

## کاربرد امواج فراصوت در استخراج ترکیبات فیتوشیمیایی و بیوشیمیایی گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis L.*)

فاطمه شاه قلی<sup>۱</sup>، علاءالدین کردنائیج<sup>۲</sup>، داریوش طالعی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

<sup>۲</sup> استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد تهران، تهران، ایران

<sup>۳</sup> دانشیار گروه علوم پایه، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد تهران، تهران، ایران

### چکیده

بادرنجبویه گیاه دارویی است که برگ‌های آن در بردارنده رزمارینیک‌اسید می‌باشند. رزمارینیک‌اسید یک پلی فنول طبیعی کربوکسیلیک‌اسید است که از جمله مهم‌ترین ترکیبات گیاهی به شمار می‌رود. در پژوهش حاضر، کارایی استخراج رزمارینیک‌اسید و پروتئین با استفاده از پیش تیمار فراصوت به عنوان یک روش کم‌هزینه، زودبازده و بهینه مورد آزمون قرار گرفت. برای این منظور، در قالب یک آزمایش فاکتوریل دو عاملی اثرات توان فراصوت در چهار سطح (۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ وات) و زمان اثردهی فراصوت در سه سطح (۱، ۳ و ۶ دقیقه) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی بر محتوای رزمارینیک‌اسید و پروتئین برگ گیاه بادرنبویه بررسی شد. هر ترکیب تیماری در سه تکرار با دستگاه اولتراسونیک مدل UP-400E تیمار گردید. محتوای رزمارینیک‌اسید استخراج شده تحت تیمار فراصوت با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) سنجیده شد. محتوای پروتئین برگ به برادفورد استخراج و کمیت آن با استفاده از دستگاه الیزاریدر در طول موج ۵۹۵ نانومتر سنجیده شد. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد، بیشترین میزان محتوای رزمارینیک‌اسید و پروتئین در زمان ۶ دقیقه و توان ۱۶۰ وات حاصل شد و با افزایش توان فراصوت، میزان ترکیبات استخراج شده کاهش یافت. همچنین همبستگی بین دو ترکیب پروتئین و رزمارینیک‌اسید ۰/۵۵۳ بود که یعنی در سطح ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد و نشان می‌دهد که میزان محتوای پروتئین و رزمارینیک‌اسید رابطه مستقیم دارند.

**واژه‌های کلیدی:** امواج اولتراسونیک، بادرنبویه، رزمارینیک‌اسید، محتوای پروتئین

## ۱- مقدمه

آثار و خواص گیاهان دارویی بر کسی پوشیده نیست و خوشبختانه در سال‌های اخیر توجه بیشتری به این دسته از گیاهان و کاربرد آن‌ها شده است. مواد شیمیایی‌ای که گیاهان در دیواره سلولی خود جمع می‌کنند به دو دسته تقسیم می‌شوند دسته اول موادی هستند که از متابولیسم اولیه گیاه به دست می‌آیند مانند پروتئین و کربوهیدرات و چربی، اما دسته دوم از متابولیسم‌های ثانویه هستند مانند ترکیبات فنولی، ترپنوئیدی و آلکالوئیدی که این مواد در فعالیت‌های گیاهی نقش حیاتی ندارند اما در صنایع غذایی، دارویی، کشاورزی و آرایشی مورد استفاده قرار می‌گیرند (ترکمن، ۱۳۸۹). بادرنجبویه از تیره نعناع، جنس ملیسا و گونه آفیشینالیس است با نام علمی (*Melissa officinalis L.*) و نام شناخته شده (Lemon Balm) که به علت دارا بودن آلفاتوکوفرول و ترکیبات دیگری مثل اسیدلینولئیک، کارنوسیک، یورسولیک، رزمارینیکاسید خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد (کریمی ثانی، ۱۳۹۷).

این گیاه که علفی و چندساله با ارتفاع ۶۰-۴۰ سانتی‌متر می‌باشد و دارای خواص آرام‌بخشی، درمان ناراحتی‌های عصبی و بیماری‌های قلبی است. تحقیقات نشان می‌دهد که رزمارینیکاسید تاثیرات ضد ویروس ایدز نیز دارد (chen, 1999) (Omidbaigi, 2010) (Hassanzadeh, 2016). متابولیت‌های ثانویه در بافت‌ها و مسیرهای بیوسنتز گیاهان تولید می‌شوند (Dias et al., 2016). سطح این متابولیت‌ها عموماً در گیاهان دارویی پایین است و به همین دلیل جداسازی برخی از ترکیبات فعال آن‌ها دشوار است (Lee et al, 2013).

اگرچه در زمینه تاثیر امواج فراصوت بر محتوا و میزان متابولیت ثانویه رزمارینیک اسید در بادرنجبویه پژوهشی صورت نگرفته است اما به طور کلی در پژوهش‌های مختلف ثابت شده است که استفاده از امواج فراصوت به صورت الیسیاتور می‌تواند سبب افزایش و بهبود راندمان تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان شود. برای مثال در بررسی اثر فراصوت بر گیاه زردچوبه نشان داده شد که این امواج می‌توانند باعث افزایش مقدار استخراج متابولیت‌های ثانویه در این گیاه مانند کورکومین، کامفور، پینن و ۸-۱ سینئول شوند. همچنین در این تحقیق مشخص شد که استفاده از فراصوت، مدت زمان لازم برای استخراج متابولیت‌های ثانویه را کاهش داد (Malik et al., 1985).

در آزمایش بررسی اثر امواج فراصوت بر رشد برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک در کشت جلبک تک سلولی *Dunaliella salina*، نشان داده شد که فراصوت با تحریک سلول‌ها و القای پاسخ‌های دفاعی باعث افزایش مقدار بتا-کاروتن، گلیسرول، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها می‌شود (مخبری و همکاران، ۱۳۹۴). رزمارینیکاسید یک پلی فنول طبیعی کربوکسیلیک اسید می‌باشد که در بسیاری از دیگر گیاهان تیره نعناع مانند پونه کوهی، مریم گلی، آویشن و نعناع وحشی نیز دیده شده است (رحیمی، ۱۳۹۹). ترکیبات فنولیک با دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار ارزشمند هستند. مقدار ترکیبات فنلی موجود در گیاهان یا محصولات غذایی نشان دهنده ارزش غذایی آن است. در فرایند استخراج ترکیبات به روش اولترا سونیک عواملی همچون توان دستگاه و زمان استخراج موثر هستند. در مقایسه با سایر روش‌های استخراج، امواج فراصوت کم هزینه و آسان‌تر می‌باشد و همچنین قدرت استخراج ترکیبات فنولی آن بالاتر می‌باشد (مویدنیا، ۱۳۹۳).

به منظور بررسی اثر توان فراصوت و مدت زمان اثر دهی آن بر محتوای رزمارینیکاسید برگ بادرنجبویه، یک آزمایش فاکتوریل دو عاملی شامل عامل توان فراصوت در چهار سطح (۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ وات) و مدت زمان اثردهی فراصوت در سه سطح (۱، ۳ و ۶ دقیقه) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار (۳۶ واحد آزمایشی) به اجرا در آمد.

## ۲- مواد و روش ها

نمونه های برگه از میان بوته های بادرنجبویه کشت شده در مزرعه گیاهان دارویی مرکز گیاهان دارویی دانشگاه شاهد تهیه شدند. برای این منظور برگها از بوته ها جدا و در آون با دمای ۵۰ درجه سانتیگراد خشک شده و سپس با آسیاب پودر شدند. مقدار ۰.۵ گرم از پودر خشک برگه با ترازو توزین و در بشر محتوی ۱۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط و در مدت زمان و توان مختلف تحت اثر فراصوت قرار گرفتند. پس از اعمال تیمارهای فراصوت، محتوای رزمارینیک اسید توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مشخص شد.

استخراج پروتئین از نمونه های برگه فریز شده در ازت مایع و به روش برادفورد (Bradford, 1976) انجام گرفت. جهت اندازه گیری غلظت پروتئین، ۰.۲۵ گرم از بافت منجمد هر نمونه توزین و در میکروتیوپ ریخته شد. سپس ۱ میلی لیتر بافر استخراج به هر میکروتیوپ اضافه گردید و جهت هموژن شدن به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد و در مدت زمان و توان مختلف تحت اثر فراصوت قرار گرفت؛ سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ انجام گرفت و مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره هر نمونه برداشته و ۲۵۰ میکرولیتر معرف برادفورد به آن اضافه شد؛ سپس محتوای پروتئین نمونه ها با استفاده از دستگاه الیزاریدر در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری شد. با استفاده از نمودار استاندارد آلومین سرم گاوی، غلظت پروتئین نمونه ها تعیین شد. با قرار دادن OD نمونه ها در معادله خط، مقدار پروتئین کل بدست آمد.

تجزیه داده های حاصل از اثرات تیمارهای فراصوت بر محتوای رزمارینیک اسید و پروتئین برگ بر اساس مدل آماری آزمایش دو عاملی و به روش تجزیه واریانس انجام شد. آزمون مقایسه میانگین ها هم به روش دانکن صورت گرفت.

## ۳- نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر مدت زمان و توان فراصوت بر محتوای رزمارینیک اسید و پروتئین برگ گیاه بادرنجبویه در جدول ۱ آمده است.

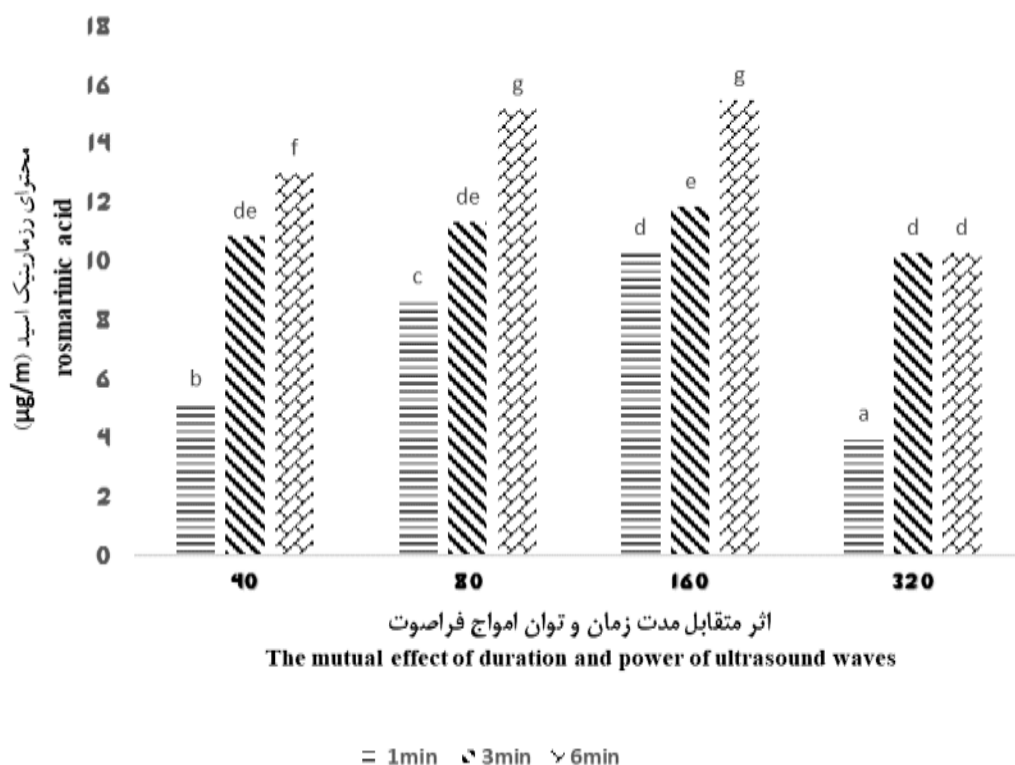
جدول ۱. تجزیه واریانس اثر مدت زمان و توان فراصوت بر محتوای رزمارینیک اسید و پروتئین برگ گیاه

## بادرنجبویه

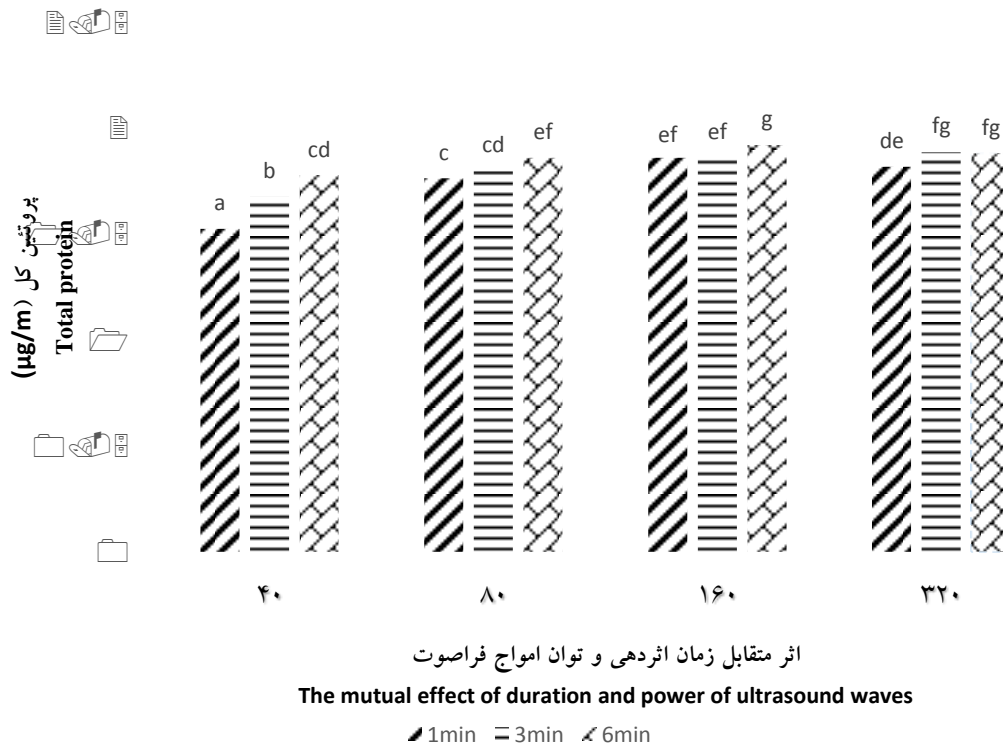
منبع تغییر Variable	درجه آزادی DF	میانگین مربعات رزمارینیک اسید Rosmarinic acid average of squares ( $\mu\text{g/ml}$ )	میانگین مربعات پروتئین Protein average of squares ( $\mu\text{g/ml}$ )
زمان Time	2	**128/823	**0/046
توان Power	3	**36/389	**0/093
اثر متقابل Interaction Effect	6	**4/875	**0/007
خطا Error	24	0/342	0
ضریب تغییرات CV(%)		22/75	6/1

\*\* معنی دار در سطح ۱ درصد

نتایج جدول ۱ نشان داد که اثر زمان فراصوت بر محتوای رزمارینیک اسید و پروتئین دارای اثر معنی‌داری در سطح ۱ درصد است. همچنین اثر توان فراصوت و اثر متقابل زمان و توان فراصوت بر رزمارینیک اسید و پروتئین در سطح ۱ درصد معنی‌دار است.



شکل ۱. مقایسه میانگین اثرات تیمارهای مدت زمان و توان فراصوت بر محتوای رزمارینیک اسید برگ گیاه بادرنجبویه به روش دانکن



شکل ۲. مقایسه میانگین اثرات تیمارهای مدت زمان و توان فراصوت بر محتوای پروتئین برگ گیاه بادرنجبویه به روش دانکن

(در شکل ۱ و ۲ اختلاف بین تیمارهایی که حروف مشترک ندارند معنی دار است.)

امواج فراصوت در هنگام عبور از میان یک محیط الاستیک، جابه‌جایی طولی ذرات را موجب می‌شوند و توالی انقباض و انبساطی را ایجاد می‌کنند. فرایند حفره‌زایی و فشار و دمای حاصله از آن دیواره‌های سلولی گیاهی را پاره می‌کند (روحانی، ۱۳۹۸). با تکیه بر چنین مکانیسمی، در شکل ۱ و ۲ با افزایش مدت زمان اثردهی فراصوت به عنوان پیش تیمار قبل از استخراج، محتوای رزمارینیک اسید و پروتئین استخراج شده افزایش معناداری پیدا کرد. هم‌چنین با افزایش توان دستگاه مولد فراصوت (اولتراسونیک) تا ۱۶۰ وات، محتوای رزمارینیک اسید و پروتئین افزایش پیدا کرد. اگرچه با رسیدن توان به ۳۲۰ وات مقدار رزمارینیک اسید و پروتئین استخراج شده کاهش پیدا کرد که این نتایج با آزمایشات مشابه ذکر شده در گیاهان دیگر تطابق دارد و افزایش راندمان استخراج را می‌توان به بهبود پدیده انتقال جرم و کاهش ویسکوزیته حلال نسبت داد. کاهش بازده ناشی از افزایش توان دستگاه به ۳۶۰ وات را نیز می‌توان به تخریب شیمیایی رزمارینیک اسید و پروتئین در برابر شوک حرارتی و فراصوت منتسب کرد. هم‌چنین در بررسی اثرات متقابل مدت زمان و توان فراصوت در این پژوهش، بیشترین میزان رزمارینیک اسید و پروتئین استخراج شده در مدت زمان ۶ دقیقه و توان ۱۶۰ وات مشاهده گردید. این مسئله به دلیل آزادسازی مناسب ترکیبات از دیواره سلولی است. در مقابل، کمترین میزان رزمارینیک اسید استخراج شده نیز در زمان ۱ دقیقه و توان ۳۲۰ مشاهده گردید. در خصوص پروتئین نیز کمترین مقدار در زمان ۱ دقیقه و توان ۴۰ وات بود.

همبستگی بین پروتئین و رزمارینیک اسید ۰/۵۵۳ بود که در سطح ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد و نشان می‌دهد که میزان محتوای پروتئین و رزمارینیک اسید رابطه مستقیم دارند.

## ۴- نتیجه گیری

در پژوهش حاضر نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد اثر متقابل زمان و توان دستگاه اولتراسونیک می‌تواند در میزان استخراج متابولیت ثانویه رزمارینیک‌اسید تا حدی تاثیر مثبت داشته باشد. بهترین مقدار رزمارینیک‌اسید در زمان ۶ دقیقه و توان ۱۶۰ وات حاصل گردید. همچنین این تیمارها بر میزان پروتئین اثر داشته و مناسب‌ترین زمان استخراج ۶ دقیقه و توان ۱۶۰ وات است؛ اما لازم است از توان‌های بیشتر از ۱۶۰ وات برای استخراج هر دو ترکیب خودداری کرد زیرا با افزایش توان میزان این دو ماده کاهش یافت. از نظر کیفیت پروتئین تغییری در تیمارها دیده نشد. این نتیجه مشخص می‌کند که در به-کارگیری الیسیتورها باید به اثر متقابل آن‌ها جهت کسب بهترین نتیجه و بیشترین متابولیت ثانویه دقت و توجه بیشتری نمود.

## منابع

۱. ترکمن، ج. (۱۳۸۹). اندازه گیری سالیسیلیک اسید پوست درختان صنوبر دلتوئیدس و اورامریکن ( *Populus P. euramerican & deltoides*) به روش HPLC. فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۱۷.
۲. رحیمی، ا. (۱۳۹۹). استفاده از نانو پوروس کربنی CMK-3 برای میکرو استخراج رزمارینیک اسید باسرنگ پر شده (MEPS) سومین کنگره ملی شیمی و نانو شیمی از پژوهش تا فناوری. انجمن علوم و فناوری های شیمیایی ایران.
۳. روحانی، م.، میرجعفری، ز.، رضاپور، ه.، مختاری، ج. (۱۳۹۸). استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا (HPLC) در بررسی بهبود فرآیند عصاره گیری از گیاه استویا ربادبانا با استفاده از امواج فراصوت. مجله علوم غذایی و تغذیه، سال هفدهم، شماره ۱، ۸۹-۹۸.
۴. کریمی ثانی، ا. (۱۳۹۷). بررسی ترکیبات شیمیایی و خواص بیولوژیکی گیاه بادرنجبویه. سومین همایش ملی کشت ارگانیک و ازدیاد گیاهان دارویی (ص. ۱۰۴ و ۱۰۲). ارومیه: انجمن گیاهان دارویی ایران.
۵. مخبری، ر.، رضایی، آ.، کردنائیج، ع. (۱۳۹۴). افزایش تولید بتا-کاروتن و گلیسرول در کشت سلولی *Dunaliella salina* توسط امواج فراصوت. مجله سلول و بافت، ۳۹۷-۴۰۸.
۶. مویدنیا، ن. (۱۳۹۳). کاربرد امواج اولتراسونیک در استخراج ترکیبات فنلی از منابع گیاهی. دومین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار، (ص. ۲). همدان.
7. chen, H., chen, F., Zhang, Y.-L., & song, J.-Y. (1999). Production of lithospermic acid B and rosmarinic acid in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiz*. *J. Indu. Micr. Biot*, 22: 133-138.
8. Dias, M., Sousa, M., Alves, R., Ferreira, I. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, 82, 9-22.
9. Hassanzadeh, K., Hemmati, K., & Alizadeh, M. (2016). Effect of organic fertilizers and salicylic acid on the yield and some secondary metabolites of lemon balm. *J. Plant Prod. Res*, 23: 1.107-130.
10. Lee, Y., Ju, H., kim, Y., Lim, T., Uddin, M., kim, Y.,... Park, S. (2013). Enhancement of anti-inflammatory activity of *Aloe vera* adventitious root extracts through the alteration of primary and secondary metabolites via salicylic acid elicitation. *PLoS one*, 8(12), p e82479.
11. Malik, S., Hasan, S., Choudhary, M., Ni, C., & Clardy, J. (1995). Nigellidine—a new indazole alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron letters*, 1993-1996.
12. Omidbaigi, R. (2010). Approaches to Production and Processing of Medicinal plants. Behnashr Press.

# Ultrasound waves utilization for extraction of phytochemical and biochemical compounds in Lemon balm (*Melissa officinalis* L.)

Fatemeh shahgholi<sup>1</sup>، Alaeddin Kordenaeej<sup>2</sup>، Daryush Talei<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Master of Agricultural Biotechnology, Shahed University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, Shahed University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor, Department of Basic Sciences, Medicinal Plants Research Center, Tehran Shahed University, Tehran, Iran

---

## Abstract

Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) is an important aromatic and herbaceous plant of the mint family, which is considered an important medicinal plant due to its extract compounds like rosmarinic acid. The use of physical treatments such as ultrasounds with the aim of increasing the content of rosmarinic acid has been the main goal of this research. For this purpose, effects of the ultrasound power at four levels (40, 80, 160, and 320 w) and the time of the ultrasound waves exposure on the content of rosmarinic acid and protein in lemon balm leaves were assessed in a factorial experiment based on a completely random design with three repetitions. Based on the results of the ANOVA, effect of the ultrasound waves power was positive on the content of rosmarinic acid up to 160 W, while by increasing the power of the device up to 320 W, the content of rosmarinic acid was decreased. Protein content of the leaves was increased up to 160 W and decreased at 320 W by the same way. The correlation between protein and rosmarinic acid was 0.553, which is significant at the 1% level and shows that the content of protein and rosmarinic acid have a direct relation. The most suitable exposure time for extraction of the rosmarinic acid was six minutes and the most effective power for the ultrasound waves was 160 w. That was the same for the protein content.

**Keywords:** ultrasonic waves, *Melissa officinalis* L., rosmarinic acid, protein contents

---