



بررسی ترکیبات فنولی و آنتی اکسیدانی عصاره دو گیاه
(*Dianthus caryophyllus*, *Fumaria vaillant*) با استفاده از روشهای TLC و HPLC

پریچهر حناچی^{۱*}، مرجان حسین پور^۲

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

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	در این مطالعه دو گیاه میخک و شاهتره میزان فلاونوئیدهای تام و فنل های تام و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی، آبی، اتانولی دو گیاه شاهتره و میخک بررسی و نتایج به دست آمده با هم مقایسه شد. سنجش میزان فنل و فلاونوئید تام و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با استفاده از روش DPPH و FRAP اندازه گیری شد. و روش کروماتوگرافی TLC و HPLC با هدف جداسازی ترکیبات فنولی موجود در گیاه شاهتره و میخک انجام شد. بیشترین مقدار فنول مربوط به گیاه شاه تره درحلال متانولی و روش خیساندن بوده که مقدار $10 \pm 0/14 \text{ mg/g DW}$ بوده و بیشترین مقدار فلاونوئید مربوط گیاه شاه تره در حلال متانولی و روش خیساندن $9 \pm 0/14 \text{ mg/g DW}$ بوده و تفاوت معنی داری را در سطح $P < 0/05$ نشان داد. بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی مربوط به حلال متانولی شاهتره و روش خیساندن با روش DPPH به مقدار $0/4 \pm 0/14 \mu\text{g/ml}$ بوده و تفاوت معنی داری را در سطح $P < 0/05$ نشان داد. با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک ترکیبات گالیک اسید و ۴ هیدروکسی ۳ دی متوکسی بنزوئیک اسید و ۴ هیدروکسی سینامیک اسید و وانیلیک اسید شناخته شدند. و با استفاده از کروماتوگرافی با کارایی بالا ترکیبات فنولی گالیک اسید و ۴ هیدروکسی سینامیک اسید و ۴ هیدروکسی بنزوئیک اسید شناسایی شدند. نتایج این مطالعه به خوبی نشان می دهند که فعالیت آنتی اکسیدانی این گیاهان با میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدهای تام رابطه مستقیم دارد. پیشنهاد میشود با انجام آزمایشهای تکمیلی استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی موجود در گیاه شاهتره و میخک را جایگزین آنتی اکسیدان های مصنوعی نمود.
کلمات کلیدی:	
سرطان، فلاونوئیدی، فنولها، شاه تره، آنتی اکسیدانی، کروماتوگرافی، میخک.	
DOI: 10.52547/fsct.18.116.231	
* مسئول مکاتبات: p.hanachi@alzahra.ac.ir	

۱- مقدمه

کشور ایران از مناطق خاص دنیا است که دارای تنوع آب و هوایی بسیار زیادی بوده و این امر سبب شده که ذخیره عظیمی از گیاهان، قارچ‌ها، جلبک‌ها، جانوران و میکروارگانیسم‌ها، که همگی ذخایر عظیمی از ترکیبات فعال زیستی را در خود دارند را در اختیار داشته باشیم. امروزه ایران به عنوان یک اقلیم مهم برای مطالعات دستیابی به داروهای دارای منشاء زیستی، شناخته شده است.

ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان برای محافظت و ایمنی در برابر بسیاری از بیماری‌های مزمن مانند بیماری‌های قلبی عروقی، چاقی، دیابت، و انواع سرطان‌ها پیشنهاد شدند، که برای حفاظت از ابتلا به سرطان با رژیم ضمنی از ترکیبات شیمیایی گیاهی احتمال بروز سرطان تا ۲۰٪ کاهش پیدا می‌یابد. ترکیباتی که مسئول خاصیت دارویی هستند، معمولاً متابولیت‌های ثانویه هستند. فراورده‌های طبیعی گیاه نقش فعالی را در تولید تعداد قابل توجهی از ترکیبات دارویی در برنامه کشف داروهای ایفا می‌کنند. اخیراً در گزارشات تحقیقات اعلام شده است که ۴۹٪ از ۸۷۷ ملکول‌های کوچک که به عنوان داروهای جدید در سال‌های ۱۹۸۱ و ۲۰۰۲ معرفی شده است، یا کاملاً از محصولات طبیعی حاصل شده‌اند و یا به صورت نیمه مصنوعی و یا به طور مصنوعی بر پایه مدل‌های فراورده طبیعی تهیه می‌شوند [۱، ۲].

گیاه میخک *Dianthus spp* یکی از بزرگترین جنس‌ها از گیاهان تیره *Caryophyllaceae* می‌باشد. این جنس دارای گونه‌های متنوعی است که در طی قرن‌ها برای اهداف زینتی به کار می‌رود. به عنوان مثال *D. caryophyllu* (carnation) با گل‌های به رنگ صورتی جهت اهداف زینتی و تجاری تولید می‌شود [۳]. عصاره گیاه میخک شامل الکاوئیدها و کومارین‌ها و سیانوژن گلیکوزید نیز می‌باشد. روغن‌های جدا شده از این گیاه شامل: فنیل اتیل الکل، بنزوآت، هگزینیل، هگزینیل بنزوآت، بنزینیل بنزوآت می‌باشد. گیاه میخک دارای درصد بالایی از ترکیبات آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی می‌باشد. فلاونوئیدهای موجود در آن شامل apigenin-C-glycoside، kaempferol و غیره می‌باشد. از ویژگی‌های بارز این گیاه حضور ساپونین‌های تری ترپنوئیدی می‌باشد. ساپونین‌ها با ساختارهای متنوع، دارای اثرات مفید یا سمی، درچندین

فعالیت زیستی دخالت دارند. هرچند این ملکول‌ها غیر اختصاصی هستند اما فعالیت قابل توجهی را برای کنترل واکنش‌های موجود بین گیاه با موجود زنده دیگر را بر عهده دارند. محققین دیگر نقش‌های دفاعی متعددی را برای ساپونین‌ها در نظر گرفته‌اند [۴، ۵]. *F. Vaillantii*، معمولاً به عنوان "شاه تره" در طب گیاهی ایرانی شناخته شده است، دارای اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و سیتوتوکسیک می‌باشد [۶]. آنتی اکسیدان‌های اولیه الکترون یا هیدروژن خود را به رادیکال‌های آزاد می‌دهند در حالیکه آنتی اکسیدان‌های ثانویه به عنوان همیار عمل می‌کنند، یعنی از طریق دادن هیدروژن و بازیابی آنتی اکسیدان اولیه و یا جاروب کننده‌های اکسیژن و عوامل کلاته کننده نقش خود را ایفا می‌نمایند [۱]. سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی شامل عوامل آنزیمی نظیر سوپر اکسید دسموتاز کاتالاز و گلوکاتیون پراکسیداز می‌باشد. که به ترتیب رادیکال‌های سوپر اکسید و پراکسید‌های آلی و هیدروژن پر اکسید را در درون سلول‌ها خنثی می‌کند. همچنین در این سیستم عوامل غیر آنزیمی همچون ویتامین E کاروتنوئیدها و ویتامین C نیز به عنوان آنتی اکسیدان در خنثی سازی بسیاری از رادیکال‌های موجود در بدن دخالت دارند [۷]. ترکیبات فنلی گروه بزرگی از مواد طبیعی گیاهی شامل فلاونوئیدها، تانن‌ها و آنتوسیانین‌ها هستند. که معمولاً در میوه‌ها، سبزیجات، برگ‌ها، آجیل‌ها، دانه‌ها، ریشه و در سایر قسمت‌های گیاه می‌توان آنها را دید. این‌ها استفاده قابل توجهی در زمینه مواد غذایی، شیمی، داروسازی و پزشکی با توجه به طیف گسترده‌ای از اثرات مطلوب زیستی از جمله خواص آنتی اکسیدان‌دارا هستند. فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت بیولوژیک متنوع این ترکیبات از جمله آنتی اکسیدانی، آنتی میکروبی، ضد التهاب دارند. [۸، ۹].

هدف از انجام این پژوهش، مقایسه میزان فلاونوئید و فنل تام و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی، آبی، اتانولی دو گیاه میخک و شاه تره و انجام روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و مایع با کارایی بالا با هدف جداسازی ترکیبات فنولی موجود در این دو گیاه می‌باشد. تا کنون مطالعه‌ای مبنی بر مقایسه ترکیبات ثانویه این دو گونه گیاهی صورت نگرفته است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱ - تهیه نمونه

گیاهان مورد آزمایش (*Dianthus Caryophyllaceae*، *Fumaria vaillantii*)، از باغ گیاهان دارویی تهران تهیه و ابتدا ساقه های این گیاهان با استفاده از آسیاب خرد شده اند. نمونه های مورد استفاده برای آزمایش های مرحله استخراج دارای اندازه ذرات بین صفر تا 2nm شدند. نمونه ها تا زمان آزمایش در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت های مرک و سیگما تهیه شده بودند.

۲-۲ - استخراج ترکیبات موثره با دو روش

مختلف عصاره گیری

در روش امواج فراصوت جهت عصاره گیری، ۱۰۰ میلی گرم اندام هوایی نمونه های مختلف در ۱۰ میلی لیتر (متانول ۸۰٪، اتانول ۷۰٪، آب) با استفاده از امواج فراصوت تولید شده توسط دستگاه Ultrasonic با قدرت 40kHz به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 40°C عصاره گیری شد [۵].

۲-۳ - سنجش ترکیبات فنلی کل

محتوای فنلی تام بر اساس روش رنگ سنجی Folin-ciocalteau با استفاده از گالیک اسید به عنوان استاندارد اندازه گیری شد. روش فولین سیوکالتو از متداول ترین روش های اندازه گیری ترکیبات فنلی می باشد. اساس کار در این روش، احیاء معرف فولین سیوکالتو توسط ترکیبات فنلی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج 750 نانومتر نشان می دهد. برای رسم منحنی از گالیک اسید استاندارد بر حسب mg/g DW محاسبه شد [۱۰].

۲-۴ - اندازه گیری محتوای فلاونوئید کل

محتوای فلاونوئید کل به روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم با استفاده از کوثرستین به عنوان استاندارد اندازه گیری شد. میزان جذب نوری آنها در طول موج 414nm خوانده شده و منحنی استاندارد رسم گردید.

۲-۵ - ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدان به وسیله

دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)

دی فنیل پیکریل هیدرازیل از رادیکال های آزاد پایدار است. در این روش توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط عصاره های موجود، از روی میزان تغییر رنگ محلول ارغوانی به محلول زرد رنگ سنجیده شد. مقادیر مختلفی از عصاره ها (0/1-10μL) را با متانل مطلق به حجم 2ml رسانده شد. پس از افزودن 1ml محلول ۰/۰۰۴٪ DPPH، مخلوط به خوبی تکان داده شد و به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق در تاریکی نگهداری گردید. سپس جذب نمونه ها در ۵۱۷nm خوانده شده است. و با جایگزین کردن در فرمول زیر درصد رادیکال های آزاد پاکسازی شده (RSA٪) محاسبه گردیده است. متانل مطلق برای صفر کردن دستگاه و نمونه حاوی ۲ میلی متر متانل مطلق و ۱ میلی متر DPPH به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

در این رابطه:

$$\%RSA = ((A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}) \times 100$$

A_{sample} میزان جذب نمونه، A_{control} میزان جذب شاهد در طول موج ۵۱۷nm و RSA میزان فعالیت به دام اندازی رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل است. به جهت بررسی بهتر فعالیت آنتی اکسیدانی، از فاکتور IC 50 استفاده شد که بیانگر غلظتی از عصاره است که قادر است به کاهش غلظت رادیکال آزاد DPPH اولیه به میزان 50٪ مقدار اولیه است و هرچه مقدار آن کمتر بوده باشد نشان دهنده میزان فعالیت بیشتر آنتی اکسیدانی است. همچنین IC 50 برای تفسیر بهتر نتایج حاصل از این روش به عنوان غلظت موثر (Efficient Concentration) کار برده شد [۱].

۲-۶ - اندازه گیری توان آنتی اکسیدانی احیاء

آهن (FRAP)

در این روش توانایی عصاره ها در احیای یونهای فریک (Fe^{3+}) در حضور آنتی اکسیدانها اندازه گیری می شود. با احیای یون های فریک (Fe^{3+}) و تبدیل آن به یونهای فرو (Fe^{2+}) در pH اسیدی و در حضور TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine)، کمپلکس TPTZ-Fe تشکیل می شود که رنگ آن

آبی است. پس از آن سنجش نوری در 593nm اندازه گیری می شود.

۷-۲- اندازه گیری ظرفیت تام آنتی اکسیدانی

براساس روش FRAP

مقدار 1/5 ml از معرف FRAP به هر یک از لوله های آزمایش افزوده و مقدار 50 µl از نمونه و یا استاندارد سولفات آهن با غلظت 1 Mm (برای رسم منحنی استاندارد 5-2) به لوله های مذکور اضافه و کاملاً ورتکس گردید. جذب نوری نمونه ها در طول موج 593nm در مقابل بلانک غلظت صفر استاندارد (1/5ml محلول FRAP و 50ml آب مقطر) اندازه گیری شد.

۸-۲- کروماتوگرافی لایه نازک برای تایید اثر

آنتی اکسیدانی

فعالیت مهارکنندگی عصاره های حاصل با استفاده از محلول DPPH و کروماتوگرافی لایه نازک TLC و مورد بررسی قرار گرفت. 8µl محلول های متانلی استاندارد ها، و 8µl از عصاره های متانولی و اتانولی و آبی حاصل از گیاهان شاهره و میخک را روی کاغذ سیلیکاژل TLC Silica gel 60, 25 Aluminium sheets 20 x 20 cm به فاصله ی یک و نیم سانت از یکدیگر لکه گذاری میکنیم. حلالی را که از قبل با نسبت های (۱:۱:۲) از آب، استیک اسید، n بوتانول تهیه کردیم را در تانک TLC میریزیم و در آن را قرار داده و زمان میدهم تا تانک از حلال کاملاً اشباع گردد. بعد از بارگذاری لکه ها کاغذ را درون تانک قرار دادیم و تا زمانی که حلال به انتهای کاغذ برسد این کار را ادامه دادیم سپس کاغذ را خارج کرده و در دمای اتاق قرار داده شده تا خشک شود.

سپس صفحه سیلیکاژل TLC که خشک شده را با محلول متانولی DPPH 0.4٪ اسپری میکنند. استانداردهای استفاده شده شامل: گالیک اسید، تانیک اسید، 4 هیدروکسی 3 و 5 دی متوکسی بنزوئیک اسید، سینامیک اسید، 4 هیدروکسی سینامیک اسید، کوماریک اسید، وانیلیک اسید، بود. لکه ها با استفاده از محلول متانولی DPPH مشاهده و Rf آن از رابطه زیر محاسبه گردید [۱۱].

۹-۲- کروماتوگرافی با کارایی بالا برای تعیین

ترکیبات فنلی (HPLC)

در جهت تعیین ترکیبات فنلی روش کروماتوگرافی (HPLC) انجام شد. استاندارد هایی که ما در این پژوهش از آنها استفاده کردیم شامل: گالیک اسید، وانیلیک اسید، کوماریک اسید، 4 هیدروکسی 3 و 5 دی متوکسی بنزوئیک اسید، 4 کلرو بنزوئیک اسید، 4 هیدروکسی بنزوئیک اسید، 4 هیدروکسی سینامیک اسید، رزمارینیک اسید، سینامیک اسید 400 میلی گرم از دو گیاه میخک و شاه تره با 20 میلی لیتر حلال متانول 80٪ به مدت نود دقیقه در بن ماری با دمای 70 درجه قرار داده شده و عصاره گیری کامل شده است. در روش (UAE)، 20 ml حلال متانول 80٪ به 400 میلی گرم نمونه افزوده و مخلوط حاصل در حمام اولتراسونیک به مدت 20 دقیقه استخراج شد این عمل دو بار در دمای اتاق انجام و نمونه ها برای 10 دقیقه 3000g سانتریفیوژ شدند. متانل نمونه ها در دمای اتاق تبخیر شد و به باقی مانده نمونه در سه مرحله اتیل استات افزوده شد. پس فاز رویی را که اتیل استات بود برداشته و خشک گردید. سپس 10 mg از نمونه در 2 ml استونیتریل حل شد. به عنوان فاز متحرک از مخلوط آب، استونیتریل و استیک اسید به نسبت (67٪، 32٪، 1٪) (روش گرادینت) با سرعت جریان 1 min/ml استفاده شد. برای شست و شوی دستگاه از دو روش شامل: در مرحله اول آب و استونیتریل با نسبت 50:50 و در روش دوم فقط از استونیتریل استفاده شد. حجم نمونه تزریق شده در هر بار تزریق 30 µl بود و برای هر نمونه سه بار تکرار انجام شد. مدت زمان انجام آزمایش برای هر تزریق 10 دقیقه به طول انجامید [۱۱].

۱۰-۲- آنالیز آماری

تمام آزمایش های انجام شده در این پژوهش براساس طرح آماری بلوک های کاملاً تصادفی در 3 تکرار طراحی شده اند. بعد از انجام هر سنجش داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS version 17 در سطح احتمال $P < 0/05$ تجزیه و تحلیل شدند. براساس نوع عوامل مورد آزمایش به کمک تجزیه واریانس یک طرفه برای طرح یک عامل (ANOVA) و تجزیه واریانس دو طرفه برای طرح های دو یا چند عاملی میانگین ها مقایسه و معنی دار بودن اختلاف بین میانگین ها تعیین گردید. و داده ها به کمک آزمون چند دامنه ای دانکن گروه بندی شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مقایسه محتوای ترکیبات فنلی

نتایج حاصله از بررسی میزان ترکیبات فنلی عصاره های حاصل از دو گیاه میخک و شاهتره در حلال های آبی، متانولی، اتانولی که با دو روش استخراج استفاده از امواج فراصوت، و خیساندن عصاره گیری شده بودند نشان داد که در روش استخراج استفاده از امواج فراصوت، بیشترین و کمترین محتوای ترکیبات فنلی در عصاره حاصل از گیاه شاهتره در حلال متانولی و گیاه میخک در

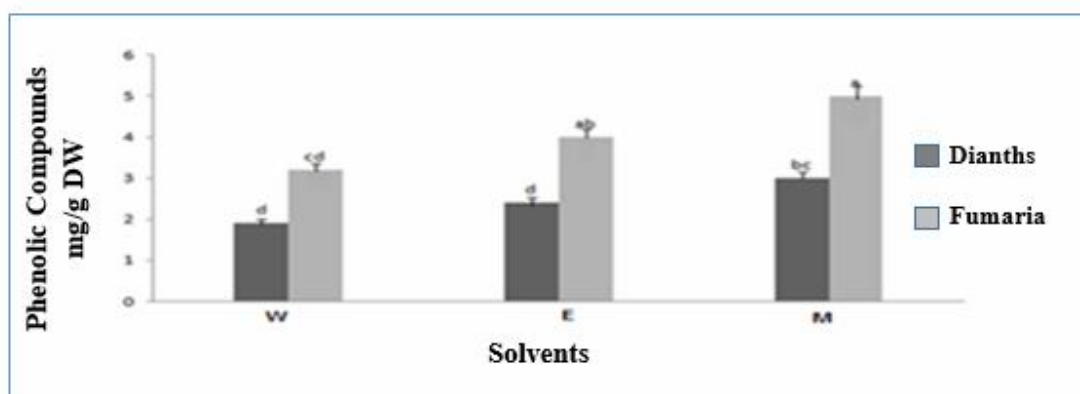


Fig 1 The amount of phenolic compounds in the extracts obtained by ultrasonic method (W: water, M: methanol, E: ethanol).

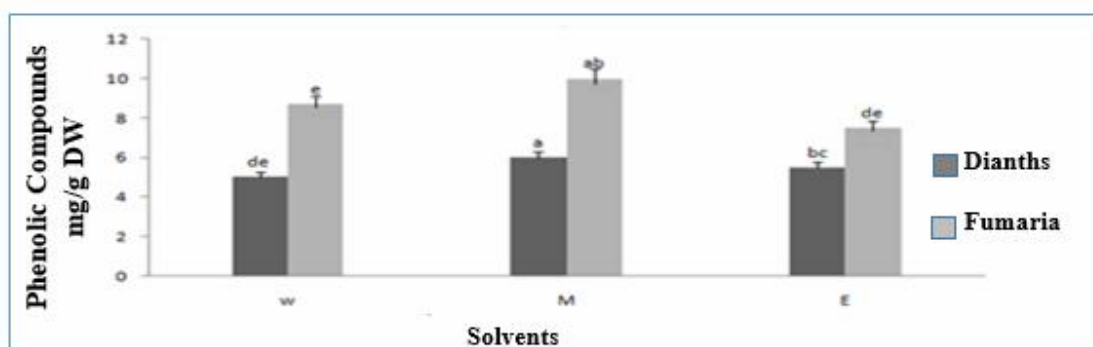


Fig 2 The amount of phenolic compounds in the extracts obtained by Maceration method (W: water, M: methanol, E: ethanol).

حلال آبی به ترتیب به میزان 1.19 ± 0.05 mg/g و 0.1 ± 0.05 DW به دست آمد که تفاوت معنی داری را در سطح $P < 0.05$ نشان داد. در حالی که در روش خیساندن بیشترین و کمترین محتوای ترکیبات فنولی در عصاره حاصل از گیاه شاهتره در حلال متانولی و عصاره حاصل از گیاه میخک در حلال آبی به میزان 0.51 ± 0.02 mg/g DW و 0.14 ± 0.10 mg/g DW اندازه گیری شد که تفاوت معنی داری را در سطح $P < 0.05$ نشان داد. (شکل ۲).

۳-۲- مقایسه محتوای ترکیبات فلاونوئیدی

میزان ترکیبات فلاونوئیدی عصاره های حاصل از دو گیاه شاه تره و میخک در حلال های آبی، اتانولی، متانولی، که با دو روش استخراج استفاده از امواج فراصوت و خیساندن عصاره گیری شده بودند نشان داد که در روش استخراج استفاده از امواج فراصوت، بیشتر ترین و کم ترین محتوای ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره حاصل از گیاه شاهتره در حلال اتانولی و در عصاره

حاصل از گیاه میخک در حلال آب به ترتیب به میزان 0.3 ± 0.01 DW، 0.12 ± 0.03 به دست آمد که تفاوت معنی داری را در سطح احتمال $P < 0.05$ نشان داد. در حالی که در روش خیساندن بیش ترین و کم ترین محتوای ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره حاصل از گیاه شاه تره در حلال متانول و حلال آبی به ترتیب به میزان 0.14 ± 0.06 mg/g DW و 0.2 ± 0.03 mg/g DW اندازه گیری شد که تفاوت معنی داری را در سطح $P < 0.05$ نشان

متقابل روش عصاره گیری و نوع حلال در سنجش ترکیبات فنلی تفاوت معنی داری را در مقدار محتوای ترکیبات موثره در سطح $P < 0.05$ از خود نشان دادند.

داد (شکل ۳ و ۴).

مقایسه میانگین های محتوای ترکیبات موثره در دو گیاه شاه تره و میخک، با سه حلال مختلف و همچنین نوع گیاه هم اثرات

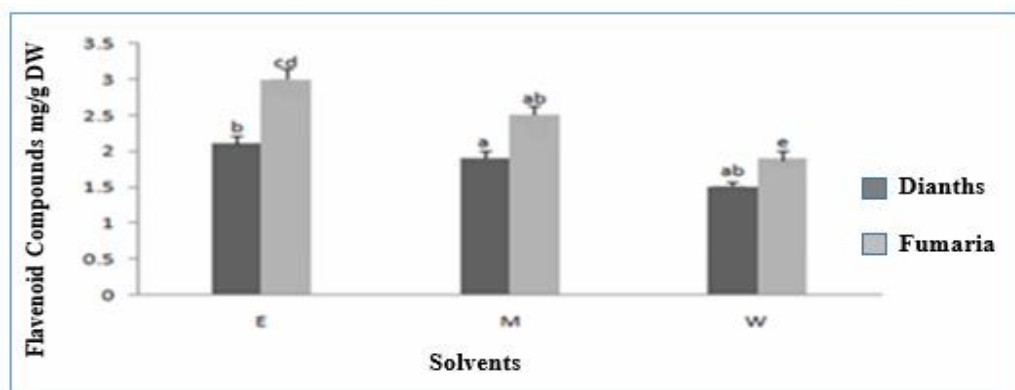


Fig 3 The amount of flavenoid compounds in the extracts obtained by ultrasonic method (W: water, M: methanol, E: ethanol).

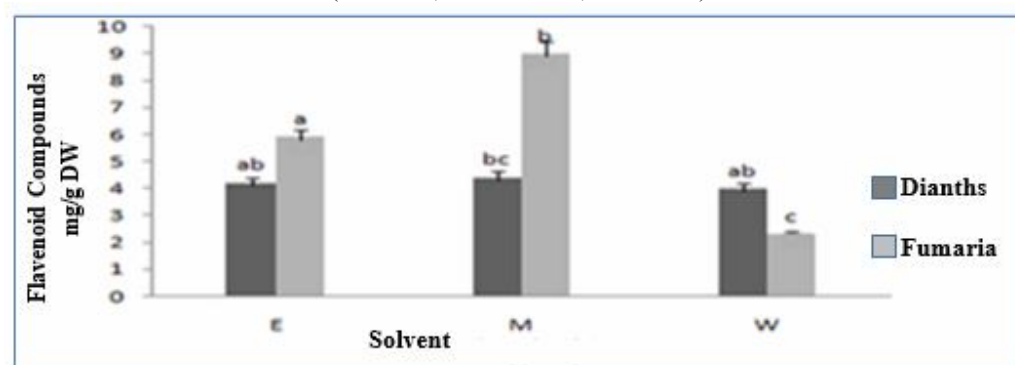


Fig 4 The amount of flavenoid compounds in the extracts obtained by Maceration method (W: water, M: methanol, E: ethanol).

همچنین فلاونوئیدی واکنش میدهد و به شکل غیر رادیکالی خود تبدیل خواهد شد. در نهایت مقدار آن کاهش پیدا میکند و رنگ بنفش تیره به زرد روشن تبدیل خواهد شد. در نتیجه میزان جذب در طول موج ۵۱۷-۵۱۰ نانومتر کاهش می یابد. بنابراین هرچه مقدار جذب DPPH باقیمانده در نمونه های شکل ۵ بیشتر باشد فعالیت آنتی اکسیدانی آن ها در حذف رادیکال های آزاد کمتر بوده است. نتایج نشان داد که در روش استخراج استفاده شده از امواج فراصوت، بیشترین و کم ترین فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره حاصل از گیاه شاهتره در حلال متانولی و گیاه میخک در حلال آب بوده است که به ترتیب به میزان $(IC_{50} = 0.5 \pm 0.05, 1.4 \pm 0.12 \mu g/ml)$ به دست آمد که تفاوت معنی داری را در سطح $P < 0.05$ نشان داد. در حالی که در روش خیساندن بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنتی

اثر متقابل روش عصاره گیری و نوع گیاه در محتوای ترکیبات فلاونوئیدی و فنولی تفاوت معناداری را نشان نداد.

۳-۳- مقایسه خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده از *Dianthus caryophyllus* و *Fumaria vaillanti* حاصل از دو روش مختلف

الف- روش DPPH: میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های گیاهان *Dianthus caryophyllus* و *Fumaria vaillanti* حاصل از دو روش مختلف عصاره گیری نسبت به آسکوربیک اسید و گالیک اسید به عنوان شاهد در شکل ۵ نشان داده شده است. در این آزمون، محلول متانولی DPPH با آنتی اکسیدان ها یا سایر رادیکال های دهنده پروتون مانند ترکیبات فنلی و

(شکل ۵-۷). در تمام عصاره های حاصل از دو روش استخراج، استفاده از امواج فراصوت و خیساندن، پتانسیل آنتی اکسیدانی با افزایش غلظت عصاره و یا به عبارتی با افزایش ماده موثره موجود در محلول واکنش افزایش پیدا کرده است.

اکسیدانی در عصاره حاصل از گیاه شاهتره در حلال متانولی و گیاه میخک در حلال آبی به ترتیب به میزان $IC_{50} = 0.4 \pm 0.14$, $0.61 \pm 0.14 \mu g/ml$ اندازه گیری شد که تفاوت معنی داری را در سطح $P < 0.05$ نشان داد

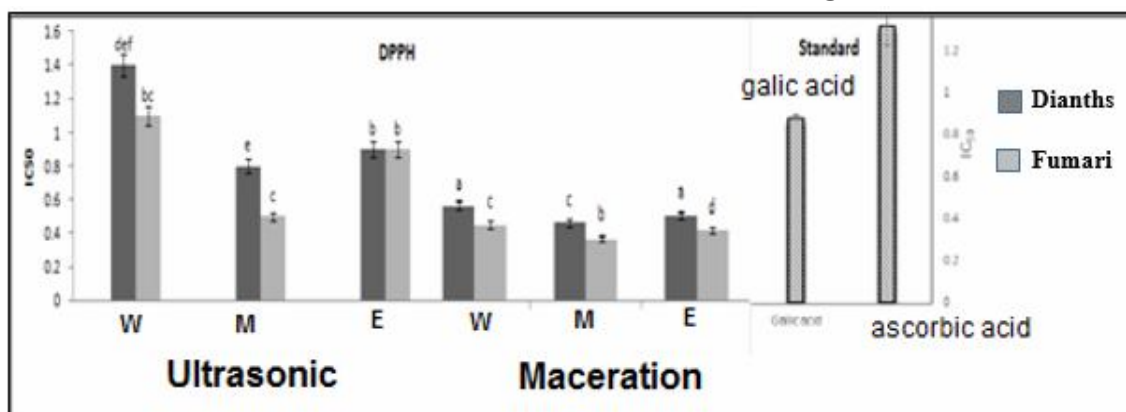


Fig 5 Comparison of antioxidant effect of different extracts with two methods of extraction ultrasonic and Maceration by DPPH assay (W: water, M: methanol, E: ethanol)

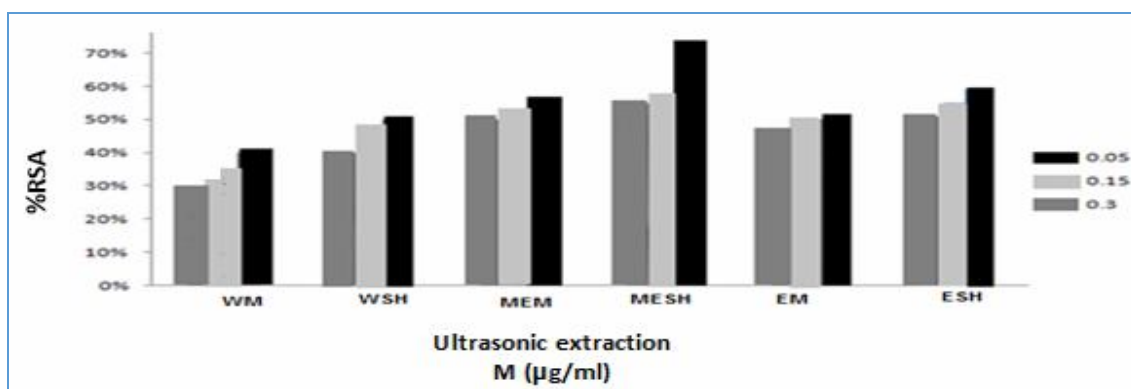


Fig 6 Comparison of free radical scavenging effect of DPPH in different concentrations of *Fumaria vaillantii* and *Dianthus caryophyllus* by ultrasonic method (M: *Dianthus caryophyllus*, SH: *Fumaria vaillantii*, W: water, E: ethanol, ME: methanol)

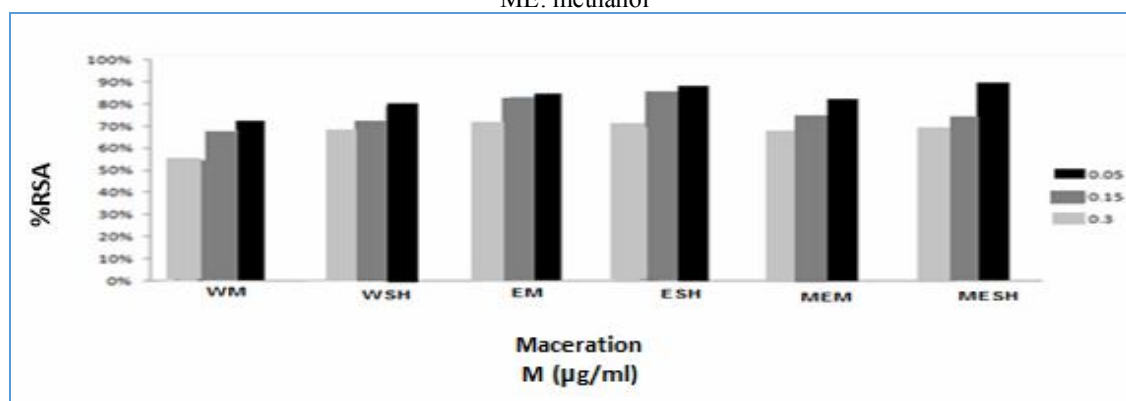


Fig 7 Comparison of free radical scavenging effect of DPPH in different concentrations of *Fumaria vaillantii* and *Dianthus caryophyllus* by Maceration method (M: *Dianthus caryophyllus*, SH: *Fumaria vaillantii*, W: water, E: ethanol, ME: methanol)

۳-۴- مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها به وسیله اندازه گیری توان آنتی اکسیدانی احیاء آهن (FRAP)

میزان فعالیت عصاره های حاصل از دو گیاه *Fumaria vaillant* و *Dianthus caryophyllus* در حلال های آب، متانولی، اتانولی، که با دو روش استخراج استفاده از امواج فراصوت و خیساندن عصاره گیری نشان داد که در روش استخراج استفاده شده از امواج فراصوت، بیشترین و

کم ترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره حاصل از گیاه شاهتره در حلال اتانولی و عصاره حاصل از گیاه میخک در حلال آبی بوده است که به ترتیب به میزان (2.1 ± 0.1 , 3.9 ± 0.05 mM) به دست آمد که تفاوت معنی داری را در سطح $P < 0.05$ نشان داد. در حالی که در روش خیساندن بیشترین و کم ترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره حاصل از گیاه شاهتره در حلال متانولی و حلال آبی بوده است که به ترتیب به میزان (6.9 ± 0.1 , 3.3 ± 0.07 mM) اندازه گیری شد که تفاوت معنی داری را در سطح $P < 0.05$ نشان داد (شکل ۹).

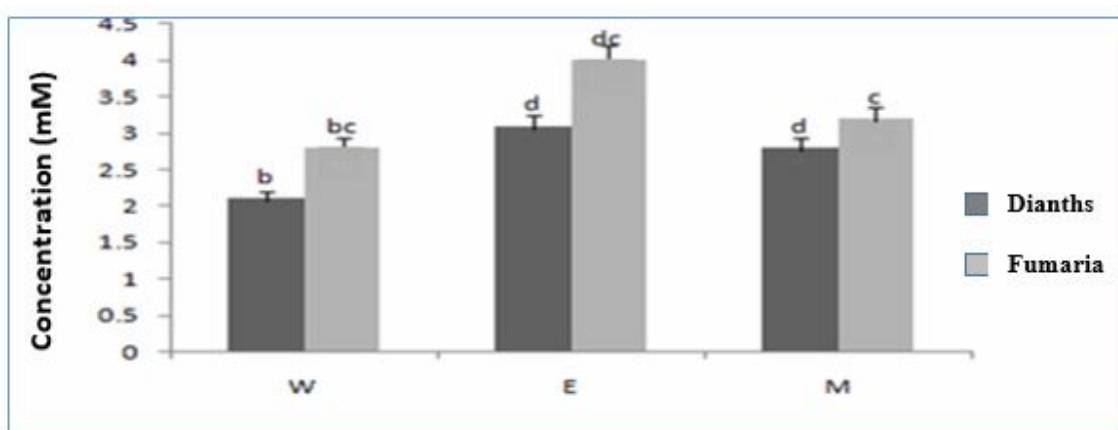


Fig 8 Antioxidant activity of extracts obtained by ultrasonic method by FRAP assay (W: water, M: methanol, E: ethanol)

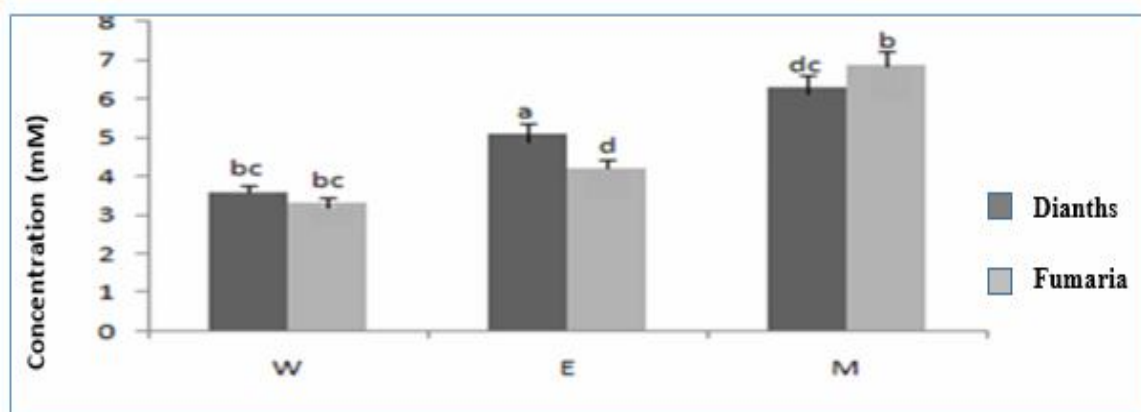


Fig 9 Antioxidant activity of extracts obtained by Maceration method by FRAP assay (W: water, M: methanol, E: ethanol)

معنا داری را بین دو گیاه و حلال های مختلف و روش های مختلف عصاره گیری نشان داد. تجزیه و تحلیل داده های موجود از طریق واریانس دوطرفه نشان داد که نوع گیاه و حلال های مختلف ب روی میزان میانگین فعالیت آنتی اکسیدانی به روش

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی در دو گیاه شاهتره و میخک با دو روش مختلف عصاره گیری سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی که هر یک در ارتباط با یکی از خصوصیات و ویژگی های و یا با در نظر گرفتن برخی ترکیبات خاص عصاره ها اجرا شده بود تفاوت

مهار رادیکال های آزاد توسط برخی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی به عنوان مواد آنتی اکسیدانی بود که به طور مستقیم بر روی صفحات TLC انجام گرفت. کروماتوگرام عصاره های حاصل از روش استفاده از امواج فراصوت و خیساندن بعد از اسپری با معرف DPPH در شکل زیر آمده است. همانطور که در شکل (۱۰) نشان داده شده است گالیک اسید، ۴-هیدروکسی ۳ و ۵ دی متوکسی بنزوئیک اسید، ۴-هیدروکسی سینامیک اسید و وانیلیک اسید و سایر ترکیبات ناشناخته مسئول فعالیت آنتی اکسیدانی در شاهره و میخک هستند.

DPPH اثر معنی دار را در سطح $P < 0.05$ داشته است. درحالی که در روش قدرت احیائی کنندگی یون آهن (FRAP) نوع گیاه و حلال و روش عصاره گیری تاثیر معنا داری را در سطح $P < 0.05$ داشتند علاوه بر این تاثیر متقابل این عوامل هم معنا دار بوده است.

۳-۵- نتایج حاصل از تایید اثر آنتی اکسیدانی با کروماتوگرافی لایه نازک

هدف اصلی از این بررسی، ارزیابی سریع اندازه گیری فعالیت

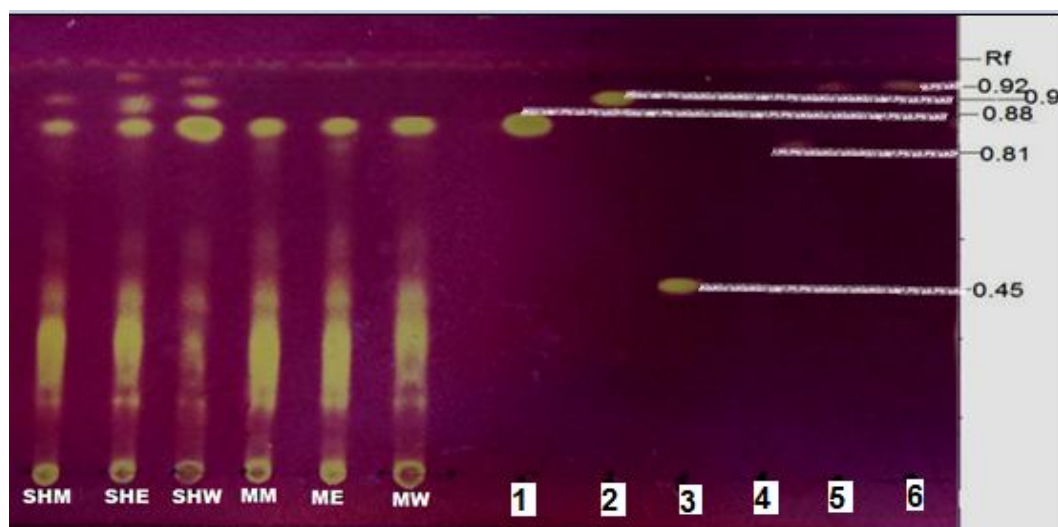


Fig 10 Chromatogram obtained from one-dimensional thin layer chromatography of extracts of two plants (M: *Dianthus caryophyllus*, SH: *Fumaria vaillantii*) in three different solvents (W: water, E: ethanol, M: methanol (by Maceration method): Gallic acid, 2: 4 hydroxy 3 and 5 dimethoxy benzoic acid, 3: cinnamic acid, 4: coumaric acid, 5: vanillic acid, 6: 4 hydroxy cinnamic acid using a solvent system consisting of acetic acid and n butanol and water in ratios (v / v 1: 2: 1) as mobile phase and fixed phase of 60HF254 silica gel and detection with 0.4% DPPH solution.

در زمان (RT=1:6 min)، ۴ هیدروکسی سینامیک اسید در زمان (RT=2:2 min) و گالیک اسید در زمان (RT=1:8 min) عصاره متانولی حاصل از روش عصاره گیری خیساندن بود. به طوری که تشخیص پیک های کروماتوگرام نمونه ها از طریق زمان بازداری آنها مشابه با زمان بازداری استانداردها بود و همچنین از طریق طول موج و UV (که لکه های ظاهر شده در نمونه مشابه با لکه های ظاهر شده در استاندارد ها بود انجام شد (شکل ۱۱ و ۱۲).

۳-۶- کروماتوگرافی با کارایی بالا برای تعیین ترکیبات فنولی (HPLC)

نتایج حاصل از HPLC نشان داد عصاره گیاه شاه تره دارای ترکیبات فنلی مانند ۴ هیدروکلرو بنزوئیک اسید در زمان (RT:1:2min)، ۴ هیدروکسی سینامیک اسید در زمان (RT:2:3min)، سینامیک اسید در زمان (RT=4min) و گیاه میخک دارای ترکیبات فنلی ۴ هیدروکلرو بنزوئیک اسید

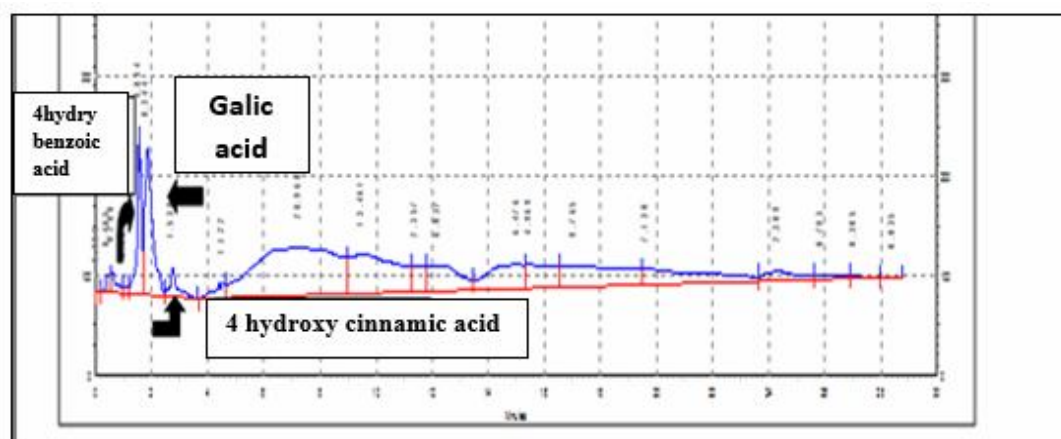


Fig 11 HPLC chromatogram of *Dianthus caryophyllus* in methanol solvent by Maceration method. 4 hydroxybenzoic acid (RT = 1: 6 min), gallic acid (RT = 1: 8 min), 4 hydroxy cinnamic acid (RT = 2: 2min)

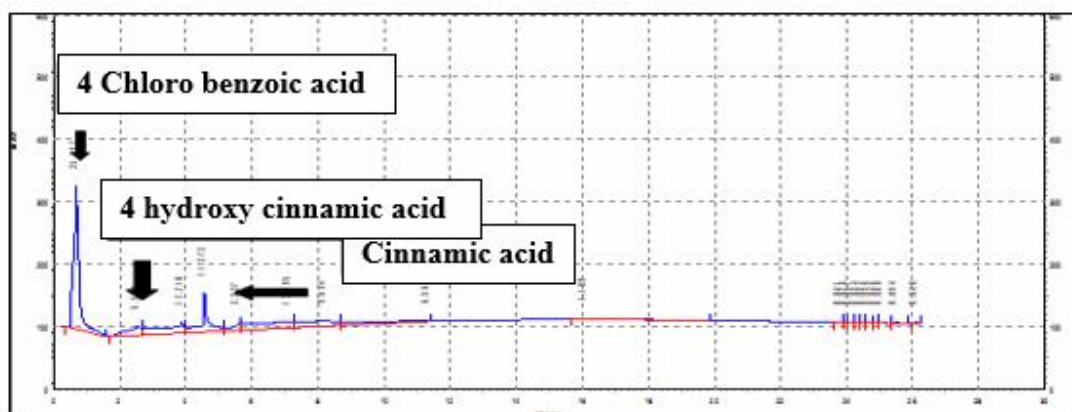


Fig 12 HPLC chromatogram of *Fumaria vaillantii* in methanol solvent by Maceration method. 4 chlorobenzoic acid (RT = 1: 2 min), 4 hydroxycinnamic acid (RT = 2: 3min), cinnamic acid (RT = 4min)

Table 1 The amount of compounds in two plants (M: *Dianthus caryophyllus*, SH: *Fumaria vaillantii*) by Maceration and HPLC method

4 Chloro benzoic acid mg/g DW	4 hydroxy benzoic acid mg/g DW	4 hydroxy cinnamic acid mg/g DW	Cinnamic acid mg/g DW	Galic acid mg/g DW	Phenolic Compound
0/1126	-	0/015	0/0044	-	SH-
-	0/0048	0/0058	-	0/006	M-

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که حلال ها با ترکیب شیمیایی و درجه قطبیت متفاوت توانایی استخراج ترکیبات مختلفی از گیاه را دارند که روی خواص آن تاثیر گذار است. کارایی استخراج ترکیبات فنلی توسط حلال های قطبی به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافته است. نتایج به دست آمده در مطالعه Sun و همکاران (۲۰۱۰)، در استخراج ترکیبات فنلی از سبوس جو نتایج نشان داد که محتوای

۴- نتیجه گیری

در این تحقیق برای افزایش کیفیت استخراج و جداسازی متابولیت های گیاهان شاهتره (*Fumaria vaillantii*) و میخک (*Dianthus caryophyllus*) شامل ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی از سه حلال مختلف (آب، اتانول ۷۰٪، متانول ۸۰٪) با درجه قطبیت متفاوت استفاده شد.

ترکیبات فنلی استخراج شده توسط حلال متانول حدود ۳ برابر بالاتر از حلال استن و ۴ برابر بیشتر از حلال هگزان بوده است [۱۲].

در پژوهش‌های مربوط به کمالی روستا و همکاران (۲۰۱۰) بازده استخراج عصاره دارچین توسط حلال متانول نیز در هر دو روش حلال سرد و سوکسله بالاتر از حلال استون تعیین شد. در مقایسه کلی بین دو حلال و دو روش استخراج، عصاره متانولی حاصل شده توسط روش سوکسله بیشترین راندمان استخراج را داشت [۱۳].

استخراج با آب مقدار پایین تری از ترکیبات فنولیک قابل استخراج را نسبت به حلال اتانول ۸۰ درصد و متانول ۸۰ درصد به همراه داشت. آب بیشترین ثابت دی الکتریک را نسبت به حلالهای معمول دارد اگرچه فاکتور اتلاف آب از حلالهای دیگر پایین تر است. بنابراین میزان جذب مایکروویو برای آب بیشتر از حلالهای متانول و اتانول میباشد اما ضریب حرارت دهی کلی برای هر دو حلال بیشتر از آب میباشد بنابراین میزان استخراج ترکیبات فنولیک توسط حلال آب کمتر میباشد [۱۴].

در این مطالعه پوست سیب زمینی راموس به عنوان یک منبع طبیعی ترکیبات فنولیک مورد ارزیابی قرار گرفت. از میان حلال های مورد استفاده حلال متانول با داشتن راندمان بالا و نیز بیشترین میزان ترکیبات فنولیک به عنوان مناسبترین حلال در نظر گرفته شد. از میان حلال های مورد استفاده حلال متانول با داشتن راندمان بالا و نیز بیشترین میزان ترکیبات فنولیک به عنوان مناسب ترین حلال در نظر گرفته شد [۱۴].

در پژوهشی Csiktusndi و همکاران (۲۰۰۰) محتوای ترکیبات فنولی توسط حلال ها با قطبیت بیشتر به طور معناداری بالاتر از حلال های غیر قطبی بود. سیستم حلال متانول ۸۰٪ بیشترین محتوای فنولی را در بر داشت و با این واقعیت که حلال های قطبی به دلیل داشتن ثابت دی الکتریک بالا مطلوب تر هستند جهت استخراج منطبق بود. یک مطالعه مقایسه ای نشان داد که استفاده از امواج فراصوت باعث تخریب کمتر و استخراج سریع تر ترکیبات فنلی از توت فرنگی در مقایسه با دیگر روش های استخراج مثل جامد-مایع، آب فوق بحرانی و روش ماکروویو می شود [۱۵].

در این پژوهش، روش امواج فراصوت در مقایسه با روش های

ستی عصاره گیری مانند خیساندن، هیچ تفاوت معنی داری در استخراج ترکیبات موثره از گیاهان شاه تره (*Fumaria vaillanti*) و میخک (*Dianthus caryophyllus*) نداشت. گیاهان دارویی حاوی ترکیبات ثانویه وسیعی هستند که اغلب دارای فعالیت زیستی مهمی هستند و از آنجاییکه عصاره های گیاهی به طور وسیعی در صنایع دارویی، غذایی و بهداشتی مورد استفاده قرار می گیرند، فناوریهای عصاره گیری مورد ارزیابی قرار گرفته تا بتوانند این ترکیبات فعال را از منابع گیاهی استخراج نمایند. روشهای سنتی مانند روش سوکسله که سالها مورد استفاده قرار می گرفته است، بسیار زمان بر بوده و مقدار زیادی حلال مصرف میکند [۱۶].

به همین دلیل تقاضای زیادی برای روشهای عصاره گیری جدیدی با زمان کوتاهتر، میزان مصرف حلال کمتر و محافظ محیط زیست وجود دارد. روشهای جدید عصاره گیری مانند عصاره گیری همراه با امواج فراصوت عصاره گیری همراه با امواج مایکروویو برای استخراج ترکیب های موثر از گیاهان بسیار سریع و موثر عمل می کنند. این روشهای جدید، پیشرفت زیادی داشته اند و برخی موارد استفاده از آنها در استخراج مواد گیاهی گزارش شده اند [۱۷، ۱۸].

احتمال داده می شود یکی از دلایل افزایش مقدار ترکیبات فنلی در اثر حرارت دهی عصاره تجزیه پلی فنل های سنگین وزن با انواع وزن ملکولی کمتر باشد. افزایش دما استخراج با حلال را از طریق افزایش در ضریب انتشار و هم از طریق افزایش حلالیت ترکیبات فنولی بهبود میدهد. جلالی و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نمودند که افزایش دمای استخراج میزان ترکیبات فنولی استخراج شده را از برگ های انجیر افزایش داده است. بیشترین ترکیبات فنولی در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد مشاهده شدند افزایش دمای گرمخانه میزان استخراج ترکیبات فنولی را به دلیل تضعیف یکپارچگی دیواره سلولی بهبود میدهد [۱۹].

برخلاف شیوه های مرسوم امواج صوتی باعث تخریب دیواره سلولی در یک مدت زمان کوتاه شده و عصاره گیاهی در طول دیواره سلولی انتشار می یابد. مشخصات گیاهی مثل میزان رطوبت، اندازه ذرات، و نوع حلال مورد استفاده به منظور به دست آوردن استخراج کارآمد و موثر مهم هستند. به علاوه فاکتورهای زیادی مثل فرکانس، فشار، دما و زمان، کارکرد امواج صوتی را

تحت تاثیر قرار میدهند [۲۰].

در تحقیقی بر روی گیاه سرخارگل برای اندازه گیری ترکیبات فنلی با روش های استخراج روش های خیساندن، سونیکاسیون، پرکوالسیون، استخراج گرم و با دستگاه سوکسله انجام شد نشان داد که بهترین روش برای استخراج ترکیبات فنلی استفاده از روش استخراج گرم و استفاده از دستگاه سوکسله کمترین کارایی را داشت که نمایانگر آن است که در روش سوکسله، دمای بالا منجر به تخریب برخی ترکیبات فنلی می شود [۲۱].

نتایج به دست آمده از استخراج ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی گیاهان شاهتره (*Fumaria vaillanti*) و میخک (*Dianthus caryophyllus*) با استفاده از روش های مختلف عصاره گیری با حلال متانولی نشان داد که روش استخراج خیساندن نسبت به سایر روش ها برتری داشت. مقایسه نتایج میزان آنتی اکسیدان و مقادیر فنل کل در روشهای عصاره گیری (خیساندن) مورد مطالعه نشان میدهد در روش خیساندن به دلیل جداسازی مقادیر بیشتر ترکیبات فنلی و نقش آنتی اکسیدانی این ترکیبات میزان IC50 کمتر آن دور از انتظار نمی باشد.

هر گیاه دارای ترکیبات شیمیایی گوناگونی است که مقایسه آنها را از نظر بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی پیچیده میسازد. به همین علت فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های حاصل از حلال های مختلف و روش های مختلف گیاه شاهتره (*Fumaria vaillanti*) و میخک (*Dianthus caryophyllus*) با دو روش متفاوت بررسی گردید.

در مورد روش FRAP این سیستم به غلظت آنتی اکسیدان غیر وابسته بوده و تفاوت های مشاهده شده به فاکتورهای استکیومتری و ظرفیت آنتی اکسیدانی باز میگردد. به این دلیل که در دز پاسخ برای آنتی اکسیدانهای مختلف رفتار خطی دیده شده است یعنی ظرفیت آنتی اکسیدان غیر وابسته به غلظت می باشد.

ولی در رابطه با روش DPPH واکنش رادیکال آزاد و DPPH برگشت پذیر بوده و این قابلیت بازگشت باعث میشود که ظرفیت آنتی اکسیدانی بسیاری از آنتی اکسیدان ها معمولاً کمتر از حد مشخص بشود. پاسخ های متفاوت عصاره حاصل از یک گونه در روش های مختلف آنتی اکسیدانی می تواند به دلیل این واقعیت باشد که انتخاب الکترون و هیدروژن از آنتی اکسیدان ها

در پتانسیل های ردوکس مختلف رخ می دهد و این انتقال به ساختار آنتی اکسیدان ها نیز وابسته است [۲۲].

کامکار در سال (۲۰۱۰) گزارش کرد که در مجموع تناقص های مشاهده شده می تواند در ارتباط به تنوع ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان، مکانیسم های مختلف درگیر و کیتیک متفاوت واکنش های مهاری در روش های انتخابی باشد. همچنین ظرفیت آنتی اکسیدانی اندازه گیری شده یک نمونه در ارتباط با روش های مورد استفاده و منبع تولید رادیکال آزاد یا عامل اکسید کننده موثر هستند [۲۳].

افزون بر این ها افزایش درصد مهارکنندگی رادیکال های آزاد عصاره در اثر حرارت دهی ممکن است ناشی از باز شدن ساختار سوم پروتئین ها موجود در آن در اثر دنا توراسیون جزئی آنها باشد. به این ترتیب میزان در دسترس بودن باقیمانده های اسید آمینه ای دارای زنجیره های جانبی سولفوردار (سیستئین و متیونین) یا آروماتیک (تریپتوفان، تیروزین، فیل آلانین) که به راحتی پروتون آزاد می کنند افزایش پیدا می کند. آزاده دل و همکاران (۲۰۱۰) فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی پوست پسته را بررسی کردند این محققان افزایش درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد در عصاره متانولی نسبت به کلروفومی را به افزایش در مقدار ترکیبات فنولی در آنها نسبت دادند و بیان کردند که یک رابطه ی خطی میان مقدار کل ترکیبات فنولی و توانایی مهار کنندگی

DPPH وجود داشته است. در تمام عصاره های حاصل از دو گیاه میخک و شاه تره با سه حلال مختلف با دو روش استخراج نشان داد بیشترین میزان خاصیت آنتی اکسیدانی در روش DPPH در روش استفاده از خیساندن به دست آمد که در همان عصاره بیشترین میزان ترکیبات فنلی وجود داشت بنابراین می توان ارتباط معنی داری بین فعالیت آنتی اکسیدانی با افزایش محتوای ترکیبات فنلی برقرار نمود [۹].

اما در روش FRAP بیشترین میزان خاصیت آنتی اکسیدانی در روش استفاده از امواج فراصوت به دست آمد که در همان عصاره میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بیشتری سنجیده شده بودند. شاید در این آزمایش به دلیل ترکیبات فلاونوئیدی و فنولی که دارای گروه هیدروکسیل در ساختار خود هستند و سریعاً واکنش شرکت می کردند.

از ویژگی های بارز و اساسی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی فعالیت

میشود که با توجه به اینکه گیاهان دارویی نقش حیاتی در پیشگیری برخی بیماریها داشته و از مزایای آنها در دسترس واز نظر اقتصادی به صرفه بودن آنها میباشد شاید با بررسی های *in vivo* برای تعیین پتانسیل ترکیبات فنلی تمرکز به یک ترکیب فعال خاص موجود در گیاه شاهتره به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی بتواند جایگزین آنتی اکسیدان های مصنوعی نمود و همان طور که ملاحظه میشود دو گیاه *Dianthus caryophyllus* و *Fumaria vaillant* دارای اثرات درمانی مفیدی می باشند که می توان با بررسی این اثرات در دیگر گونه های موجود در کشور در جهت مستند سازی اثرات درمانی گیاهان بومی ایران حرکت نمود.

۵- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمامی استادان، کارکنان و دانشجویان دانشگاه الزهرا و کارکنان آزمایشگاه بیوشیمی که در انجام این تحقیق همکاری داشته اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

۶- منابع

- [1] Hanachi P, Zarringhalami R, Tamijani RR. Investigation of Antioxidant Properties of *Polygonatum orientale* Desf and *Tilia dasystyla* Extracts by Different Methods and Solvents. *Hormozgan Medical Journal*. 2019 Feb 3;22(4):e86504-.
- [2] Kaur H, et al. (2011). Cys-Gly specific dipeptidase Duglp from *S. cerevisiae* binds promiscuously to di-, tri-, and tetra-peptides: Peptide-protein interaction, homology modeling, and activity studies reveal a latent promiscuity in substrate recognition. *Biochimie* 93(2):175-186
- [3] Tutin, et al A. Cano-Ortiz, E. Bioindi, C. J. Pinto Gomes, S. Del Río González, E. Cano, 2014. Soil and Phytosociological Characterisation of Grasslands in the Mediterranean. *American Journal of Plant Sciences* 5 (21): 3213-3240
- [4] Chandra S, Rawat DS, 2015. Medicinal plants of the family Caryophyllaceae: a review of ethno-medicinal uses and pharmacological

مهار رادیکال های آزاد و خواص آنتی اکسیدانی آنهاست. که کروماتوگرافی لایه نازک ترکیبات فلاونوئیدی و اسپری صفحات با استفاده از معرف DPPH این مسئله را در مورد ترکیبات فنولی گیاه میخک و شاه تره اثبات نمود. فنول ها با فعالیت بالای آنتی اکسیدانی لکه هایی زرد رنگ را بر روی صفحه TLC ایجاد نمودند که از ترکیبات اصلی موجود در گیاه میخک میتوان به حضور گالیک اسید اشاره کرد و در مورد گیاه شاه تره حضور ترکیبات فنولی گالیک اسید و ۴ هیدروکسی سینامیک اسید و ۵-هیدروکسی ۳-دی متوکسی بنزوئیک اسید اشاره کرد که ترکیب فنولی ۴ هیدروکسی سینامیک اسید توسط تکنیک HPLC هم مشاهده شده بوده است.

Muthanna و همکاران (۲۰۰۸) توانستند که با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک و HPLC دو ترکیب تیمول و ائورثونول را در گیاه میخک بررسی و تشخیص دادند که هر دو ترکیب خاصیت ضد باکتریایی وسیعی دارند. با توجه به اینکه روش خیساندن با بن ماری نتایج بهتری از نظر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و خاصیت آنتی اکسیدانی قوی تر بود بر آن شدیم تا از عصاره حاصل از این روش عصاره گیری برای انجام تست های مراحل بعدی استفاده کنیم و به همین دلیل انجام HPLC فقط برای عصاره حاصل از روش خیساندن انجام گردید و ترکیبات فنولی همچون ۴ کلرو بنزوئیک اسید و ۴ هیدروکسی سینامیک اسید و سینامیک اسید با این روش در گیاه شاه تره شناسایی شدند و ترکیبات فنولی ۴ هیدروکسی بنزوئیک اسید و گالیک اسید و ۴ هیدروکسی سینامیک اسید هم در گیاه میخک شناسایی و بررسی شدند [۲۴].

Paltinean و همکارانش (۲۰۱۶) بر روی گیاه شاه تره تحقیقاتی را انجام دادند جهت بررسی ایزوکوئینولین الکلونید های موجود در گیاه شاه تره *FUMARIA OFFICINALIS* و نتیجه ای که به دست آوردند شامل این ترکیبات آلکالوئیدی موجود در گیاه شاهتره بود (chelidone, sanguinarine, protopine, bicuculline, cheliditrine, stylopine and hydrastin) [۲۵].

از نتایج مطالعه بررسی ترکیبات فنولی و آنتی اکسیدانی عصاره دو گیاه (*Dianthus caryophyllus*, *Fumaria vaillant*) با استفاده از روشهای TLC و HPLC انجام شده است پیشنهاد

- assessing its effect on the stability of sunflower oil. *Iranian Journal Nutrition Science & Food Technology* 6(1): 13- 22.
- [14] Proestos C, Komaitis M, 2008. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *Food Science and Technology* 41(4):652-659.
- [15] Csiktusnadi Kiss, G. A., Forgacs, E. F., Cserhati, T., Mota, T., Morais, H. & Ramos, A. 2000. Optimization of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annum* L.) powders. *Journal of Chromatography* 889: 41-49.
- [16] Luque de Castro, M.D. and Garcia-Ayuso, L.E, 1998. Soxhlet Extraction of Solid Materials: An Outdated Technique with a Promising Innovative Future. *Analytica Chimica Acta* 369: 1-10.
- [17] Vinatoru M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason Sonochem.* 8(3):303-313.
- [18] Kaufmann B, Christen P, 2002. Recent extraction techniques for natural products: microwave assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical analysis.* 13 (2) : 105-113
- [19] Jalali Jivan M, Sadeghi S, Madadlou A, Yarmand MS. 2012. Effect of heating and acidification on total phenolic content and antioxidant activity of date palm pit extract. *Journal of Food Research* 23(2): 237-248.
- [20] Wang, L. and Weller, C.L. (2006). Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants. *Trends in Food Science and Technology* 17, 300-312. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>
- [21] Hajimehdipoor H, Khanavi M, Shekarchi M, Abedi Z, Pirali Hamedani M, 2009. Investigation of the Best Method for Extraction of Phenolic Compounds from *Echinacea purpurea* L. *Journal of Medicinal Plants* 4(32): 145-152.
- [22] Fatollahi N, Ostadrahimi A, Einollah Valizadeh, 2011. Evaluation of Antioxidant Activity of Total Extract of *Onopordon leptolepis* L. in Vitro. *Depiction of Health* 2 (4): 9-15.
- [23] Kamkar A, Shariatifar N, Jamshidi AH, Mohammadian M, 2010. Study of Antioxidant Functional of the Water, Methanol, and properties. *Integrative Medicine Research* 4 (3): 123-131.
- [5] Pizzale L, Bortolomeazzi R, Vichi S, Uberegger E, Conte LS, 2002. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. onites*) extracts related to their phenolic compound content. *J Sci Food Agric* 82:1645-1651.
- [6] Srivastava S, Choudhary GP, 2014. Pharmacognostic and pharmacological study of *Fumaria vaillantii* Loisel: a review. *J Pharmacogn Phytochem* 3:194-197
- [7] Serrano F, Klann E, 2004. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev* 3(4):431-443.
- [8] Hanachi P, Salehizadeh S, Ramezani R, Zarringhalami R. Comparison of antioxidant and anti-bacterial activities of *Ocimum basilicum* and *Impatiens walleriana* and their anticancer properties on SKOV-3 cancer cell line. *Food Science and Technology.* 2020 Nov 10;17(106):95-107.
- [9] Azadedel, Sh, Hanachi, P, Saboori O. Investigation on antioxidant activity of pistachio (*pistacia vera* L) skin extraction. *Journal of Food Science & Technology* (2008-8787). 2017 May 1;14(63).
- [10] Socaci SA, Socaciu C, Mureşan C, Fărcaş A, Tofană M, Vicaş S, Pintea A, 2013. Chemometric discrimination of different tomato cultivars based on their volatile fingerprint in relation to lycopene and total phenolics content. *Phytochem. Anal.* 25:161-169.
- [11] Tomaino A, Martorana M, Arcoraci T, Monteleone D, Giovinazzo C, Saija A, 2010. Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. *Biochimie* 92(9):1115-1122. doi: 10.1016/j.biochi.2010.03.027. Epub 2010 Apr 11.
- [12] Sun, Y. L., Zhang, Q., Anastasio, C., and Sun, J, 2010. Insights into secondary organic aerosol formed via aqueous-phase reactions of phenolic compounds based on high resolution mass spectrometry, *Atmos. Chem. Phys* 10: 4809-4822.
- [13] Kamaliroosta L, Ghavami M, Gharachorloo M, Azizinezhad R, 2010. Isolation of cinnamon extract and

- International journal of phytotherapy and phytopharmacology 16(6-7):632-637. DOI: 10.1016/j.phymed.2008.12.026
- [25] Paltinean R, Toiu A, Wauters JN, Frederich M, Tits M, Angenot L, 2016. Phytochemical analysis of *Fumaria officinalis* L. *Farmacia* 64 (3): 409-413.
- Ethanol Extracts of Endemic *Cuminum cyminum* L. and *Cardaria draba* L. in the In-vitro Systems. *Ofogh-e-Danesh. Journal* 16(3): 37-45
- [24] Muthanna J M, Al-Bayati FA. Isolation and identification of antibacterial compounds from *Thymus kotschyanus* aerial parts and *Dianthus caryophyllus* flower buds *Phytomedicine*.



To investigate phenol and antioxidant properties of plant extract of *Dianthus caryophyllus* and *Fumaria vaillanti* with TLC and HPLC methods

Hanachi, P.^{1*}, Hosein poor, M.²

1. Associate Professor, Biotechnology Dep, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran Iran.

2. MSc Student, Biotechnology Dep, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran Iran.

ABSTRACT

In this study, the extracts of *Dianthus* and *fumaria* plants were studied. The total amount of flavonoids and phenolic compounds and antioxidant activities of methanolic, aqueous and ethanolic of the two extracts were studied with TLC and HPLC methods. Phenol and total flavonoids were measured and the antioxidant activities of the extracts analysed using DPPH and FRAP method. A thin-layer chromatography method and HPLC were conducted to evaluate the quality of phenolic compounds with antioxidant properties. The results showed highest amount of phenol was obtained from the plant in methanol solution and maceration method with the amount of 10 ± 0.14 mg/g DW and highest flavonoid content of the plants was in the methanolic solvent and the maceration method with the amount of 9 ± 0.6 mg/g DW ($p < 0.05$). The highest antioxidant properties was in methanolic solvents and using DPPH method with the value of $0.41 \pm 0.14 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$). Using thin-layer chromatography, glycine and 4-hydroxy-3 and 5-dimethoxy-benzoic acid, vanilic acid, 4-hydroxy cinamic acid and a number of other compounds were identified. Using high-performance chromatography, gallic acid and 4-hydroxy-cinamic acid and 4-hydroxy benzoic acid were detected. The conclusion of this study is that the antioxidant activities of plants have a direct relation with the amount of phenolic compounds and total flavonoids, However *Fumaria vaillanti* has a higher antioxidant properties compared with *Dianthus*. The natural antioxidants extracted from the medicinal plants in this research might pose an attractive alternative to synthetic antioxidants.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2019/07/22

Accepted 2020/01/13

Keywords:

Antioxidant Cancer,
Chromatography,
Dianthus L,
Flavonoids,
Fumaria officinalis,
Phenol.

DOI: 10.52547/fsct.18.116.231

*Corresponding Author E-Mail:
p.hanachi@alzahra.ac.ir