



تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن بر بازده استخراج، ترکیبات شیمیایی، محتوای فنولی و فلاونوئیدی کل و فعالیت ضد اکسایشی اسانس اندام هوایی گیاه چویر (*Ferulago angulata* Boiss)

علیرضا همتی^۱، علی گنجلو^{۲*}، کامبیز ورمیرا^۳، ماندانا بی مکر^۲

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد فناوری مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۲- دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۳- دانشیار مرکز تحقیقات روغن‌ها و چربی‌ها، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

اطلاعات مقاله

چکیده

خشک کردن یکی از متداول‌ترین و موثرترین تکنیک‌های حفظ ویژگی‌های کمی و کیفی گیاهان دارویی در مرحله پس از برداشت است. لذا در این پژوهش، اثر روش‌های مختلف خشک کردن شامل خشک کردن سایه‌ای، هوای داغ و انجمادی بر بازده استخراج، ترکیبات شیمیایی، محتوای فنولی و فلاونوئیدی کل و فعالیت ضد اکسایشی اسانس اندام هوایی چویر بررسی شد. نتایج نشان داد که نوع روش خشک کردن تاثیر چشمگیری بر ویژگی‌های مورد مطالعه دارد. کمترین ($0.89\%/w/w$) و بیشترین میزان بازده استخراج اسانس ($2.51\%/w/w$) به ترتیب برای اندام هوایی چویر خشک شده به روش سایه و انجمادی به دست آمد. ترکیبات شیمیایی شناسایی شده توسط کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی در مجموع $96.97\% - 74.74\%$ اسانس را تشکیل می‌دهند. سیکلوفنچن ($15.02\% - 21.76\%$)، ترانس- β -اوسیمین ($14.90\% - 20.10\%$)، O -سیمن ($4.48\% - 8.88\%$)، برنیل استات ($4.57\% - 7.94\%$)، β -میرسن ($2.84\% - 3.75\%$)، γ -ترپنین ($2.77\% - 4.71\%$)، ترانس-وربنول ($2.15\% - 3.29\%$)، لیمونین ($2.15\% - 2.15\%$)، β -پینن ($1.55\% - 2.58\%$) و جرماکارا-دی ($1.38\% - 3.46\%$) عمده ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در اسانس اندام هوایی چویر خشک شده به روش‌های سایه، هوای داغ و انجمادی بودند. خشک کردن انجمادی، سبب حفظ حداکثری ترکیبات شیمیایی و افزایش دما در روش هوای داغ موجب کاهش مقادیر ترکیبات شیمیایی اسانس می‌شود. محتوای ترکیبات فنولی کل اسانس اندام هوایی چویر خشک شده به روش انجمادی (188 ± 0.23 mg GAE/g)، هوای داغ 40°C (185 ± 0.31 mg GAE/g)، هوای داغ 60°C (169.56 ± 0.26 mg GAE/g) و سایه (167.03 ± 0.19 mg GAE/g) به دست آمد که تقریباً بیش از دو برابر ترکیبات فلاونوئیدی کل بود. بالاترین میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS بر اساس IC_{50} مربوط به اسانس نمونه خشک شده به روش انجمادی و به ترتیب برابر با $5/61 \pm 0.25$ mg/mL و $3/368 \pm 0.62$ mg/mL بود. به علاوه قدرت احیاء کنندگی فریک اسانس اندام هوایی چویر خشک شده به روش انجمادی در محدوده $5/923$ mM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ به دست آمد. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که روش خشک کردن انجمادی می‌تواند روشی مناسب برای خشک کردن اندام هوایی چویر باشد.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۲۲

کلمات کلیدی:

چویر،
اسانس،
خشک کردن انجمادی،
خشک کردن هوای داغ،
فعالیت زیستی.

DOI: 10.52547/fsct.18.08.10

* مسئول مکاتبات:

aganjloo@znu.ac.ir

۱- مقدمه

استفاده از متابولیت‌های زیست‌فعال با منشاء گیاهی در صنایع غذایی، دارویی، شیمیایی و آرایشی-بهداشتی به علت وجود نگرانی‌هایی بابت ایمنی ترکیبات سنتزی در حال افزایش است [۱]. روغن‌های اسانس^۱ به‌عنوان یکی از متابولیت‌های ثانویه گیاهان ترکیبات آروماتیک فراری هستند که از بخش‌های مختلف نظیر ریشه، برگ، ساقه، چوب، گل و جوانه گیاهان قابل استحصال هستند [۲]. روغن‌های اسانس علاوه بر داشتن عطر و طعم خوشایند به علت داشتن فعالیت‌های ضد التهابی، ضد سرطان‌زایی، ضد میکروبی و ضد اکسایشی در صنایع مختلف به وفور مورد استفاده قرار می‌گیرند [۳، ۴].

گیاه چویر یا چویل^۲ با نام علمی *Ferulago angulata* Boiss. (*Schlecht.*) متعلق به خانواده چتریان^۳ می‌باشد. چویر گیاهی علفی، معطر و چند ساله با ارتفاع ۶۰ الی ۱۵۰ سانتی‌متر، گل‌های کوچک زرد رنگ و برگ‌های نازک است [۵]. این گیاه متشکل از ۳۵-۴۰ گونه است که ۸ گونه از آن در ایران رشد می‌کند [۶]. گونه‌های مختلف این گیاه را می‌توان در ایران (خصوصاً استان‌های ایلام، کردستان، کرمانشاه و لرستان)، ترکیه، مقدونیه، یونان و استرالیا مشاهده نمود [۷]. از دیرباز اندام هوایی این گیاه شامل برگ، ساقه و گل‌ها به‌عنوان یک ماده معطر، آرام‌بخش، ضد انگل، ضد دیابت، ضد هموروئید و غیره کاربرد داشته است [۸، ۹]. به‌علاوه فعالیت ضد اکسایشی [۱۰، ۱۱]، ضد میکروبی و ضد باکتریایی [۹، ۱۲] اسانس این گیاه به اثبات رسیده است. استنشاق اسانس این گیاه اثرات چشم‌گیری بر بهبود و تقویت حافظه داشته است [۱۳]. از اسانس گیاه چویر به‌عنوان نگهدارنده در روغن‌ها [۱۴، ۱۵]، پنیر [۱۶] و فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان [۱۷] نیز استفاده شده است. در مطالعات پیشین وجود بتا-فلاندرن^۴، آلفا-فلاندرن^۵، آلفا-پینن^۶ و *p*-سیمن^۷ به‌عنوان ترکیبات غالب اما با نسبت‌های مختلف در اسانس این گیاه گزارش شده است [۱۸، ۱۹]. در این مطالعات وجود اختلاف در ماهیت ترکیبات شیمیایی و نسبت ترکیبات را به بخش مورد استفاده برای استخراج اسانس و مکان جغرافیایی رویش گیاه

نسبت داده‌اند. در این راستا به نقش شرایط کاشت و برداشت، زمان برداشت و فرایندهای پس از برداشت نیز به‌عنوان عوامل تاثیرگذار می‌توان اشاره نمود [۲۰].

گیاهان خصوصاً انواع دارویی و معطر را می‌توان به دو شکل تازه و یا فرآوری شده به بازار مصرف عرضه کرد. خشک کردن یکی از مهم‌ترین و متداول‌ترین مراحل آماده‌سازی پس از برداشت گیاهان دارویی بشمار می‌رود. معمولاً خشک کردن با هدف کاهش محتوای رطوبت، توقف رشد و نمو میکروارگانیسم‌ها، افزایش عمر ماندگاری، کاهش اندازه بسته‌بندی، کاهش وزن و آماده‌سازی منابع گیاهی برای انجام فرایندهای تکمیلی نظیر استخراج اسانس یا عصاره صورت می‌پذیرد [۲۱]. با وجود مزایای بسیار، خشک کردن نامناسب می‌تواند منجر به تجزیه متابولیت‌های حساس به حرارت و در نتیجه کاهش کیفیت اسانس یا عصاره استخراج شده از گیاه گردد [۲۲]. در این راستا تاکنون از تکنیک‌های مختلفی نظیر خشک کردن در سایه، آفتابی، هوای داغ، تحت خلاء، میکروویو و مادون قرمز برای خشک کردن گیاهان دارویی استفاده شده است. نتایج بسیاری از مطالعات حاکی از آن است که استفاده از تکنیک‌های مختلف خشک کردن می‌تواند تاثیرات متفاوتی بر بازده استخراج و ترکیبات شیمیایی اسانس داشته باشد به طوری که روش خشک کردن مناسب برای یک گیاه می‌تواند برای گیاه دیگر نامناسب باشد [۲۳-۲۷]. به‌عنوان مثال، قاسمی پیربلوطی و همکاران (۲۰۱۳) با مقایسه روش‌های مختلف خشک کردن (آفتابی، سایه، هوای داغ، میکروویو و انجمادی) دریافتند که با استفاده از خشک کردن در سایه می‌توان به بالاترین بازده استخراج اسانس ریحان دست یافت. به‌علاوه اینکه افزایش دما در فرایند خشک کردن منجر به کاهش میزان بازده استخراج می‌شود [۲۵]. از طرفی رحیم ملک و گلی (۲۰۱۳) گزارش کردند که بالاترین بازده استخراج اسانس از برگ‌های آویشن از طریق خشک کردن انجمادی قابل دستیابی است. این در حالی است که کیفیت اسانس برگ‌های آویشن خشک شده به‌روش میکروویو در مقایسه با سایر روش‌ها نظیر خشک کردن انجمادی، آفتابی، هوای داغ و سایه به لحاظ ترکیبات شیمیایی بالاتر بود [۲۸].

قاسمی پیربلوطی و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن بر ویژگی‌های کمی و کیفی اسانس اندام هوایی گیاه گشنیز دریافتند که بالاترین بازده استخراج اسانس

1. Essential oil
2. Chavir or Chavil
3. Apiaceae
4. β -phellandrene
5. α -phellandrene
6. α -pinene
7. *p* -cymene

یک خشک‌کن تونلی (Pejvak Pahjoo Sanat, Tehran, Iran) با دو دمای مختلف (۴۰ °C و ۶۰ °C) و سرعت هوای ۱ m/s قرار گرفت. به منظور خشک کردن انجمادی، اندام هوایی چویر به مدت ۲۴ h در دمای ۱۸- °C جهت منجمد شدن آب آزاد قرار داده شد و سپس توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی (Alpha 2-4 LD Plus, CHRIST, Osterode am Harz, Germany) به مدت ۲۴ h و در دمای ۸۰- °C و فشار خلأ برابر ۰/۰۷۵ bar خشک گردید. در نهایت، اندام‌های هوایی خشک شده به روش‌های مختلف به‌طور جداگانه و با استفاده از یک آسیاب خانگی (GOSONIC, Shenzhen, China) خرد شدند و به منظور حذف ذرات با اندازه بزرگ و دستیابی به پودری یکنواخت از الک با مش ۱۸ (۱ mm) گذارنده شدند و تا زمان استخراج اسانس درون کیسه‌های پلاستیکی در دمای ۱۸- °C نگهداری شدند. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از شرکت‌های مرک (Darmstadt, Germany) و سیگما-آلدریج (St. Louis, USA) تهیه شدند.

۲-۳- استخراج اسانس و اندازه‌گیری بازده

استخراج

استخراج اسانس از حدود ۱۰۰g پودر خشک اندام هوایی چویر با ۲۰۰ mL آب مقطر به مدت ۳ h به روش تقطیر با آب^۱ در دستگاه کلونجر انجام شد. آب‌گیری از اسانس‌ها با استفاده از سدیم سولفات (Na₂SO₄) صورت پذیرفت. اسانس‌ها تا زمان انجام آزمایش درون ظروف شیشه‌ای تیره در بسته در دمای ۴- °C نگهداری گردید [۳۱]. برای محاسبه بازده استخراج (EY) اسانس از رابطه ۱ استفاده شد:

$$\text{EY}(\%) = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad \text{رابطه ۱}$$

در این رابطه m_1 و m_2 به ترتیب نشان‌دهنده وزن پودر خشک اندام هوایی چویر بر حسب g و حجم اسانس به‌دست آمده بر حسب mL می‌باشد.

۲-۴- اندازه‌گیری چگالی نسبی و ضریب

شکست نوری اسانس

برای اندازه‌گیری چگالی نسبی ۰/۰۱ mL از اسانس با ترازوی با دقت بالا (LS120A, Precisa, Dietikon,)

در اثر استفاده از تکنیک خشک کردن انجمادی به‌دست می‌آید [۲۷]. نتایج مطالعه گائو و همکاران (۲۰۱۸) نشان داد که روش خشک کردن (هوای داغ، هوای محیط و مادون قرمز) تاثیر بسزایی بر بازده استخراج، ماهیت شیمیایی و فعالیت زیستی اسانس دانه‌های زیره دارد. آنها خشک کردن با هوای داغ در دمای ۴۰ °C را به‌عنوان بهترین روش معرفی کردند [۲۹]. لذا تعیین مناسب‌ترین روش خشک کردن به‌منظور دستیابی به بالاترین کمیت و کیفیت ترکیبات زیست‌فعال خصوصاً در گیاهان دارویی از اهمیت بسزایی برخوردار است. با توجه به اینکه تا به امروز مطالعاتی با هدف بررسی تاثیر روش خشک کردن بر کمیت و کیفیت اسانس اندام هوایی گیاه چویر در دسترس نیست لذا در این مطالعه برای اولین بار تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن شامل خشک کردن در سایه، هوای داغ با دمای ۴۰ °C و ۶۰ °C و انجمادی بر بازده استخراج، ترکیبات شیمیایی، محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل و فعالیت ضد اکسایشی اسانس اندام هوایی گیاه چویر بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع آوری و آماده‌سازی ماده اولیه

اندام هوایی گیاه چویر در مرحله گل‌دهی (خرداد- تیر سال ۱۳۹۶) از کوه‌های شهرستان دالاهو در استان کرمانشاه (۳۴ درجه و ۱۶ دقیقه عرض شمالی، ۴۶ درجه و ۱۴ دقیقه طول شرقی و در ارتفاع ۱۶۵۸ متر از سطح دریا) جمع‌آوری شد. اندام هوایی چویر پس از انتقال به آزمایشگاه و شستشو با آب مقطر به چهار بخش مجزا تقسیم و به روش‌های مختلف خشک شدند. فرایند خشک کردن نمونه‌ها تا رسیدن به محتوای رطوبت نهایی معادل ۸/۵±۰/۲ بر پایه وزن تر انجام شد. برای تعیین محتوای رطوبتی مقدار مشخصی از نمونه داخل آون با دمای ۱۰۵ °C تا زمان رسیدن به وزن ثابت قرار گرفت [۳۰].

۲-۲- خشک کردن اندام هوایی چویر

به‌منظور خشک کردن در سایه، مقدار مشخصی از اندام هوایی تازه چویر به مدت ۷ روز در معرض جریان طبیعی هوا در دمای اتاق (۲۵ ± ۳ °C) با رطوبت نسبی ۲۴-۳۰٪ قرار گرفت. جهت خشک کردن با هوای داغ، اندام هوایی گیاه چویر درون

اسانس با $800 \mu\text{L}$ از شناساگر فولین-سیکالتیو (که قبلاً با نسبت یک به ۱۰ با آب دیونیزه شده رقیق شده است) مخلوط شد و پس از افزودن 2 mL سدیم کربنات $7/5\% w/v$ حجم مخلوط با استفاده از آب مقطر به 7 mL رسانده شد. میزان جذب در طول موج 765 nm پس از دو ساعت نگهداری مخلوط در دمای اتاق و محیط تاریک با استفاده از دستگاه طیف‌سنج فرابنفش-نورمرئی (SPECORD 250, Jena, Germany) قرائت گردید [۳۵، ۳۴]. از گالیک اسید به‌عنوان استاندارد استفاده شد و به کمک آن منحنی کالیبراسیون جذب گالیک اسید رسم گردید ($Y = 0.0005X + 0.0023$; $R^2 = 0.9945$). محتوای ترکیبات فنولی کل اسانس بر اساس میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم اسانس (mg GAE/gEO) بیان گردید.

۷-۲- اندازه‌گیری محتوای ترکیبات فلاونوئیدی کل^{۱۳} (TFC)

محتوای ترکیبات فلاونوئیدی کل بر اساس روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم انجام شد. در این روش $250 \mu\text{L}$ اسانس با $75 \mu\text{L}$ نیتريت سدیم 5% مخلوط و پس از شش دقیقه $150 \mu\text{L}$ کلرید آلومینیوم 10% به آن اضافه گردید. پس از گذشت پنج دقیقه $500 \mu\text{L}$ سود یک مولار به مخلوط اضافه و حجم محلول به $2/5 \text{ mL}$ رسانده شد. مقدار جذب در طول موج 510 nm با استفاده از دستگاه طیف‌سنج فرابنفش-نورمرئی (SPECORD 250, Jena, Germany) قرائت شد [۳۷، ۳۶]. از کوئرستین به‌عنوان استاندارد استفاده شد و به کمک آن منحنی کالیبراسیون جذب رسم گردید ($Y = 0.0105X - 0.0019$; $R^2 = 0.9897$). محتوای ترکیبات فلاونوئیدی کل برحسب میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم اسانس (mg QE/gEO) بیان گردید.

۸-۲- اندازه‌گیری فعالیت ضد اکسایشی

۱-۸-۲ اندازه‌گیری فعالیت ضد اکسایشی به روش ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل-هیدرازیل (DPPH^{\cdot}) ارزیابی فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH یکی از متداول‌ترین روش‌های تعیین میزان فعالیت ضد اکسایشی است. به منظور اندازه‌گیری فعالیت ضد اکسایشی اسانس اندام

(Switzerland) توزین و بر وزن $0/01 \text{ mL}$ آب مقطر دو بار تقطیر در دمای 20°C تقسیم شد. جهت کاهش خطا این فرایند چهار مرتبه تکرار و میانگین‌گیری گردید [۳۲]. ضریب شکست نوری با استفاده از یک رفاکتومتر رومیزی (KRÜSS, Hamburg, Germany) در دمای 20°C طبق روش ارائه شده در استاندارد ملی ایران به شماره ۶-۲۲۷۴ اندازه‌گیری شد [۳۳].

۵-۲- شناسایی و اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی

اسانس

به منظور شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس اندام هوایی چویر از دستگاه کروماتوگراف گازی-طیف‌سنج جرمی (GC/MS^9) استفاده شد. این دستگاه شامل کروماتوگرافی گازی مدل 7890B و طیف‌سنج جرمی مدل 5977A ساخت شرکت Agilent آمریکا، مجهز به ستون HP5-MS به طول 60 m با قطر داخلی $0/25 \text{ mm}$ و ضخامت $0/25 \mu\text{m}$ و سیستم تزریقی از نوع split/splitless، مدل یونیزاسیون بمباران الکترونی بود. دمای محل تزریق، دمای Interface و دمای محل یونیزاسیون به ترتیب 280°C ، 290°C و 250°C بود. برنامه دمایی ستون با دمای اولیه 60°C شروع و به مدت 5 min در این دما نگه داشته شد، سپس دمای ستون با شیب 15°C/min به دمای 180°C رسید و به مدت 2 min در این دما ثابت ماند و در نهایت با شیب 20°C/min به دمای 280°C رسید و به مدت 10 min در این دما ثابت ماند. نسبت split به صورت ۱ به ۲۰ تنظیم گردید و حجم تزریق $0/1 \mu\text{L}$ بود. شناسایی ترکیبات شیمیایی بر اساس مقایسه شاخص بازداری ترکیبات شیمیایی با شاخص‌های موجود در کتابخانه‌های جرمی^{۱۱} NIST و WILEY انجام شد. درصد هر یک از ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس بر اساس مساحت پیک‌های به‌دست آمده محاسبه گردید.

۶-۲- اندازه‌گیری محتوای ترکیبات فنولی

کل^{۱۱} (TPC)

محتوای ترکیبات فنولی کل به روش رنگ‌سنجی فولین-سیکالتیو^{۱۲} اندازه‌گیری شد. بدین منظور $200 \mu\text{L}$ از

9. Gas chromatography-mass spectrometry

10. MS library

11. Total phenolic content

12. Folin-Ciocalteu

13. Total flavonoids content

14. 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH)

از طریق رابطه ۳ محاسبه گردید. از بوتیل هیدروکسی تولوئن در غلظت‌های مشابه اسانس به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. مقدار IC_{50} مطابق روش بیان شده در بخش ۲-۸-۱ محاسبه شد.

$$ABTS\% = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

در این رابطه A_0 و A_1 به ترتیب نشان‌دهنده جذب محلول ABTS و اتانول و جذب محلول ABTS و اسانس می‌باشد.

۲-۸-۳- اندازه‌گیری فعالیت ضد اکسایشی به روش قدرت احیاء کنندگی آهن (FRAP^{۱۷})

آزمون FRAP بر اساس توانایی اسانس برای احیاء کاتیون Fe^{3+} در محلول ۲، ۴، ۶-تری پیریدیل-اس-تریازین (TPTZ^{۱۸}) به کاتیون Fe^{2+} و ایجاد کمپلکس آبی رنگ Fe^{2+} -TPTZ می‌باشد. برای انجام این آزمون معرف FRAP متشکل از بافر استات سدیم ۳۰۰mM با pH ۳/۶، معرف ۱۰mM TPTZ در کلریدریک اسید ۴۰mM و محلول ۲۰mM کلرید آهن با نسبت (۱/۷) ۱۰:۱ تهیه شد. دمای معرف FRAP تازه به ۳۷ °C رسانده شد و برای انجام آزمایش ۱۵۰ μL معرف FRAP با ۵۰ μL اسانس با غلظت‌های مختلف (۱/۶، ۳/۲ و ۶/۴ mg/mL) مخلوط شد و پس از گذشت ۴ min میزان جذب با استفاده از دستگاه طیف‌سنج فرابنفش-نورمرئی (SPECORD 250, Jena, Germany) در طول موج ۵۹۳ nm قرائت و نتایج برحسب mM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ بیان گردید [۴۰]. از بوتیل هیدروکسی تولوئن در غلظت‌های مشابه اسانس به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

۲-۹- تجزیه و تحلیل آماری

تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن بر ویژگی‌های کمی و کیفی اسانس اندام هوایی گیاه چوپر بر اساس طراحی آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار بررسی شد. تحلیل واریانس یک طرفه ($One-way ANOVA^{19}$) و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون توکی^{۲۰} در سطح اطمینان ۹۵٪ با استفاده از نرم افزار MINITAB نسخه ۱۶ صورت پذیرفت و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۳ رسم شدند.

هوایی گیاه چوپر، ابتدا محلول DPPH ۰/۱ mM با استفاده از اتانول ۹۵٪ تهیه گردید. سپس ۲ mL از غلظت‌های مختلف (۱/۶، ۳/۲ و ۶/۴ mg/mL) اسانس به خوبی با ۲ mL محلول DPPH مخلوط شد. مخلوط به مدت ۳۰ min در دمای اتاق و محیط تاریک قرار گرفت و در نهایت میزان جذب آن با استفاده از دستگاه طیف‌سنج فرابنفش-نورمرئی (SPECORD 250, Jena, Germany) در طول موج ۵۱۷ nm قرائت شد. توانایی میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بر حسب درصد از طریق رابطه ۲ محاسبه گردید [۳۸].

$$DPPH = 1 - (A_2 - A_1) / A_0 \times 100$$

در این رابطه A_0 ، A_1 و A_2 به ترتیب نشان‌دهنده میزان جذب محلول DPPH به تنهایی، میزان جذب اسانس به تنهایی و میزان جذب محلول DPPH و اسانس می‌باشد. از بوتیل هیدروکسی تولوئن^{۱۵} در غلظت‌های مشابه اسانس به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. IC_{50} بیانگر غلظتی از اسانس است که سبب مهار ۵۰ درصد از فعالیت رادیکال‌های آزاد می‌شود. در این مطالعه، پس از تعیین درصد فعالیت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد توسط اسانس‌ها و بوتیل هیدروکسی تولوئن مقدار IC_{50} از طریق رسم مقادیر مختلف فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد برحسب غلظت‌های مختلف و محاسبه معادله خط رگرسیون به دست آمد.

۲-۸-۲- تعیین فعالیت ضد اکسایشی به روش به دام انداختن رادیکال‌های آزاد ۲، ۲-آزینوبیس-(۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید) (ABTS^{۱۶})

فعالیت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS توسط اسانس گیاه چوپر طبق روش پیشنهاد شده توسط ری و همکاران (۱۹۹۹) اندازه‌گیری شد [۳۹]. بدین منظور ابتدا محلول اتانولی ABTS با میزان جذب ۰/۷۰ در طول موج ۷۳۴nm تهیه شد. سپس ۲ mL از محلول اتانولی ABTS با ۰/۱ mL از غلظت‌های مختلف اسانس چوپر (۱/۶، ۳/۲ و ۶/۴ mg/mL) مخلوط و پس از ۶ min میزان جذب با استفاده از دستگاه طیف‌سنج فرابنفش-نورمرئی (SPECORD 250, Jena, Germany) در طول موج ۷۳۴ nm قرائت گردید. توانایی میزان مهار رادیکال‌های آزاد ABTS بر حسب درصد

17. Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP)

18. Tripyridyltriazine (TPTZ)

19. Analysis of Variance (ANOVA)

20. Tukey's test

15. Butylated hydroxytoluene (BHT)

16. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تاثیر روش خشک کردن بر بازده

استخراج، وزن مخصوص و ضریب شکست

نوری اسانس چویر

نتایج تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن بر بازده استخراج اسانس در شکل ۱ ارائه شده است. نتایج حاکی از آن است که روش خشک کردن تأثیر معنی‌داری ($p < 0/05$) بر بازده استخراج اسانس داشت. همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد خشک کردن گیاهان قبل از انجام استخراج بسته به دما، زمان و روش خشک کردن می‌تواند منجر به افزایش و یا کاهش بازده استخراج ترکیبات موثره گردد [۲۸]. بر اساس نتایج به‌دست آمده کمترین بازده استخراج اسانس ($0/89 \pm 0/04$ %v/w) مربوط به اندام هوایی چویر خشک شده به روش سایه بود در حالی‌که بیشترین میزان بازده استخراج اسانس ($2/51 \pm 0/03$) برای نمونه‌های خشک شده به روش انجمادی به‌دست آمد.

رحیمی ملک و گلی (۲۰۱۳) با بررسی تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن (سایه، آفتابی، میکروویو، هوای داغ و انجمادی) بر روی بازده استخراج اسانس برگ‌های آویشن (*Thymys daenensis subsp. daenensis*. Celak) دریافتند که با به‌کار بردن روش‌های خشک کردن انجمادی و سایه به ترتیب می‌توان به بیشترین و کمترین میزان بازده استخراج اسانس دست یافت [۲۸]. در مطالعه دیگری قاسمی پیربلوطی و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که بازده استخراج اسانس از اندام‌های هوایی گشنیز خشک شده به روش سایه کمتر از نمونه‌های خشک شده به روش انجمادی است [۲۷]. به‌طور کلی دما و زمان لازم برای خشک کردن به‌عنوان دو متغیر مهم و تاثیرگذار بر میزان بازده استخراج اسانس در نظر گرفته می‌شوند [۲۱]. نتایج به‌دست آمده در این پژوهش موید این مطلب است که دمای پایین و زمان نسبتاً کوتاه در فرایند خشک کردن انجمادی منجر به افزایش میزان بازده استخراج اسانس در مقایسه با سایر روش‌ها می‌شود. از طرفی در طول زمان نسبتاً طولانی خشک کردن در سایه بخش قابل توجهی از ترکیبات فرار تشکیل دهنده اسانس در اتمسفر محیط منتشر و منجر به کاهش میزان بازده استخراج در نمونه‌های خشک

شده به این روش می‌شود.

همان‌طور که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود میزان بازده استخراج اسانس از اندام هوایی گیاه چویر خشک شده به روش هوای داغ در دمای 40°C معادل $0/6 \pm 0/29$ %v/w بود و با افزایش دمای هوای خشک کن به 60°C میزان بازده استخراج اسانس $0/1 \pm 0/98$ %v/w کاهش یافت. ژائو و همکاران [۲۹]، قاسمی پیربلوطی و همکاران [۲۷]، عبادی و همکاران [۲۴]، شاه حسینی و همکاران [۴۱]، همرونی سلامی و همکاران [۴۲] و کرمی و همکاران [۴۳] نیز گزارش کردند با افزایش دما میزان بازده استخراج اسانس کاهش می‌یابد. دلیل کاهش میزان بازده استخراج اسانس با افزایش دمای خشک کن می‌تواند آسیب دیدن غده‌ها و کرک‌های غده‌ای^{۱۱} حاوی اسانس در گیاهان دارویی باشد. به‌علاوه اینکه با افزایش دما در خشک کن، ترکیبات فرار راحت‌تر تبخیر شده و بازده استخراج اسانس کاهش می‌یابد [۴۴]. از طرفی نتایج برخی از مطالعات حاکی از آن است که افزایش دمای خشک کن می‌تواند باعث افزایش میزان بازده استخراج اسانس گردد [۴۵، ۴۶] که دلیل این امر را می‌توان به اختلاف در نوع گیاهان، ساختارهای ترشح کننده اسانس و ترکیبات شیمیایی اسانس نسبت داد [۲۶]. لازم به ذکر است که تفاوت معنی‌داری بین بازده استخراج اسانس نمونه‌های خشک شده با هوای داغ در دمای 40°C و 60°C نمونه‌های خشک شده در سایه وجود نداشت ($p > 0/05$). چگالی نسبی و ضریب شکست نوری از جمله ویژگی‌های کیفی مهم اسانس‌ها محسوب می‌شوند. لذا در پژوهش حاضر، تاثیر روش خشک کردن بر این دو ویژگی کیفی بررسی گردید. چگالی نسبی اسانس به‌دست آمده از اندام هوایی چویر خشک شده به روش‌های سایه، هوای داغ 40°C و 60°C و انجمادی به ترتیب $0/930 \pm 0/001$ ، $0/931 \pm 0/001$ و $0/932 \pm 0/002$ و شاخص شکست نوری به ترتیب $1/0 \pm 481/001$ ، $1/0 \pm 481/001$ و $1/0 \pm 479/002$ و ضریب شکست نوری به ترتیب $1/0 \pm 483/002$ بود که این نتایج در محدوده تعریف شده در استاندارد ملی ایران به شماره ۱۳۵۷۶ قرار داشت [۴۷]. به علاوه نتایج تجزیه و تحلیل آماری حاکی از آن است که روش خشک کردن تاثیر معنی‌داری بر چگالی نسبی و ضریب شکست نوری اسانس اندام هوایی چویر نداشت ($p < 0/05$).

روستائیان و همکاران (۲۰۰۲) و جاویدنیا و همکاران (۲۰۰۶) ترکیباتی نظیر α -pinene، α -phellandrene، β -phellandrene، sabinene و terpinolene را به عنوان ترکیبات شیمیایی فرار غالب اندام هوایی گیاه چویر معرفی کردند [۱۸، ۵۰]. بر اساس بررسی منابع صورت پذیرفته برای اولین بار در این مطالعه ترکیباتی نظیر *Cyclofenchene* و β -Cubebene شناسایی شده است. وجود تفاوت در ترکیب شیمیایی و درصد ترکیبات تشکیل دهنده اسانس اندام هوایی چویر مورد بررسی در مطالعات مختلف می تواند ناشی از تفاوت های ژنتیکی (گونه، اکوتیپ و کموتیپ)، شرایط آب و هوایی، محیطی و زمان نمونه برداری مختلف، منشاء جغرافیایی، بخش خاص گیاه، روش خشک کردن، روش استخراج اسانس، روش های اندازه گیری مختلف و ماهیت شیمیایی و میزان فراریت ترکیبات شیمیایی باشد [۲۵، ۵۱].

نتایج به دست آمده حاکی از آن است که روش خشک کردن عمدتاً به لحاظ کمی بر ترکیبات شیمیایی اسانس موثر است هر چند تا حدودی سبب تغییر جزئی در ترکیبات شیمیایی نیز می گردد. همان طور که در جدول ۱ ملاحظه می شود خشک کردن انجمادی سبب حفظ حداکثری عمده ترکیبات شیمیایی غالب گردید که می تواند به دلیل حساسیت ترکیبات فرار نسبت به حرارت باشد. این در حالی است که استفاده از روش خشک کردن انجمادی سبب حذف β -Cubebene و کاهش مقدار کمی Bornyl acetate و Germacra-D از اسانس اندام هوایی گیاه چویر شد. به علاوه اینکه افزایش دما در روش هوای داغ موجب کاهش مقادیر ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده اسانس به دلیل بالا رفتن سرعت انتقال مولکول های ترکیبات فرار طی تبخیر می شود. نتایج سایر مطالعات نیز نشان می دهد که افزایش دما در فرایند خشک کردن بسیاری از گیاهان دارویی نظیر *Laurus nobilis* L. [۲۱]، *O. basilicum* L. [۲۵] و *Lippia citriodora* [۲۴] سبب کاهش مقدار کمی ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده اسانس می شود. به طور کلی این افزایش یا کاهش در مقادیر ترکیبات شیمیایی اسانس می تواند ناشی از وقوع فرایندهایی نظیر اکسیداسیون، هیدرولیز گلیکوزیدی، استری شدن و غیره باشد [۲۵].

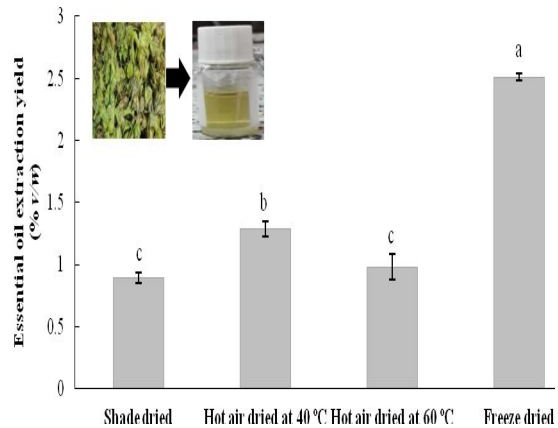


Fig 1 Effect of drying methods on essential oil extraction yield (% v/w) from aerial parts of *F. angulata*. Different lower letters indicate significant difference ($p < 0.05$).

۳-۲- تاثیر روش خشک کردن بر ترکیبات

شیمیایی اسانس چویر

همان طور که در جدول ۱ مشاهده می شود در اسانس های به دست آمده از اندام هوایی گیاه چویر خشک شده به روش های انجمادی، سایه و هوای داغ به ترتیب ۴۱، ۵۱ و ۵۲ ترکیب شیمیایی فرار شناسایی شده است که در مجموع $96/97\% - 74/74\%$ کل اسانس را تشکیل می دهند. در این میان ترکیبات شیمیایی نظیر *Cyclofenchene*، β -Bornyl acetate، *Trans-β-Ocimene*، *Limonene*، *Pinene*، *Germacra-D*، γ -*Terpinene*، *O-Cymene*، *acetate*، *Trans-Verbenol* و β -*Myrcene* ترکیبات غالب در اسانس اندام هوایی گیاه چویر در تیمارهای مورد مطالعه هستند که این نتایج با نتایج قبلی محققان در مورد این اسانس مطابقت دارد. در این راستا قاسمی پیربلوطی و همکاران (۲۰۱۶) در مجموع ۴۹ ترکیب شیمیایی فرار در اسانس اندام هوایی گیاه چویر خشک شده با روش سایه شناسایی کردند که α -*Trans-β-sabinene*، *cis-β-ocimene*، *pinene*، *β-phellandrene*، α -*phellandrene*، *ocimene*، *thymol* و *myrcene* از جمله ترکیبات غالب بودند [۴۸]. این در حالی است که شهبازی و همکاران (۲۰۰۰) وجود ۳۳ ترکیب شیمیایی فرار را در اسانس اندام گیاهی چویر گزارش کردند که در این میان α -*pinene*، (Z) - β -*ocimene*، *Germacrene-γ-terpinene*، *bornyl acetate*، *myrcene* و *p-cymene* غالب بودند [۴۶].

Table 1 Effect of different drying methods on chemical compositions of the essential oil from aerial parts of *F. angulata*.

Compound	RT (min)	SD	FD	HAD		Compound	RT (min)	SD	FD	HAD	
				40°C	60°C					40°C	60°C
<i>α</i> -Thujene	6.82	0.11	0.40	0.31	0.19	(Z)-Pinocarvyl acetate	18.72	0.19	0.36	0.18	0.11
Cyclofenchene	7.22	15.09	21.65	15.77	15.02	Thymol	18.80	0.10	0.18	0.27	0.11
Camphene	7.54	1.53	1.69	1.67	1.50	<i>α</i> -Copaene	20.80	0.33	0.55	0.59	0.42
Sabinene	8.37	1.48	1.93	1.59	1.50	<i>β</i> -Bourbonene	21.05	0.23	-	0.72	0.12
<i>β</i>-Pinene	8.48	1.55	2.58	1.82	1.58	<i>β</i> -Copaene-4 α -ol	21.17	0.21	3.27	0.37	0.13
<i>β</i>-Myrcene	9.02	2.84	3.75	3.13	2.91	(E)-Jasmone	21.39	0.17	-	0.20	0.13
<i>α</i> -Phellanderene	9.41	0.59	0.93	0.79	0.70	Italicene	21.42	-	0.23	-	-
O-Cymene	10.16	4.48	8.88	4.62	4.55	Methyl eugenol	21.51	0.12	0.21	0.33	0.09
Limonene	10.30	2.15	2.92	2.35	2.31	<i>α</i> -Cedrene	21.78	0.15	-	0.17	1.17
<i>α</i> -Naginatene	10.45	-	0.57	-	-	Caryophyllene	21.95	0.15	0.30	0.54	0.12
Trans-<i>β</i>-Ocimene	10.88	14.99	20.1	15.17	14.9	<i>Cis</i> -Chrys anthenyl propionate	22.03	-	0.28	-	-
<i>β</i> -Ocimene	11.05	1.18	1.39	1.51	1.33	<i>β</i> -Cadinene	22.52	-	0.64	-	-
<i>α</i> -Pinene	11.93	0.11	0.31	0.25	0.20	<i>γ</i> -Acorenol	23.36	-	0.49	-	-
<i>γ</i>-Terpinene	11.43	4.07	2.77	4.61	4.12	<i>γ</i> -Muurolole	23.52	0.88	-	1.28	0.55
<i>α</i> -Terpinolene	12.27	0.35	1.30	0.66	0.52	<i>β</i> -Cubebene	23.65	1.21	-	5.44	1.33
Linalool	12.66	0.14	0.44	0.39	0.18	(E)-Methyl isoeugenol	23.86	0.10	-	0.22	0.14
<i>p</i> -Cymene	13.29	-	0.51	-	-	<i>β</i> -Cyclogermacrane	23.93	0.63	-	0.78	0.59
Trans-Verbenol	13.55	2.20	3.29	2.48	2.15	<i>Trans</i> -Verbenyl isovalerate	24.06	0.42	-	0.71	0.39
<i>Allo</i> -Ocimene	13.57	0.19	0.60	0.39	0.11	<i>α</i> -Himachalene	24.14	0.20	-	0.31	0.19
Myroxide	13.69	0.19	0.45	0.32	0.25	<i>Trans</i> -Cubebol	24.34	0.16	-	0.22	0.11
<i>Cis</i> -Verbenol	13.99	0.81	0.81	0.94	0.72	<i>σ</i> -Cadinene	24.54	0.33	-	0.56	0.41
(E)-Pinocarveol	14.67	0.35	-	0.46	0.33	Viridiflorine	24.71	0.15	0.82	0.18	0.11
Borneol	14.82	0.88	0.57	1.67	1.05	<i>γ</i> -Elemene	25.39	0.62	-	0.88	0.74
Terpinene-4-ol	15.14	0.24	0.29	0.53	0.32	Neryl (S)-2-methylbutanoate	25.74	1.61	0.42	1.87	1.55
<i>p</i> -Menthane	15.29	-	0.85	-	-	Spatulenol	25.89	0.68	-	0.79	0.62
<i>α</i> -Terpineol	15.58	0.31	0.21	0.88	0.29	Ledene oxide-(II)	26.01	0.25	-	0.20	0.20
Myrtenol	15.74	0.29	-	0.21	0.20	Germacra-D	26.67	3.14	1.38	3.46	3.21
Verbenone	16.12	0.43	0.99	0.88	0.51	Thujopsenal	27.24	-	-	0.27	0.09
Carene	17.58	0.15	-	0.16	0.12	Cyclopentanone, tetrakis(1-methylethylidene)-	36.36	1.44	0.43	1.50	1.51
Bornyl acetate	18.46	4.57	7.23	7.94	5.22	Total Identified (%)		74.74	96.97	93.54	76.92

RT: Retention time; SD: Shade drying; FD: Freeze drying; HAD: Hot air drying.

داشتند به طوری که بالاترین محتوای ترکیبات فنولی کل به ترتیب مربوط به اسانس به دست آمده از اندام هوایی خشک شده به روش انجمادی (1.88 ± 0.23 mg GAE/g)، هوای داغ 60°C (1.85 ± 0.31 mg GAE/g) و سایه ($1.69/0.56 \pm 0.26$ mg GAE/g) بود. محتوای ترکیبات فلاونوئیدی کل اسانس چوب خشک شده به روش سایه، انجمادی و هوای داغ با دمای 60°C و 40°C به ترتیب برابر با $6.4/2.6 \pm 0.10$ و $7.0/9.9 \pm 0.09$ و $6.8/0.1 \pm 0.11$ mg QE/g و $7.8/5.0 \pm 0.12$ همان طور که ملاحظه می‌گردد محتوای ترکیبات فنولی کل تقریباً بیش از دو برابر محتوای ترکیبات فلاونوئیدی کل اسانس‌های مورد مطالعه می‌باشد. کاهش محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل با افزایش دما خشک کن هوای داغ

۳-۲- تاثیر روش خشک کردن بر محتوای

ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل اسانس چوب

ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در گیاهان به دلیل ویژگی‌های احیاء کنندگی، هیدروژن دهنده و کاهندگی اکسیژن منفرد، منجر به بروز فعالیت‌های ضد اکسایشی می‌گردند [۵۲]. عوامل ژنتیکی، محیطی، روش استخراج و مراحل مختلف فنولوژیکی از جمله عوامل تاثیرگذار بر مقدار و پروفایل این ترکیبات بشمار می‌روند [۵۳، ۵۴]. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس حاکی از تاثیر معنی‌دار ($p < 0.05$) روش‌های مختلف خشک کردن بر محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل اسانس اندام هوایی چوب بود. طبق نتایج به دست آمده تمامی اسانس‌های مورد مطالعه محتوای ترکیبات فنولی بالایی

و ABTS توسط اسانس اندام هوایی چویر خشک شده به روش‌های مختلف بر اساس IC_{50} یا همان توانایی مهار ۵۰٪ رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS تعیین گردید (جدول ۲). لازم به ذکر است که هر چه مقدار IC_{50} کمتر باشد فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد مد نظر بیشتر می‌باشد. نتایج به‌دست آمده حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار ($p < 0.05$) بین فعالیت ضد اکسایشی اسانس‌های مورد مطالعه است. با توجه به جدول ۲ ملاحظه می‌شود که بالاترین میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH بر اساس IC_{50} مربوط به اسانس‌های به‌دست آمده از نمونه‌های خشک شده به روش انجمادی (0.614 ± 0.25 mg/mL) هوای داغ $40^\circ C$ (0.614 ± 0.25 mg/mL) $60^\circ C$ (0.614 ± 0.25 mg/mL) و روش سایه (0.614 ± 0.25 mg/mL) بود. این درحالی است که میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS بر حسب IC_{50} برای اسانس‌های به‌دست آمده از نمونه‌های خشک شده به روش انجمادی، هوای داغ $40^\circ C$ و $60^\circ C$ و روش سایه به ترتیب معادل 0.3738 ± 0.31 ، 0.3738 ± 0.62 ، 0.3738 ± 0.31 و 0.279 ± 0.49 mg/mL بود (جدول ۲). هرچند که این مقادیر از فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS بسیار کمتر از فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد توسط ضد اکساینده سنتزی BHT بود.

میزان فعالیت ضد اکسایشی بر حسب قدرت احیاء کنندگی فریک اسانس اندام هوایی گیاه چویر خشک شده به روش سایه، انجمادی، هوای داغ $40^\circ C$ و $60^\circ C$ به ترتیب در محدوده $0.8/122 - 2/956$ mM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ، $0.5/23 - 11/074$ ، $0.5/23 - 3/417$ و $0.5/23 - 3/417$ با در نظر گرفتن غلظت اسانس در محدوده $1/6 - 6/4$ mg/mL به‌دست آمد (شکل ۳). این در حالی است که میزان فعالیت ضد اکسایشی بر حسب قدرت احیاء کنندگی فریک ضد اکساینده سنتزی BHT در غلظت‌های مشابه در محدوده mM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ $6/66 - 22/237$ به‌دست آمد. شهبازی و همکاران (۲۰۱۵) طی مطالعه‌ای به بررسی ترکیبات شیمیایی، فعالیت‌های ضد باکتریایی و ضد اکسایشی اسانس چویر جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران پرداختند. طبق نتایج به دست آمده مقادیر IC_{50} برای نمونه های لرستان، ایلام، کردستان و کرمانشاه به ترتیب $0.11/70$ ، $0.14/13$ ، $0.14/87$ و $0.16/90$ بود [۴۹]. براساس جدول ۲ میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH اسانس چویر در

می‌تواند به دلیل اثر تخریبی دمای بالا بر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی باشد. نتایج پژوهش حاضر با نتایج راکبچ و همکاران [۵۵]، هاربون و همکاران [۵۶]، روزدار و همکاران [۵۷] مطابقت داشت. با بررسی همبستگی بین محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل مشخص گردید که بین مقادیر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل اسانس چویر همبستگی مثبت با ضریب همبستگی بالایی ($R^2 = 0.9656$) وجود دارد که نشان می‌دهد هرچه محتوای ترکیبات فنولی کل بالاتر باشد میزان ترکیبات فلاونوئید کل بیشتر خواهد بود چرا که فلاونوئیدها خود از جمله ترکیبات فنولی بشمار می‌روند (شکل ۲).

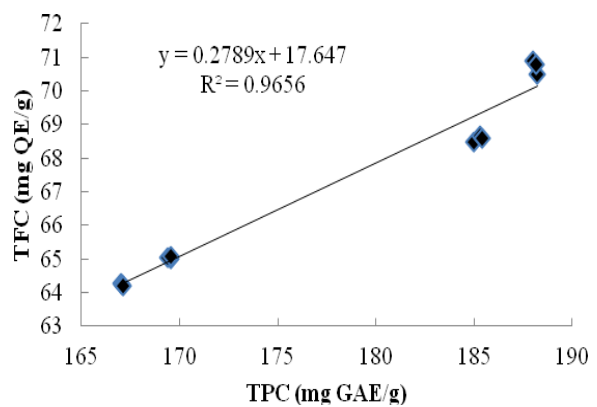


Fig 2 Correlation between total phenolic content (TPC, mg GAE/g) and total flavonoid content (TFC, mg QE/g) of essential oil from aerial parts of *F. angulate* dried using different drying methods.

۳-۳- تاثیر روش خشک کردن بر فعالیت ضد

اکسایشی اسانس چویر

با توجه به متنوع بودن ترکیبات فنولی گیاهی و وجود مکانیسم‌های مختلف جهت بروز فعالیت ضد اکسایشی ناشی از این ترکیبات فعالیت ضد اکسایشی اسانس اندام هوایی چویر خشک شده به روش‌های مختلف طبق روش‌هایی نظیر روش رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و قدرت احیاء آهن ارزیابی گردید. این روش‌ها جزء رایج‌ترین روش‌های ارزیابی فعالیت ضد اکسایشی می‌باشند که به ترتیب بر مبنای واکنش رادیکال آزاد DPPH با ترکیبات اهداء کننده هیدروژن نظیر ترکیبات فنولی، کاهش تولید کاتیون- رادیکال ABTS از طریق اکسیداسیون ABTS در حضور ترکیبات فنولی و توانایی ترکیبات فنولی جهت احیاء Fe^{3+} به Fe^{2+} استوار می‌باشند [۵۸]. فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

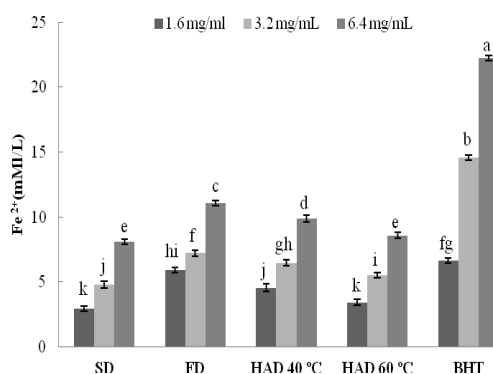


Fig 3. Antioxidant activity of *F. angulata* essential oil in term of ferric reducing antioxidant power assay (FRAP). Different lower letters indicate significant difference ($p < 0.05$).

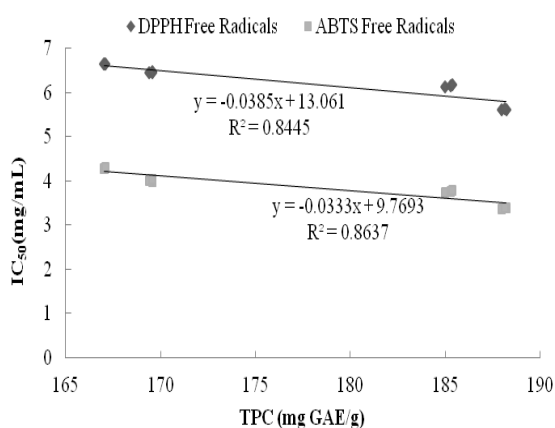


Fig 4 Correlation between total phenolic content (TPC, mg GAE/g) and IC_{50} (mg/mL) of essential oil from aerial parts of *F. angulata* dried using different drying methods.

۴- نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که روش خشک کردن تاثیر بسزایی بر بازده استخراج، ترکیبات شیمیایی، محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل و فعالیت ضد اکسایشی اسانس اندام هوایی گیاه چویر دارد. طبق نتایج به دست آمده اعمال روش‌های مختلف خشک کردن می‌تواند سبب کاهش یا حفظ برخی از ترکیبات فرار از اسانس گردد. در نهایت می‌توان نتیجه‌گیری نمود که خشک کردن انجمادی در میان روش‌های بررسی شده از توانایی بالایی برای افزایش بازده استخراج، حفظ ترکیبات شیمیایی، حفظ محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل و فعالیت ضد اکسایشی برخوردار است. پس از خشک کردن به روش انجمادی می‌توان به ترتیب روش‌های خشک کردن در هوای داغ 40°C ، هوای داغ 60°C را برای

پژوهش حاضر در محدوده $5/614-6/647$ mg/mL قرار داشت که در مقایسه با نتایج پژوهش شهبازی و همکاران (۲۰۱۵) می‌توان ملاحظه نمود که از فعالیت مهار کنندگی بالاتری برخوردار است.

ژائو و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن (خشک کردن در هوای محیط، آون با هوای داغ 40°C و 60°C و خشک کردن مادون قرمز در دمای 60°C) بر ترکیبات شیمیایی و فعالیت بیولوژیکی اسانس زیره دریافتند اسانس حاصل از زیره خشک شده به روش آون هوای داغ 40°C بالاترین فعالیت ضد اکسایشی را دارد که با افزایش دما در این روش میزان فعالیت ضد اکسایشی کاهش می‌یابد [۲۹]. قاسمی پیربلوطی (۲۰۱۶) با بررسی فعالیت ضد اکسایشی اسانس گونه‌های مختلف گیاه چویر دریافتند که فعالیت ضد اکسایشی بالاتر گونه کالار^{۲۲} را می‌توان به میزان بالای تیمول به‌عنوان یک ترکیب فنولی نسبت داد. هر چند به‌طور کلی بر اساس نتایج این پژوهش میزان فعالیت ضد اکسایشی اسانس چویر به روش DPPH ضعیف تا خوب ارزیابی گردید [۴۸]. حسینی و همکاران (۲۰۱۲) محتوای پایین ترکیبات فنولی و مقادیر بالای هیدروکربن‌های منوترپنی را علت پایین بودن فعالیت ضد اکسایشی اسانس چویر در مقایسه با اسانس سایر گیاهان بیان کردند [۵۹]. وجود ضریب همبستگی بالا ($R^2 > 0/18445$) بین محتوای ترکیبات فنولی کل و فعالیت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS بر حسب مقادیر IC_{50} توسط اسانس اندام هوایی چویر حاکی از آن است که اثر ضد اکسایشی اسانس‌ها مستقیماً ناشی از وجود ترکیبات فنولی می‌باشد (شکل ۴). به عبارتی محتوای ترکیبات فنولی بالا سبب فعالیت ضد اکسایشی بالاتر یا همان IC_{50} پایین‌تر می‌شود.

Table 2 Antiradical scavenging activity of essential oil from aerial parts of *F. angulata* against DPPH and ABTS free radicals.

Sample	DPPH (mg/mL)	ABTS (mg/mL)
SD	6.647±0.86 ^c	4.279±0.49 ^c
FD	5.614±0.25 ^b	3.368±0.62 ^b
HAD 40 °C	6.137±0.39 ^c	3.738±0.31 ^c
HAD 60 °C	6.448±0.42 ^d	3.998±0.48 ^d
BHT	3.465±0.19 ^a	2.065±0.15 ^a

SD: Shade drying; FD: Freeze drying; HAD: Hot air drying.

Different lower letters in each column indicate significant difference ($p < 0.05$).

- [10] Ghasemi Pirbalouti, A., et al., 2013, Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of three endemic medicinal plants of Iran. *Bangladesh Journal of Botany*, 42: 327–332.
- [11] Mollaei, S., et al., 2019, Extraction of essential oils of *Ferulago angulata* with microwave-assisted hydrodistillation. *Industrial Crops and Products*, 137: 43–51.
- [12] Moghaddam, M., et al., 2018, Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of seed essential oil of *Ferulago angulata*. *International Journal of Food Properties*, 21(1): 158–170.
- [13] Hritcu, L., et al., 2015, Antiamnesic and antioxidants effects of *Ferulago angulata* essential oil against scopolamine-induced memory impairment in laboratory rats. *Neurochemical Research*, 40(9): 1799-1809.
- [14] Sadeghi, E., et al., 2016, Stabilization of soybean oil during accelerated storage by essential oil of *Ferulago angulata* boiss. *Journal of Food Science and Technology*, 53(2): 1199–1204.
- [15] Sadeghi, E., F. Karami, and A. Etminan, 2017, The effect of *Ferulago angulata* (Schlecht) boiss essential oil on stabilization of sunflower oil during accelerated storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1): e12745.
- [16] Darderafshi, M.J., et al., 2014, The effect of *Ferulago angulata* essential oil on *Staphylococcus aureus* during the manufacture and preservation of Iranian white cheese. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 8: 13-20.
- [17] Shokri, S., et al., 2020, Application an edible active coating based on chitosan-*Ferulago angulata* essential oil nanoemulsion to shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4 °C. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153 846–854.
- [18] Rustaiyan, A.H., et al., 2002, Composition of the essential oil of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 14: 447-448.
- [19] Akhlaghi, H., 2008, Chemical composition of the essential oil from the aerial parts of *Ferulago angulata* (Schelecht.) Boiss. from northeast Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(5): 544- 547.
- [20] Hassanpour aghdam, M.B., et al., 2010, Drying method affects essential oil content and composition of basil (*Ocimum basilicum* L.).
- حفظ ویژگی‌های کمی و کیفی اسانس اندام هوایی گیاه چویر معرفی نمود. افزایش دما در روش هوای داغ سبب کاهش بازده استخراج و فعالیت‌های بیولوژیکی اسانس می‌گردد. در نهایت کمترین مقادیر ویژگی‌های کمی و کیفی اسانس برای اندام هوایی گیاه چویر خشک شده در سایه به‌دست آمد.

۵- منابع

- [1] Nouroozi, A., Bimakr, M., Ganjloo, A. and S. Zarighalami, 2018, Effect of soaking pretreatment on kinetics of total phenolic compound extraction from *Eryngium Caucasicum* Trautv leaves using ultrasound waves. *Journal of Food Reseach*, 28(3): 169-181.
- [2] Celik, A., et al., 2013, Constituents, oxidant-antioxidant profile, and antimicrobial capacity of the essential oil obtained from *Ferulago sandrasica Pemen* and *Quézel*. *International Journal of Food Properties*, 16(8): 1655-1662.
- [3] Imelouane, B., et al., 2009. Physicochemical compositions and antimicrobial activity of essential oil of eastern Moroccan *Lavandula dentate*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11: 113–118.
- [4] Sepahvand, R., et al., 2014, Chemical composition, antioxidant activity and antibacterial effect of essential oil of the aerial parts of *Salvia sclareoides*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7: 491-496.
- [5] Mozafarian, V., 1983, The family of umbelliferae in Iran, key and distribution. *Research Inistitue and Ranglands*, Tehran, Iran, 35: 387.
- [6] Mozaffarian V., 2008, *Encyclopedia of Iranian plants*. Tehran, Iran: Farhang Moaser Publisher.
- [7] Rustaiyan, A., et al., 2002, Composition of the essential oil of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 14(6): 447-448.
- [8] Heidari, S., et al., 2014, Anti-tumor activity of *Ferulago angulata* Boiss. extract in gastric cancer cell line via induction of apoptosis. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(4): 1335.
- [9] Taran, M., H.R. Ghasempour, and E. Shirinpour, 2010, Antimicrobial activity of essential oils of *Ferulago angulata* subsp. *Carduchorum*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 3(1): 10-14.

- Boiss gathered in Nevakoh and Shahoo, Zagross Mountain, West of Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10(5): 814-817.
- [32] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 2016. NO. 2274-9. Essential oils- Determination of relative density at 20 °C –Reference method.
- [33] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 2003. NO. 2274-6. Essential oil-Determination of refractive index-Test method.
- [34] Osawa, T. and M. Namiki, 1981, A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *eucalyptus* leaves. Agricultural and Biological Chemistry, 45: 735–739.
- [35] Singleton, V.L. and J.A. Rossi, 1965, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungestic acid reagent. American Journal of Enology and Viticulture, 16: 144–158.
- [36] Eberhardt, M.V., C.Y. Lee, and R.H. Liu, 2000, Antioxidant activity of fresh apples. Nature, 405: 903-904.
- [37] Jia, Z., M. Tang, and J. Wu, 1999, The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry, 64: 555-559.
- [38] Xie, J.-H., et al., 2012, Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharides. Carbohydrate Polymers, 89: 177–184.
- [39] Re, R., et al., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26(9): 1231-1237.
- [40] Benzie, I.F.F. and J.J. Strain, 1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239(1): 70-76.
- [41] Shahhoseini, R., et al., 2013, Qualitative and quantitative changes in the essential oil of lemon verbena (*Lippia citriodora*) as affected by drying condition. Drying Technology, 31 (9): 1020-1028.
- [42] Hamrouni Sellami, I., et al., 2013, Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) plants as affected by different drying methods. Food and Bioprocess Technology, 6(3): 806-817.
- [43] Karami, H., M. Rasekh, and Y. Darvishi, 2017, Effect of temperature and air velocity on drying kinetics and organo essential oil Journal of Essential Oil Bearing Plants, 13(6): 759-766.
- [21] Hamrouni Sellami, I., et al., 2011, Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods. Food Chemistry, 126(2): 691-697.
- [22] Ganjloo, A., Bimakr, M. and M. Ghorbani, 2019, Study the effect of different drying methods and solvent type on kinetics of phenolic compounds extraction from green pea pod and evaluation of its antiradical activity. Journal of Food Reseach, 29(2): 29–45.
- [23] Díaz-Maroto, P.-C. M., M., and M. Cabezudo, 2002, Effect of different drying methods on the volatile components of parsley (*Petroselinum crispum* L.). European Food Research and Technology, 215(3): p. 227-230.
- [24] Ebadi, M.T., et al., 2015, Influence of different drying methods on drying period, essential oil content and composition of *Lippia citriodora* Kunth. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2: 182-187.
- [25] Ghasemi Pirbalouti, A., E. Mahdad, and L. Craker, 2013, Effects of drying methods on qualitative and quantitative properties of essential oil of two basil landraces. Food Chemistry, 141: 2440-2449.
- [26] t, chemical composition, and radical scavenging activity of the essential oil. Food and Bioprocess Technology, 5: 2978-2989.
- [27] Ghasemi Pirbalouti, A., S. Salehia, and L. Craker, 2017, Effect of drying methods on qualitative and quantitative properties of essential oil from the aerial parts of coriander. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 4: 35–40.
- [28] Rahimmalek, M. and S.A.H. Goli, 2013, Evaluation of six drying treatments with respect to essential oil yield: composition and color characteristics of *Thymysdaenensis* subsp. *daenensis* Celak leaves. Industrial Crops and Products, 42: 613-619.
- [29] Guo, Y.-R., et al., 2018, Effect of drying methods on chemical composition and biological activity of essential oil from cumin (*Cuminum cyminum* L.). Journal of Essential Oil Bearing Plants, 21(5): 1295-1302.
- [30] AOAC, Official Methods of Analysis. 17th Ed. Washington D.C. USA: Association of Official Agricultural Chemists, Inc. 2002.
- [31] Reza, G.H., S. Ebrahim, and H. Hossien, 2007, Analysis by Gas chromatography-mass spectrometry of essential oil from seeds and aerial parts of *Ferulago angulata* (Schlecht.)

- [52] Henriques, F., R. Pinho Ferreira Guiné, and M. João Barroca, 2012, Chemical properties of pumpkin dried by different methods. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, Biotehnologiju i Nutricionizam*, 7(1-2): 98-105.
- [53] Tohidi, B., M. Rahimmalek, and A. Arzani, 2017, Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry*, 220 153–161.
- [54] Gharibi, S., B.E.S. Tabatabaei, and G. Saeidi, 2015, Comparison of essential oil composition, flavonoid content and antioxidant activity in eight *Achillea* species. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18: 1382-1394.
- [55] Rakic S., et al., 2007, Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. *Food Chemistry*, 104: 830-834.
- [56] Harboune, N., et al., 2009, Effect of drying methods on the phenolic constituents of meadow sweet (*Filipendula ulmaria*) and willow (*Salix alba*). *Food Chemistry*, 42(9): 1468- 1473.
- [57] Roozdar, F., et al., 2008, The effects of drying methods on drying time and some biochemical characteristics of *Mentha × piperita* L. *Journal of Horticultural Science*, 28(3): 407-415.
- [58] Roginsky, V. and E.A. Lissi, 2005, Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235 - 254.
- [59] Hosseini, N., et al., 2012, Total phenol, antioxidant and antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Ferulago angulata* ssp. *angulata*. *Journal of Medicinal Plants*, 3(43): 80-89.
- extraction efficiency in a hybrid dryer. *Journal of Innovative Food Technologies*, 5(1): 65-75.
- [44] Zhang, L-L., et al., 2018, Influence of drying methods on chemical compositions, antioxidant and antibacterial activity of essential oil from lemon peel. *Natural Product Research*, 32: 1184-1188.
- [45] Sefidkon, F., K. Abbasi, and G. Bakhshi Khaniki, 2006, Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. *Food Chemistry*, 99: 19-23.
- [46] Castro, D.M., L.C. Ming, and M.O.M. Marques, 2000, Biomass production and chemical composition of *Lippia alba* (Mill.) in leaves on different plant parts in different seasons. in *In I Latin-American Symposium on the Production of Medicinal, Aromatic and Condiments Plants*, Sao Pedro, Brazil, July 30.
- [47] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 2010. NO. 13576. Oil of *Ferulago angulata* (SCHLECHT.) BOISS- Spicification and test methods.
- [48] Ghasemi Pirbalouti, A., et al., 2016, Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from *Ferulago angulata*. *Pharmaceutical Biology*, 54(11): 2515-2520.
- [49] Shahbazi, Y., et al., 2015, Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss essential oil. *Pharmaceutical Sciences*, 21: 6- 11.
- [50] Javidnia, K., et al., 2006, Constituents of the volatile oil of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 18: 548–550.
- [51] Asghari, J., et al., 2012, Comparison of the microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss. *European Journal of Medicinal Plants*, 2: 324–234.



Influence of Different Drying Methods on Extraction Yield, Chemical Compositions, Total Phenolic and Flavonoid Contents and Antioxidant Activity of Essential Oil from Aerial Parts of *Ferulago angulata* Boiss.

Hemati, A. ¹, Ganjloo, A. ^{2*}, Varmira, K. ³, Bimakr, M. ²

1. MSc of Food Technology, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
3. Associate Professor, Research Center of Oils and Fats, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Article History:</p> <p>Received 2021/ 04/ 10 Accepted 2021/ 06/ 12</p> <hr/> <p>Keywords:</p> <p><i>Ferulago angulata</i> Boiss, Essential oil, Freeze drying, Hot air drying, Biological activity.</p> <hr/> <p>DOI: 10.52547/fsc.18.08.10</p> <hr/> <p>*Corresponding Author E-Mail: aganjloo@znu.ac.ir</p>	<p>Drying is one of the most common and effective techniques for maintaining the quantitative and qualitative characteristics of medicinal plants in the postharvest stage. Thus, in the current study, the effect of different drying methods including shade drying (SD), hot air (HAD; 40 and 60 °C) and freeze drying (FD) on the extraction yield, chemical compositions, total phenolic and flavonoid content and antioxidant activity of essential oil from aerial parts of <i>Ferulago angulata</i> was investigated. The results revealed that the drying method has a significant effect on the studied properties. The lowest (0.89%v/w) and the highest essential oil extraction yield (2.5%v/w) were obtained for SD and FD aerial parts of <i>F. angulata</i>, respectively. The identified chemical compounds using gas chromatography-mass spectrometry represented 74.74-96.97% of the essential oil. Cyclofenchene (15.02-21.65%), <i>Trans</i>-β-Ocimene (14.90-20.10%), <i>O</i>-Cymene (4.48-8.88%), Bornyl acetate (4.57-7.94%), β-Myrcene (2.84-3.75%), γ-Terpinene (2.77-4.61%), <i>Trans</i>-Verbenol (2.15-3.29%), Limonene (2.15-2.92%), β-Pinene (1.55-2.58%) and Germacra-D (1.38-3.46%) were the main chemical constituents of the SD, HAD and FD aerial parts of <i>F. angulata</i> essential oil. FD preserves the maximum chemical constituents and increasing temperature in HAD reduces the amount of chemical constituents of the essential oil. Total phenolic content of essential oil from FD (188±0.23 mg GAE/g), HAD 40°C (185±0.31 mg GAE/g), HAD 60°C (169.56±0.26 mg GAE/g) and SD (167.03±0.19 mg GAE/g) were almost more than twice the total flavonoid content. The highest scavenging activity of DPPH· and ABTS· based on IC₅₀ were obtained for FD sample and were equal to 5.614±0.25 and 3.368±0.62 mg/mL, respectively. In addition, the FRAP of essential oil from FD aerial parts of <i>F. angulata</i> was obtained in the range of 5.923-11.074 mM FeSO₄.7H₂O. Finally, it can be concluded that FD could be a suitable method for drying aerial parts of <i>F. angulata</i>.</p>