۷
۸	اتانولی	گرم	۱/۷۲	۳۳/٥۸
۹	آب : اتانول	سرد	۰/۹٥	۲۱/۳٥
۱۰	آب : اتانول	گرم	۱/٤٦	۳۲/۸٤
۱۱	آب : اسید کلرید ریک	سرد	۲/۰۸	٤٤/٦٥
۱۲	آب : اسید کلرید ریک	گرم	۱/۹٥	٤۳/۷٤
۱۳	آب: دی کلرو متان	سرد	۰/٦۲	۱٤/۲٦
۱٤	آب: دی کلرو متان	گرم	۰/٥۳	۱۳/۲۱
۱٥	استن	سرد	۲/۱٥	۱۸/۳٦
۱٦	استن	گرم	۲/۳۷	٥۱/۲۲
۱۷	آبی	مایکروویو	۱/۸۷	۳۹/۷٦
۱۸	متانولی	مایکروویو	۱/۲٥	۱٦/۱۷
۱۹	اتانولی	مایکروویو	۱/۰٥	۲٤/٦۸

میانگین دو تکرار ± انحراف معیار a

شکل ٤ نمودار میزان فنل تام نمونه ها را نمایش می دهد. همان طور که در جدول ۳ مشاهده می شود نتایج حاصل از آزمایش های اندازه گیری ترکیبات فنولیک با حلال های مختلف، تأثیر معنی دار نوع حلال و نوع روش استخراج را بر میزان ترکیبات فنولیک استخراج شده نشان داده است.

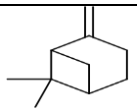
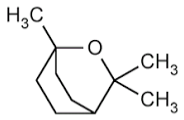
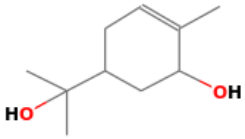
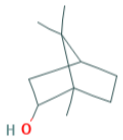
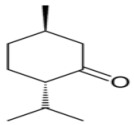
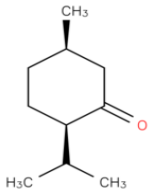
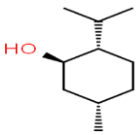
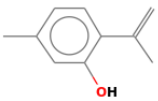
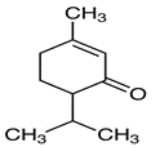
شکل ٤ نمودار میزان فنل تام عصاره های مختلف گیاه کاکوتی بر حسب گالیک اسید

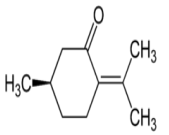
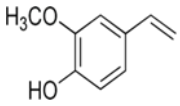
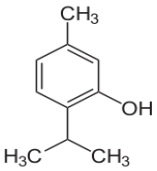
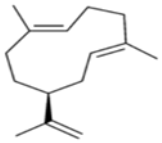
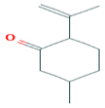
شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس *Ziziphora tenuior L.*: جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود دربرگ و ساقه گیاه کاکوتی، اسانس گیری به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر به مدت ۲ ساعت انجام شد. (Aminkhah et al.,2007) شناسایی مواد تشکیل دهنده اسانس، با مقایسه طیف های جرمی به دست آمده و داده های طیفی موجود در مرجع و هم چنین داده های کتابخانه ای دستگاه GC/MS صورت گرفت. برای تایید نهایی، شاخص بازداری کواتس محاسبه شده برای هر ترکیب با شاخص های کواتس استاندارد موجود در مراجع مقایسه شد. پس از محاسبه ضرایب بازداری مواد تشکیل دهنده اسانس و مقایسه طیف های جرمی ترکیبات مجهول و ترکیبات استاندارد، ترکیبات متشکله موجود در اسانس و میزان آن ها با استفاده از جدول آدامز مشخص شد. به طور کلی ١٤ ترکیب برای این گونه از گیاه شناسایی شد که ویژگی های آن ها در جدول ٤ مشخص شده است. کروماتوگرام اسانس در شکل ١ آورده شده است.



شکل ١: طیف GC/MS اسانس حاصل از ساقه و برگ گیاه. *Ziziphora tenuior L*

جدول ٤: آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه *Ziziphora tenuior L.* *با استفاده از* دستگاه GC/MS

ردیف	نام ترکیب	سطح زیر پیک	زمان بازداری	اندیس کواتس	ساختار ملکولی ترکیب
۱	β-Pinene	۰/٦۳	٤/۹۲۷	۹۷٥	
۲	1, 8-cineole	٥/۸۷	٦/۰٦۷	۱۰۳۱	
۳	1-Cyclohexene-1-methanol, α,α,4-trimethyl	۲/۹٦	۸/۹۳۲	۱۱۲۳	
۴	Isoborneol	۰/۸۸	۹/٥۰۹	۱۱٥٦	
۵	Isoborneol	۹/۲۳	۹/۰۹٥	۱۱٥۸	
۶	Menthone	٤/٥۲	۹/۳۱۹	۱۱٦۰	
۷	Isomenthone	۳/٥٥	۹/٤٥٥	۱۱٦۳	
۸	Isomenthol	۲/۸٥	۱۰/٦٥	۱۲۰۱	
۹	8,9-Dehydrothymol Wajs-Bonikowska et) al.,2012)	۱۱/٦۱	۱۳/۸۳٤	۱۲٤۹	

۱۰	Piperitone	٤٩/٠٥	١١/٢٦٨	١٢٥١	
۱۱	Pulegone	٠/٧٤	١٣/٠٨٧	١٢٨٠	
۱۲	2-Methoxy-4-vinylphenol	١/٢١	١٢/٥٩١	١٢٨٧	
۱۳	Thymol	٠/٥١	١٤/٤٥٣	١٤٨٨	
۱۴	Germacrene D	٠/٦٥	٩/٥٨٤	١٧٢٨	

بحث

نتایج بررسی های انجام شده بر روی گیاه کاکوتی که در جدول ۱ و نمودار رسم شده در شکل ۳ آمده است نشان داد، فعالیت مهارکنندگی رادیکال های آزاد برای عصاره متانولی گرم در میان سایر عصاره های به دست آمده، بالاترین مقدار است. بر این اساس، بیشترین درصد بازدارندگی مربوط به عصاره متانولی تهیه شده به روش گرم (٦٥/٩) و کمترین درصد بازدارندگی مربوط به عصاره آب: دی کلرو متان گرم(٦/٦٤) می باشد. نتیجه حاصل نشان می دهد حلال متانولی گرم بیشترین قدرت استخراج ترکیبات موثره آنتی اکسیدانی در نمونه مورد آزمون را داشته است. نتایج آنالیز در جدول ۱ حاکی از آن است که نوع حلال و روش استخراج تاثیر معنی داری بر میزان مهارکنندگی رادیکال های آزاد داشتند (P>۰/۰۵). هم چنین با افزایش دما تا ۵۰ درجه سانتیگراد فعالیت ضد رادیکالی نمونه های مورد بررسی بیشتر شده و نمونه عصاره متانولی استخراج شده در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد نسبت به سایر عصاره ها خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتری نشان داد.

صمیمی و همکاران در مطالعه ای به بررسی تاثیر افزایش دما بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در عصاره گیاه به لیمو پرداختند.

در این پژوهش مشخص شد افزایش دما منجر به افزایش بازده استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی گردیده است. دلیل بهبود بازده استخراج این ترکیبات با افزایش دما در بیشتر تحقیقات انجام شده ناشی از کاهش ویسکوزیته حلال و افزایش نفوذ پذیری به درون سلول های گیاهی بیان شده است. (Samimi et al., 2022) نتایج پژوهش حاضر در جدول ۳ بر روی عصاره متانولی گیاه کاکوتی نیز، افزایش درصد بازدارندگی و میزان ترکیبات فنلی بالاتر را در دمای ۵۰ درجه نسبت به دمای محیط تایید می کند.

در پژوهش های بسیاری تاثیر امواج ماکروویو بر میزان استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود در عصاره گیاهان مورد مطالعه قرار گرفته است (Jafari and Alizadeh, 2020)در بررسی حاضر، مقایسه درصد بازدارندگی (مهار رادیکال های آزاد) عصاره های موجود در جدول ۱ حاکی از آن است که روش های ماسراسیون و گرم، درصد بازدارندگی بالاتری نسبت به روش استخراج مایکروویو دارند. این مساله می تواند مربوط به فرکانس امواج مورد استفاده و احتمالا تخریب مواد موثره بافت گیاه در اثر حرارت ماکروویو باشد. بر این اساس می توان بیان کرد، نوع حلال و روش استخراج، تاثیر معناداری بر میزان خروج ترکیبات موثره و درصد بازدارندگی یا مهار رادیکال های آزاد دارد. در نتیجه می توان با انتخاب فرکانس های مختلف و حلال مناسب در روش مایکروویو ، شرایط بهینه را برای افزایش استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی عصاره گیاه ایجاد نمود (Hanula et al., 2020) هم چنان که عصاره های متانولی و اتانولی تهیه شده در روش های ماسراسیون و گرم نسبت به عصاره آبی درصد بازدارندگی بالاتری داشته است، در روش مایکروویو نیز مطابق جدول ۱ عصاره های متانولی و اتانولی، نسبت به عصاره آبی، قدرت بازدارندگی بیشتری دارند، که تاکیدی بر تاثیر نوع حلال و قطبیت آن بر میزان استخراج مواد موثره است. در روش مایکروویو ، حلال آبی میزان بیش تری از امواج ماکروویو را نسبت به حلال های اتانولی و متانولی جذب کرده و دما افزایش بیش تری می یابد که می تواند عاملی در تخریب مواد موثره گیاه باشد. علاوه بر این در مقایسه خاصیت بازدارندگی عصاره های آبی به دست آمده با روش های مختلف بین عصاره آبی تهیه شده به روش گرم و عصاره آبی تهیه شده به روش مایکروویو اختلاف معناداری وجود ندارد که نشان می دهد افزایش دما در دو روش در حلال آبی تاثیر یکسانی داشته است. گیاه کاکوتی دارای میزان ترکیبات فلاونوئیدی بالایی است. به طوری که میزان ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده توسط حلال های مختلف از این گیاه در محدوده ۱۵/۲۵-۱۷۷/٤ گزارش شده است. همان طور که در نتایج به دست آمده در جدول ۲ مشاهده می شود، بیشترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره متانولی گرم (۱۷۷/٤) و کمترین ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره آب : دی کلرو متان گرم (۱۵/۲۵) استخراج شده است. بالا بودن ترکیبات فلاونوئیدی گیاه کاکوتی سبب تاثیر قابل توجهی در خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره های به دست آمده دارد. حضور فلاونوئیدها در این تحقیق می تواند فعالیت آنتی اکسیدانی موجود درعصاره های تهیه شده از گیاه را توجیه نماید. (. et Zhao al.,2018)

در مطالعه انجام شده، بیشترین میزان فنل تام مربوط به عصاره متانولی گرم گیاه کاکوتی (۷٤/۲٦) و کمترین میزان ترکیبات فنلی مربوط به عصاره گرم آب : دی کلرومتان (۱٤/۲٦) می باشد که در جدول ۳

نشان داده شده است. نتایج آنالیز واریانس حاکی از تاثیر معنادار نوع حلال مورد استفاده جهت استخراج، بر مقدار ترکیبات فنلی است ($P> ۰/۰۵$).

بررسی نتایج موید آن است که در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد میزان ترکیبات فنلی بیشتری نسبت به دمای سرد از گیاه کاکوتی استخراج شده است. افزایش غلظت ترکیبات فنلی به طور مستقیم توانایی عصاره های مختلف را در مهار رادیکال آزاد افزایش می دهد. در غلظت های بالاتر ترکیبات فنلی، به دلیل افزایش تعداد گروه های هیدروکسیل موجود در محیط، اهدا هیدروژن به رادیکال های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می یابد. در مطالعات صورت گرفته توسط محققین مختلف، تاثیر دمای استخراج بر میزان استخراج ترکیبات فنلی تایید شده است. در اثر افزایش دما بافت های گیاهی نرم شده و برهم کنش ترکیبات فنلی با پروتئین و پلی ساکارید ها تضعیف می شود و این تغییرات باعث خارج شدن مقدار بیشتری از ترکیبات شیمیایی گیاه خواهد شد. (Gan and Latiff, 2011) در مطالعه دیگری، تاثیر حلال، روش، زمان و دمای استخراج بر بازیابی ترکیبات فنلی و آنتی اکسیدان ها از تفاله قهوه مصرف شده بررسی شده است. نتایج حاصل مشخص می کند با افزایش دما میزان ترکیبات فنلی و آنتی اکسیدانی استخراج شده به طرز چشمگیری افزایش‌یافته اند. (Araújo et al.,2022) نتایج مطالعه حاضر نیز حاکی از خروج بیشتر ترکیبات فنلی از عصاره گیاه کاکوتی با افزایش دمای استخراج در روش گرم بود که با نتایج محققان پیشین مطابقت داشت.

با استفاده از آنالیز GC/MS تعداد ۱۴ ترکیب در اسانس به دست آمده از گیاه کاکوتی شناسایی شد. در میان این ترکیبات، پالگون بالاترین میزان ترکیبات اسانس را تشکیل می دهد. این ترکیب آلی در مواد طعم دهنده در صنایع غذایی و به عنوان عامل آنتی اکسیدانی مورد استفاده قرار می گیرد. خاصیت آرام بخشی و و ضد درد بودن آن نیز بررسی شده است. (Aminzare et al.,2022) تیمول که تنها ۱/۲۱ درصد از اسانس راتشکیل می دهد، یک ترکیب شیمیایی فنولی است که دارای خاصیت ضد باکتریایی می باشد. منتون مونو ترپنی است که خاصیت آرام بخشی دارد. بتا پینن موجود در گیاه نیز دارای خواص درمانی از جمله ضد ویروس و ضد باکتری می باشد. هم چنین ۵/۸۷ درصد اسانس از ترکیب اکالیپتول با خواص ضد التهابی و آنتی اکسیدانی تشکیل شده است. حضور این ترکیبات در اسانس گیاه کاکوتی تاییدی بر خواص آنتی اکسیدانی بالای آن دارد. (Ardestani et al.,2016)

نتیجه گیری نهایی

تشخیص و جداسازی ترکیبات موجود در گیاهان نقش مهمی در صنعت دارویی دارد. بسته به شرایط عصاره گیری از گیاهان ترکیبات شیمیایی متفاوتی قابل جداسازی هستند. نوع حلال و شرایط دمایی از عوامل مهم در جداسازی ترکیبات می باشند. هدف از انجام این تحقیق بررسی خواص آنتی اکسیدانی و مقایسه میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل در عصاره های مختلف حاصل از گیاه دارویی کاکوتی (آنوخ) تهیه شده از شهرستان قوچان می باشد. نتایج این پژوهش حاکی از بالا بودن میزان فنل تام و ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره های به دست آمده از حلال های مختلف بود. به طوری که میزان فنل تام و ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره متانولی گرم به ترتیب

۷۴/۲۶ و ۱۷۷/٤ به دست آمد. بالاترین میزان خاصیت آنتی اکسیدانی که با درصد مهار رادیکال های آزاد رابطه مستقیم دارد در عصاره متانولی گرم محاسبه شد که نشان دهنده خاصیت آنتی اکسیدانی قابل توجه این گیاه می باشد. نوع حلال و شرایط استخراج تاثیر معناداری بر استخراج ترکیبات موثره و خاصیت آنتی اکسیدانی گیاه نشان داد. هم چنین مواد موثره موجود در اسانس حاصل ازبرگ و ساقه گیاه کاکوتی در زمان گل دهی به کمک دستگاه GC/ MS شناسایی شد. مکان رویش و زمان جمع آوری گیاه در نوع ترکیبات شیمیایی موجود درآن موثر است. با توجه به میزان بالای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاه و شناسایی ترکیباتی با خواص دارویی، گیاه کاکوتی می تواند منبع آنتی اکسیدانی مناسبی برای تولید داروهایی با منشا طبیعی باشد. شرایط عصاره گیری می تواند بر استخراج میزان و نوع ترکیبات آنتی اکسیدانی گیاه موثر باشد.

تعارض منافع

تعارض منافعی بین نویسندگان وجود ندارد.

References

Abbasi, N., Khalighi, Z., Eftekhari, Z. and Bahmani, M. (2020). Extraction and phytoanalysis of chemical compounds of *Eucalyptus globulus* leaf native to Dehloran, Ilam province, Iran by HS-SPME and GC-MS. Advances in Animal and Veterinary Sciences. 8(6): 647-652.

Alp, S., Ercisli, S., Dogan, H., Temim, E., Leto, A., Zia-Ul-Haq, M., Hadziabulic, A. and Aladag, H. (2016). Chemical composition and antioxidant activity *Ziziphora clinopodioides ecotypes* from Turkey. Romanian Biotechnological Letters. 21(2): 11298-11303.

Aminkhah, M. and Asgarpanah, J. (2017). GC-MS analysis of the essential oil from *artemisia aucheri boiss*. Fruits. Journal of the Chilean Chemical Society. 62(3): 3581–3582.

Aminzare, M., Hashemi, M., Afshari, A., Mokhtari, M.H. and Noori, S.M.A. (2022). Impact of microencapsulated *Ziziphora tenuior* essential oil and orange fiber as natural- functional additives on chemical and microbial qualities of cooked beef sausage. Food Science & Nutrition. 10(10): 3424–3435.

Araújo, C.S., Vimercati, W.C., Macedo, L.L. and Pimenta, C.J. (2022). Effect of solvent, method, time and temperature of extraction on the recovery of phenolic compounds and antioxidants from spent coffee grounds. International Journal of Food Engineering. 18: 325–336.

Ardestani, F.M., Rabie M. and Bakhshi Khaniki, G. (2016). The effect of environmental factors on growth characteristics, seed germination and essential oils of *Ziziphora clinopodioides*. Iranian Journal of Plant Biology. 8(29): 91-106.

Azadmehr, A., Latifi, R., Mosalla, S., Hajiaghaee, R. and Shahnazi, M. (2014). Immunomodulatory effects of *Ziziphora tenuior L*. extract on the dendritic cells. DARU. 22(1): 63

Bronisław K. Gł. and Mateusz, B. (2023). The antioxidative properties of selected herbs estimated using various assays. Journal of Chemistry. 2023: 6.

Falah Shojaee, M., Sadeghi Mahoonak, A.R., Khomeiri, M. and ghorbani, M. (2015). Evaluation of antioxidant activity of methanol extract of *Stevia rebaudiana Bertoni* and investigation of this properties in dairy dessert. Journal of Food Processing and Preservation. 8 (2): 69-90.

Gan, C.Y. and Latiff, A.A. (2011). Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa pod* using response surface methodology. Food Chemistry. 124: 1277–128.

Gerjian, F., Mirzajani, R. and Kolahi, M. (2018). Phytochemical, antioxidant and phenolic content Survey of leaves and flowers hydro alcoholic extracts of the *Conocarpus erectus* and biosynthesis of gold and silver nanoparticles using this extracts. Ecophytochemistry of Medicinal Plants. 7(1): 87-100.

Hanula, M., Wyrwisz, J., Moczkowska, M., Horba´nczuk, O.K., Pogorzelska-Nowicka, E. and Wierzbicka, A. (2020). Optimization of microwave and ultrasound extraction methods of *açai berries* in terms of highest content of phenolic compounds and antioxidant activity. Applied Sciences. 10: 8325.

Hazrati, S., Govahi, M., Sedaghat, M. and Kashkooli, A.B. (2020). A comparative study of essential oil profile, antibacterial and antioxidant activities of two cultivated Ziziphora species (*Z. clinopodioides* and *Z. tenuior*). Industrial Crops and Products.157: 112942.

Jafari, A. and Alizadeh, A. (2020). Ultrasound and microwave assisted extraction of phenolic compounds

from red onion (*Allium Cepa L.*) skin dried with infrared oven. Food Engineering Research. 19(69): 109-122.

Mothagi, A., Aghababa, H., Heydari, M., Hosseini, s., Zarei, A., Voghofi, R. and Changizi-Ashtiyani, S. (2019). Effect of alcoholic extract of *Ziziphora tenuior L.* on blood glucose and lipid profiles in streptozotocin-induced diabetic rats. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism. 20(6): 312-319.

Nasiri Tarzejani, E. and Nasri, S. (2020). Cytotoxicity of methanol extracts of *Ziziphora tenuior.L* on Hela cell line by MTT assay. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 10 (38): 69-82.

Rababah, T., Hettiarachchy, N. and Horax, R. (2004). Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and tert-butylhydroquinone. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52(16): 5183–5186.

Ruenroengklin, N., Zhong, J., Duan, X., Yang ,B., Li, J. and Jiang, Y. (2008). Effects of various temperatures and pH values on the extraction yield of phenolics from *Litchi* fruit pericarp tissue and the antioxidant activity of the extracted anthocyanins. International Journal of Molecular Sciences. 9(7): 1333-1341.

Sadeghi, Z., Valizadeh, J., Shermeh, O. A. and Akaberi, M. (2015). Antioxidant activity and total phenolic content of *Boerhavia elegans* (choisy) grown in Baluchestan, Iran. Avicenna Journal of Phytomedicine. 5(1): 1–9.

Samimi, Z., Yaghoobi, M., Sanikhani, M. and Kheiry, A. (2022). Evaluation of effective factors on the extraction efficiency of and flavonoid compounds of lemon verbena (*Aloysia citriodora Palau*) under ultrasonic waves and evaluation of its antibacterial properties. Iranian Journal of Food Science and Technology. 127(19): 155-166.

Senhaji, S., Lamchouri, F. and Toufik, H. (2020). Phytochemical content, antibacterial and antioxidant potential of endemic plant *anabasis aretioïdes Coss. & Moq*. (Chenopodiaceae). BioMed Research International. 2020: 1–16.

Sharma, OP. and Bhat, T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. Food Chemistry. 113(4): 1202-1205.

Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J., Bryan, M. and Wu, Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. Journal of Food Agriculture and Environment. 1(2) : 42-47.

Wajs-Bonikowska, A ., Stojakowskab, A. and Kalemba, D. (2012). Chemical composition of essential oils from a multiple shoot culture of *Telekia speciosa* and different plant organs. Natural Product Communications. 7 (5): 625-628.

Zhao, L., Liu, W., Xiong, S., Tang, J., Lou, Z., Xie, M., Xia, B., Lin, L. and Liao, D. (2018).

Determination of total flavonoids contents and antioxidant activity of Ginkgo biloba leaf by near-infrared reflectance method. International Journal of Analytical Chemistry. 2018: 1–7.