مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

مقایسه بین عوامل مختلف جهت استخراج عصاره رزماری: حلّال، روش عصاره‌گیری، اندازه ذرّات، نسبت گیاه به حلّال

زهرا لطیفی[۱]، فریال خادمی[۲]، رومینا محبی[۳]، مریم محسن سلطانی[٤]، زهرا اسپرورینی[٥]، نیلوفر علوی[٦]، مهتاب وکیلیان[*۷]

۱-دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، واحد نور، دانشگاه آزاد اسلامی، نور، ایران

۲ -دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت الله آملی آمل، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

۳ -دانش‌آموخته کارشناسی، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

٤ -دانش‌آموخته کارشناسی، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت الله آملی آمل، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

٥- دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت و کنترل کیفیت مواد غذایی، دانشکده پیرا دامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

٦- دانشجوی کارشناسی مهندسی علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده فنی و حرفه ای دختران نیشابور، نیشابور، ایران

۷- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۸

کلمات کلیدی:

فعالیت آنتی‌اکسیدانی،

ترکیبات فلاوونوئیدی،

ترکیبات فنولی،

عصاره گیاه رزماری.

DOI:10.22034/FSCT.21.153.13.

* مسئول مکاتبات:

M.vakilian68@gmail.com

چکیده

اکلیل کوهی با نام عمومی رزماری، گیاهی از خانواده نعناعیان با خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد، لذا هدف از این تحقیق، استخراج عصاره گیاه رزماری با استفاده از حلال‌ها، روش‌ها (ماسیراسیون، استخراج گرم، سوکسله، پرکولاسیون و سونیکاسیون)، اندازه ذرات (۳۰۰، ۵۰۰ و ۸۰۰ میکرومتر) و نسبت‌های گیاه به حلال (۱:۱۰۰، ۲:۱۰۰، ۳:۱۰۰، ٤:۱۰۰ و ٥:۱۰۰) مختلف می‌باشد. در این مطالعه آزمایشگاهی، ابتدا سنجش میزان ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه به روش DPPH صورت گرفت و برای استخراج این ترکیبات از حلال‌ها و روش‌های مختلف استفاده و با یکدیگر مقایسه شدند و تجزیه و تحلیل داده‌ها نیز با نرم‌افزار SPSS و آزمون ANOVA انجام گردید. بهترین حلال جهت استخراج ترکیبات فنولی، فلاوونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی، آب و متانول (۸۰:۲۰) بود. میزان ترکیبات فنولی تام با استفاده از این حلال (mg/g) ۷/۱۷۲ و ترکیبات فلاوونوئیدی (mg/g) ۲۸/۱۵۷ و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای مهار رادیکال‌های آزاد (mg/lit) ۸۷/۲۳۵۸٦ بود. بهترین روش برای استخراج ترکیبات فنولی روش ماسراسیون با میزان (mg/g) ۷/٤۸۱ و برای ترکیبات فلاوونوئیدی نیز با میزان (mg/g) ٤۷/۸٥ و به میزان (mg/lit) ۷۳/٥۲٤ برای مهار رادیکال‌های آزاد تعیین گردید. نتایج نشان می‌دهد برای دستیابی به حداکثر میزان استخراج ترکیبات فنلی تام، فلاوونوئید و آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره گیاه رزماری، استفاده از پودر گیاه با اندازه ذرات ۳۰۰ میکرومتر، حلال آب: متانول (۸۰:۲۰)، نسبت گیاه به حلال (g/ml) ۱۰۰: ۱ و استفاده از روش ماسراسیون باید به عنوان شرایط عملیاتی مطلوب استفاده شود.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-22]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.153.13]

۱-مقدمه

از آنجا که مصرف‌کنندگان نگران تأثیر منفی مواد شیمیایی سنتزی در مواد غذایی هستند، نیاز به یافتن "محصولات دارای ترکیبات طبیعی" وجود دارد. بنابراین، تمایل به استفاده از عصاره‌های طبیعی به عنوان گزینه‌های اضافی برای افزودنی‌های سنتزی افزایش می‌یابد، زیرا (الف) هم-افزایی آنها با سایر روش‌های نگهداری، (ب) آنها ایمن در نظر گرفته می‌شوند، و (ج) خواص خاص آنها به عنوان آنتی‌اکسیدان، ضددیابت، ضدجهش‌زا، ضدسمیت و ضدباکتری است (۱). بطور کلی، گیاهان و نباتات سرشار از ترکیباتی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی مانند ویتامین‌ها (E و C)، گلوتاتیون، آنزیم‌ها و ترکیبات فنلی هستند (۲). چندین عصاره ادویه خواص خود را برای جلوگیری از اکسیداسیون تری آسیل گلیسرول‌های اشباع نشده نشان داده‌اند (۳). به خصوص، عصاره طبیعی از خانواده نعناعیان (*Lamiaceae*) (آویشن، مریم گلی و رزماری) در چندین مطالعه برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزارش شده است (۱, ٤).

ترکیبات فنولی به فنول‌های ساده، اسیدهای فنولی، مشتقات هیدروکسی سینامیک، تانن‌ها، آنتوسیانین‌ها و فلاوونوئیدها طبقه‌بندی می‌شوند که معمولاً در میوه‌ها و سبزیجات، برگ‌ها، آجیل‌ها، دانه‌ها، ریشه‌ها و در سایر قسمت‌های گیاه دیده می‌شوند. این مواد منافع قابل توجهی در زمینه مواد غذایی، شیمی، داروسازی و پزشکی با توجه به طیف گسترده‌ای از اثرات مطلوب زیستی از جمله خواص آنتی-اکسیدانی دارند (۵). ترکیبات فنولی با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌رادیکالی می‌توانند نقش مهمی در نگهداری محصولات غذایی و حفظ سلامتی انسان ایفا نمایند. فلاوونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی، انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت زیستی متنوع این ترکیبات از جمله آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد التهابی آنها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده است (٦).

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که با جذب رادیکال آزاد و ممانعت از ادامه اکسیداسیون، از فساد و تغییر رنگ و تند شدن چربی‌ها جلوگیری می‌کنند. به خصوص آنتی-اکسیدان‌هایی که بنیان حلقوی فنولی حاوی گروه OH را دارا می‌باشند، نقش مهمی در جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌ها دارند (۷). ویژگی‌های سلامت بخش آنتی-اکسیدان‌ها و نقش آن‌ها در پیشگیری از بیماری‌ها، دلایل عمده استفاده بالا از آنها می‌باشد. در واقع آنتی‌اکسیدان‌ها از فرآیند اکسیداسیون که از عوامل بروز بیماری‌هایی همچون سرطان است پیشگیری کرده و از این جهت اثرات خود را بر سلامت انسان می‌گذارند (۸). آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند بوتیلات هیدروکسی تولوئن (BHT[1])، بوتیلات هیدروکسی آنیزول (BHA[2])، ترت بوتیلات هیدروکسی کینون (TBHQ[3]) می‌باشند (۹). مصرف آنتی-اکسیدان‌های سنتزی در حیوانات آزمایشگاهی سرطان و مشکلات کبدی را در پی داشته است (۷, ۱۰). اخیراً تمایل به استفاده از مواد طبیعی همچون فلاوونوئیدها و توکوفرول‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان غیرسمی در سیستم غذایی مطرح شده است (۸, ۱۱).

گیاه رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis* و از خانواده نعناعیان می‌باشد. نام فارسی آن "اکلیل کوهی" بوده و گیاهی بوته‌ای و همیشه سبز است. این گیاه، بومی ناحیه مدیترانه است و بطور گسترده‌ای در آب و هوای معتدل پرورش داده می‌شود. در ایران در اغلب نواحی، آن را کشت و پرورش می‌دهند. در سال‌های اخیر علاقه روز افزونی به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مانند توکوفورول و فلاوونوئیدها برای حفاظت مواد غذایی ایجاد شده است. در این میان عصاره‌های رزماری در صنایع غذایی به عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدانی طبیعی مورد توجه قرار گرفته است. عصاره‌های رزماری در هر دو محصولات قابل حل در آب و قابل حل در روغن در دسترس هستند (۱۲). در دنیا عصاره‌های رزماری به عنوان افزودنی مواد غذایی و طعم دهنده و به منظور جلوگیری از فساد چربی

1 -Butylated hydroxytoluene (BHT)
2 -Butylated hydroxyanisole (BHA)
3 -Tert-butylate hydroxyquinone (TBHQ)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-22]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.153.13]

به گوشت اضافه می‌شوند (۱۳). اثر آنتی‌اکسیدانی گیاه رزماری به دی‌ترپن‌های فنلی مانند متیل‌کارنوسات[4]، کارنوسول[5]، اسید کارنوسیک[6] و اسیدهای فنلی مانند اسید کافئیک[7] و اسید رزمارینیک[8] مربوط است (۱۰). فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های رزماری با استفاده از حلال‌های مختلف ارزیابی شده است. یکی از مهمترین جنبه‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی رزماری رابطه بین دی‌ترپن‌ها با فعالیت مهار رادیکال است (۳). چندین شرایط استخراج در مطالعات گزارش شده و استخراج جامد-مایع بیش‌ترین تکنیک برای جداسازی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاهی است. با اینحال، روش‌های معمول استخراج جامد-مایع مانند حمام آب گرم، خیساندن (ماسراسیون)، استخراج سوکسله و پرکولاسیون، که برای چندین دهه استفاده شده است، بسیار وقت‌گیر است و علاوه بر عملکرد عصاره، به مقادیر نسبتاً زیادی حلال نیز نیاز دارد و نتیجه فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی مواد گیاهی کمتر است (۱٤).

دل بانو و همکاران (۲۰۰۳) توزیع ترکیبات پلی فنلی را در قسمت‌های مختلف گیاه رزماری بررسی کردند آنها از حلال DMSO جهت استخراج استفاده کردند و نتیجه گرفتند که غلظت ترکیبات فنلی از جمله اسید کارنوسیک و کارنوسول و اسید رزمارینیک در برگ‌های این گیاه بیشتر از ساقه گیاه می‌باشد. آنها همچنین بیان کردند که غلظت پلی فنل‌ها در طی مراحل رشد گیاه بیشتر است (۱۵).

ولوود و کارول (۲۰۰٤) فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره-های رزماری را با استفاده از سه حلال استخراج شامل پترولیوم اتر و دی کلرومتان و اتانول و مخلوطی از دی-کلرومتان و اتانول مقایسه کرد. که در این بررسی حلال اتانول مناسب‌ترین حلال تشخیص داده شد (۱٦). یسیل سلیکتاس و همکاران (۲۰۰۷) ترکیبات فنلی کل چند نمونه عصاره رزماری را ۲۰-۱۲ بر حسب میلی‌گرم عصاره بدست آوردند، آنها از حلال متانول جهت استخراج عصاره استفاده کردند (۱۷). بنا به تحقیق جمشیدی و همکاران (۲۰۱۰) میزان ترکیبات فنلی کل عصاری رزماری ۵۹/۱٤ میلی‌گرم برگرم می‌باشد که برای این منظور از حلال متانول استفاده کردند (۱۸). ویراکودی و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی اثرات ضدباکتری و ترکیبات فنلی کل عصاره رزماری مقادیر را ۵٦/٦٦ بر حسب میلی-گرم بر گرم بیان کردند که برای این منظور از حلال اتانول استفاده کردند (۱۹). هر ماده گیاهی از نظر ترکیبات فنلی خاصیت منحصر به فرد خود را دارد. بنابراین، مطالعه روش استخراج بهینه و ارائه درک بهتر از کاربرد بالقوه تکنیک‌های مختلف در فرآوری و استفاده مؤثر از حلال‌ها مهم است. همچنین پارامترهای تکنولوژیکی تأثیرگذار بر فرآیندهای صنعتی مورد استفاده برای استخراج مانند آماده‌سازی مقدماتی، اندازه ذرات ماده استخراج شده، نوع حلال، ترکیب حلال، نسبت جامد به حلال، دما و فشار استخراج، زمان استخراج و pH دارند (۲۰). دستیابی به شرایط عملیاتی بهینه برای یک روش استخراج برای کاربردهای تجاری فرآیند ضروری است. از این‌رو در این مطالعه اثر نوع حلال، روش استخراج، اندازه ذرات گیاه و نسبت گیاه به حلال بکار رفته به روی خواص آنتی-اکسیدانی و میزان ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی گیاه رزماری مورد بررسی قرار گرفته است.

۲- مواد وروش‌ها

۲-۱ تهیه و آماده‌سازی گیاه

گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) بصورت دستی از منطقه کوهستانی کدیر در ارتفاعات شهرستان نور جمع-آوری شد و توسط کارشناسان جهاد کشاورزی شهرستان تأیید گردید. برای افزایش راندمان استخراج، مواد جامد قبل از ورود به سیستم استخراج پیش فرآوری می‌شود. این فرآوری شامل، آسیاب کردن و خرد کردن می‌باشد. در این تحقیق گیاه اکلیل کوهی (رزماری) شامل برگ در محیط خشک و سایه به دور از نور خورشید نگهداری شده‌اند.

4- Methyl carnosate
5- carnosol
6- carnosic acid
7- Caffeic acid
8- Rosmarinic acid

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-22]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.153.13]

بعد از خشک شدن برگ گیاه، مرحله آسیاب کردن با اندازه کوچک‌تر از ۲ میلی‌متر جهت استخراج صورت پذیرفت.

۲-۲ مواد شیمیایی

تمام مواد شیمیایی و حلال‌های مورده استفاده در این تحقیق از شرکت مرک آلمان و معرف DPPH (دی فنیل پیکریل هیدرازیل) از شرکت سیگما تهیه شده است.

۲-۳ انتخاب بهترین حلال برای استخراج ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی

مقدار ۰/۲ گرم از نمونه‌ای که از الک ۵۰۰ میکرون عبور داده شده بود به دقت وزن شده و در ظرف‌های درب‌دار ریخته شد. سپس بر روی هر شیشه مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از هر یک از حلال‌های آب (۱۰۰ درصد)، آب:متانول (۵۰:۵۰)، آب: متانول (۲۰:۸۰)، آب: اتیل استات (۵۰:۵۰)، کلروفرم: آب (۵۰:۵۰)، اتانول: آب (۵۰:۵۰)، اتانول (۱۰۰ درصد)، هگزان (۱۰۰ درصد)، استون (۱۰۰ درصد)، متانول (۱۰۰ درصد)، استون: آب (۵۰:۵۰)، استون: آب (۷۰:۳۰) ریخته شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت عصاره‌ها توسط کاغذ صافی، فیلتر و سپس هر یک با حلال مربوطه خود به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. عصاره‌گیری با هر یک از حلال‌ها سه بار انجام شد و هر عصاره سه بار آنالیز و میزان ترکیبات فنلی و فلاوونوییدی و آنتی‌اکسیدانی هر عصاره با روش-های یاد شده اندازه‌گیری شد (۲۱).

۲-٤ تعیین بهترین روش عصاره‌گیری جهت استخراج ترکیبات فنلی و فلاوونوییدی و آنتی‌اکسیدانی

بعد از آزمون حلال‌های مختلف روی عصاره‌ها مشخص شد که حلال متانول ۸۰ درصد، بهترین حلال جهت استخراج ترکیبات فنولی است. در مرحله بعد برای تعیین بهترین روش عصاره‌گیری، روش‌های ماسراسیون، استخراج گرم، پرکولاسیون، استخراج مداوم با استفاده از دستگاه سوکسله و سونیکاسیون با یکدیگر مقایسه شدند. با هر یک از روش ها سه بار عصاره گیری انجام و هر عصاره سه بار آنالیز شد.

۲-٤-۱ روش ماسراسیون (سرد)

مقدار ۱ گرم از پودر گیاه با اندازه ذره‌ای ۳۰۰ میکرومتر به دقت وزن شده و برروی آن ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد ریخته، مخلوط را به مدت ۳ روز برروی شیکر گذاشته و پس از طی زمان مربوطه عصاره‌ها توسط کاغذ صافی، فیلتر و در بالن ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری با حلال متانول ۸۰ درصد به حجم رسانده شد (۲۲).

۲-٤-۲ روش عصاره‌گیری گرم

مقدار ۱ گرم از پودر گیاه به دقت وزن شده و بر روی آن ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد ریخته، مخلوط را خوب شیک کرده و سپس به مدت ٤ ساعت در بن ماری با دمای ٤۰ درجه سانتی گراد گذاشته شد. پس از گذشت ٤ ساعت عصاره ها توسط کاغذ صافی، فیلتر و در بالن ژوژه ۱۰ میلی لیتری با حلال متانول ۸۰ درصد به حجم رسانده شد.

۲-٤-۳ روش پرکولاسیون

مقدار ۱ گرم از پودر گیاه به دقت وزن شده و در دکانتوری که در انتهای آن پنبه قرار داده شده بود، ریخته شد. سپس بر روی آن بطور مرتب حلال متانول ۸۰ درصد ریخته و خالی شد تا زمانی این کار ادامه پیدا کرد که وقتی متانول ۸۰ درصد ریخته شد دیگر محلول داخل دکانتور بی‌رنگ شد. سپس ارلن حاوی محلول جمع‌آوری شده، توسط روتاری تقطیر شد تا حجم آن به ۱۰ میلی‌لیتر کاهش یابد. سپس عصاره‌ها در بالن ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری با حلال متانول ۸۰ درصد به حجم رسانده شد (۲۲).

۲-٤-٤ روش استخراج مداوم (سوکسله)

مقدار ۱ گرم از پودر برگ گیاه به دقت وزن شده و در کارتوش ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و در دستگاه سوکسله

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-22]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.153.13]

۵۰ میلی‌لیتری قرار گرفت. حلال متانول ۸۰ درصد در بالن ته گرد ریخته شد و سوکسله به مدت ۸ ساعت انجام گرفت. سپس بالن حاوی محلول جمع‌آوری شده، توسط روتاری تقطیر شد تا حجم آن به۱۰ میلی‌لیتر کاهش یابد. سپس عصاره‌ها در بالن ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری با حلال متانول ۸۰ درصد به حجم رسانده شد (۲۳).

۲-٤-۵ روش سونیکاسیون

مقدار ۱ گرم از پودر گیاه به دقت وزن شده و بر روی آن ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد ریخته شد. به مدت ۳ ساعت درون دستگاه سونیکاتور قرار گرفت. پس از گذشت زمان مربوطه عصاره‌ها توسط کاغذ صافی، فیلتر و در بالن ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری با حلال متانول ۸۰ درصد به حجم رسانده شد (۲٤).

۲-۵ تعیین بهترین اندازه ذره‌ای پودر گیاه جهت استخراج استخراج ترکیبات فنلی و فلاوونوییدی و آنتی‌اکسیدانی

پس از انتخاب بهترین حلال و روش عصاره‌گیری، ۱ گرم از پودر گیاه که از الک‌هایی با اندازه ذره‌ای ۳۰۰، ۵۰۰ و ۸۰۰ میکرون عبور داده شده بود با استفاده از متانول ۸۰ درصد و روش گرم عصاره‌گیری شد. از هر یک سه بار عصاره‌گیری و هر عصاره نیز سه بار آنالیز شد.

۲-٦ تأثیر نسبت گیاه به حلال در استخراج ترکیبات فنلی تام و فلاوونوییدی و آنتی‌اکسیدانی

در مرحله بعد برای تعیین تأثیر نسبت گیاه به حلال در میزان ترکیبات فنلی و فلاوونوییدی و آنتی‌اکسیدانی استخراج شده، وزن‌های ۱، ۲، ۳، ٤، ۵ گرم از گیاه برداشته شد و پس از عبور از الک با حفرات ۳۰۰ میکرومتری، عصاره‌گیری گرم با حلال متانول ۸۰ درصد صورت گرفت و به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و در نتیجه نسبت‌های ۱:۱۰۰، ۲:۱۰۰، ۳:۱۰۰، ٤:۱۰۰ و ۵:۱۰۰ از گیاه به حلال حاصل شد و مانند مراحل قبل سه بار از هر یک از آن‌ها عصاره‌گیری شد و هر عصاره نیز سه بار آنالیز شد.

۲-۷ بررسی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی

۲-۷-۱ ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با آزمون دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)

توانایی مهار رادیکال آزاد به روش DPPH انجام شد. برای این منظور، محلول ۱ میلی‌مولار DPPH در حلال متانول آماده گردید. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از آن با ۷۵۰ میکرولیتر از عصاره مخلوط شده و به شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۲۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفت. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج ۵۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = (A_{blank} - A_{sample}) A_{blank} \times 100$$

که در آن A_{blank} و A_{sample} به ترتیب جذب در نمونه کنترل و جذب نمونه عصاره می‌باشند (۲۲).

۲-۷-۲ اندازه‌گیری محتوی تام فلاوونوئیدی عصاره‌ها

میزان کل فلاونوئیدها به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. در این روش ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره با ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم ۱ مولار، ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. بعد از نگهداری نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، جذب مخلوط در طول موج ٤۱۵ نانومتر خوانده شد. به منظور رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد (۲۵).

۲-۷-۳ روش اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-22]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.153.13]

۴۰۰ میکرولیتر از عصاره درون لوله آزمایش درب‌دار ریخته شده و پس از افزودن ۳ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو (رقیق شده با آب به نسبت ۱۰:۱)، در بن ماری با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. سپس به آن ۳ میلی‌لیتر محلول بی‌کربنات سدیم ٦ درصد افزوده و مجدداً در بن ماری با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. پس از گذشت زمان ۹۰ دقیقه جذب نمونه در طول موج ۷٦۵ نانومتر در مقابل بلانک آب اندازه گیری شد. لازم به ذکر است که بلانک نیز مانند نمونه تهیه شد با این تفاوت که به جای عصاره، ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر درون لوله آزمایش ریخته شد. این روش برروی هر یک از محلول‌های استاندارد کلروژنیک اسید با غلظت‌های ۰/۰۳، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نیز انجام شد و منحنی کالیبراسیون غلظت در برابر جذب رسم شد (۲٦):

$(y = ۳/۰٦۱۹x + ۰/۰۳٦۲, R^2 = ۰/۹۹۹۹)$

۲-۸ تجزیه تحلیل آماری

در این تحقیق، از طرح کاملاً تصادفی برای انجام کلیه آزمون‌ها با حداقل ۳ تکرار، استفاده شده و تجزیه و تحلیل داده‌ها نیز به روش تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA)و با کمک نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱٦) انجام شد که در صورت معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین داده‌ها، از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ ٪ استفاده گردید. برای ترسیم نمودارها نیز نرم‌افزار Excel (2013) بکار برده شد.

۳- نتایج و بحث

۱-۳ درصد ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی در گیاه رزماری با استفاده از حلال‌های مختلف

نتایج استفاده از حلال‌های مختلف جهت استخراج ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی در گیاه رزماری، در جدول (۱) گزارش شده است و همچنین بصورت نمودار در شکل (۱) نشان داده شده است. از ۱۳ حلال: متانول (۱۰۰٪)، اتانول (۱۰۰٪)، استون(۱۰۰٪)، هگزان(۱۰۰٪)، آب:متانول (۵۰:۵۰)، آب:متانول (۲۰:۸۰)، آب:اتانول (۵۰:۵۰)، آب:اتانول (۲۰:۸۰)، آب: استون (۵۰:۵۰)، آب:استون (۳۰:۷۰)، آب: اتیل استات (۵۰:۵۰)، کلروفرم:آب (۵۰:۵۰) و آب خالص، جهت استخراج ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری استفاده شد. بیش‌ترین و کم‌ترین محتوای فنلی تام به ترتیب در، عصاره آب:متانول (۲۰:۸۰) به میزان mg/g ۷/۱۷۲ و کلروفرم:آب به میزان mg/g ۰/۷۲ مشاهده شد. همچنین عصاره هیدروالکلی آب: متانول (۲۰:۸۰) بالاترین و عصاره هیدروالکلی کلروفرم:آب (۵۰:۵۰) کم‌ترین محتوای فلاوونوئیدی و درصد مهار رادیکال‌های آزاد را داشت. با توجه به نتایج بدست آمده مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) در میزان ترکیبات فنل تام، فلاوونوئید و میزان آنتی‌اکسیدان بین تمام حلال‌های بکار برده شده وجود داشت.

Table 1. Results of determining the best solvent for extracting phenolic compounds, flavonoids and inhibiting the free radicals of Rosemary extract*

Solvent	Total phenolic (Mg/g of extract)	Flavonoid (Mg/g of extract)	DPPH (Mg/lit of extract)
Water	1.343± 0.001^{i**}	13.426± 0.005^{i}	13.425± 0.005^{l}
Methanol (100%)	2.843± 0.026^{g}	16.236± 0.003^{g}	42.684± 0.004^{g}
Ethanol (100%)	2.434± 0.003^{h}	15.853± 0.003^{h}	38.575± 0.004^{h}
Acetone (100%)	0.81± 0.033^{l}	13.125± 0.003^{k}	23.534± 0.008^{i}

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-22]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.153.13]

Hexane (100%)	0.915± 0.002[k]	13.284± 0.003[j]	15.287± 0.004[j]
Water: Methanol (50:50)	6.26± 0.025[b]	24.360± 0.004[c]	70.237± 0.003[b]
Water: Methanol (20:80)	7.173± 0.001[a]	28.155± 0.004[a]	87.236± 0.003[a]
Water: Ethanol (50:50)	5.15± 0.026[d]	21.114± 0.003[d]	66.285± 0.002[c]
Water: Ethanol (20:80)	5.367± 0.003[c]	25.141± 0.003[b]	59.241± 0.006[d]
Water: Acetone (50:50)	4.525± 0.003[f]	18.355± 0.004[f]	44.440± 0.004[f]
Water: Acetone (30:70)	4.732± 0.003[e]	19.575± 0.002[e]	54.353± 0.003[e]
Water: Ethyl Acetate (50:50)	1.133± 0.003[j]	11.856± 0.003[l]	13.856± 0.003[k]
Water: Chloroform (50:50)	0.722± 0.003[m]	9.254± 0.004[m]	11.565± 0.006[m]

*Data are reported in two replications in terms of (Mean ± SD value).

** The similar small letters (a-m) in each column indicate a significant no difference ($p<0.05$) based on the Duncan test between the data.

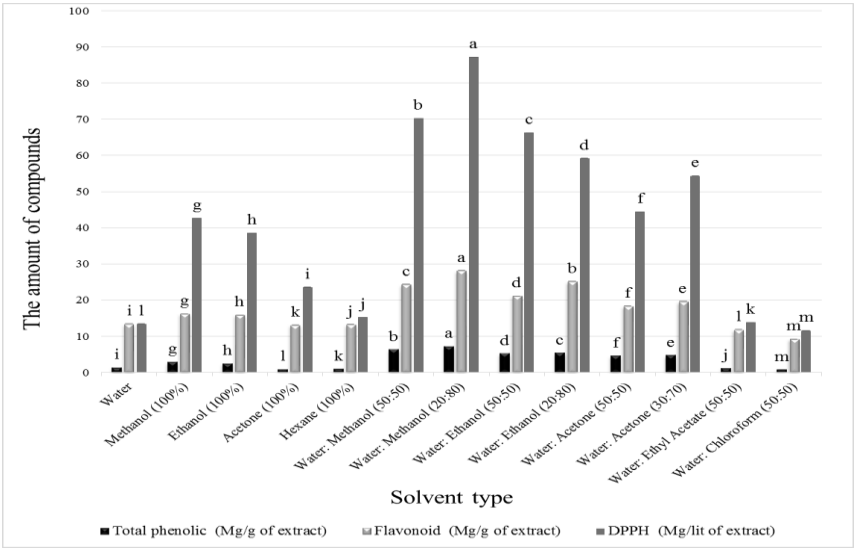

Figure 1. Results of determining the best solvent for extracting phenolic compounds, flavonoids and inhibiting the free radicals of Rosemary extract

استخراج با حلال بیش‌ترین تکنیک برای جداسازی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاهی است. با این وجود، بازده عصاره، محتوای پلی‌فنولیک و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی حاصل از مواد گیاهی به دلیل وجود ترکیبات مختلف آنتی‌اکسیدانی با ویژگی‌های شیمیایی متنوع و قطبیت‌های مختلف که ممکن است محلول یا غیرمحلول باشند در یک حلال خالص، به شدت به ماهیت حلال و روش استخراج بستگی دارد (۲۷, ۲۸). حلال‌های قطبی اغلب برای استخراج پلی‌فنل‌ها از یک ماتریس گیاهی استفاده می‌شوند. مناسب‌ترین این حلال‌ها (گرم یا سرد) مخلوط‌های آبی حاوی اتانول، متانول، استون و اتیل استات هستند (۲۷). سلطانا و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی پوست درخت‌های زیتون تلخ (*Azadirachta indica*)، درخت آکاسیا (*Acacia nilotica*)، درخت جمبو (*Eugenia jambolana*)، گیاه هلیله (*Terminalia arjuna*)، برگ‌ها و ریشه‌های مورینگا اولیفرا (*Moringa oleifera*)، میوه انجیر (*Ficus religiosa*) و برگ‌های آلوئه‌ورا (*Aloe*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-22]
[DOI: 10.22034/FSCT.21.153.13]

barbadensis) فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی بهتری در مقایسه با متانول و اتانول خالص نشان دادند (۲۷)، که نتایج آنها با نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر همخوانی دارد. در همین راستا، عصاره‌های حلال آبی ۵۰ درصد از چای سیاه در ۲، ۸ و ۱۸ ساعت مقدار قابل توجهی از پلی فنل تام و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در مقایسه با نوع خالص حلال نشان دادند (۲۹). با مقایسه محتوای فلاونوئید با محتوای فنلی، حلال آبی متانول همچنین بالاترین فلاوونوئید را از عصاره گیاه رزماری استخراج کرد. مشابه این نتیجه مطالعه‌ای توسط آنوکوورا و همکاران (۲۰۱۱) صورت گرفت که نشان داد محتوای فلاونوئیدی گیاه آکالیفا (*A. Wilkesiana*) در مقایسه با محتوای فنلی، حلال متانول بالاترین فلاوونوئید را استخراج کرد، همچنین در مطالعه آنها نشان داده شد که فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی به شدت به حلال بکار رفته در استخراج عصاره بستگی دارد (۲۹). مطالعه حاضر نشان می‌دهد که میزان فلاونوئید، فنل‌ها و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به نوع حلال مورد استفاده برای استخراج بستگی دارد که بهترین نوع حلال بکار رفته در این بررسی حلال آبی متانول با نسبت (۲۰:۸۰) برای هر سه فاکتور بود.

نتایج این مقاله، با روش DPPH نشان داد که عصاره متانولی ٤٢/٦٨٥ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است و حلال آب: متانول (۲۰:۸۰) بالاترین محتوای آنتی‌اکسیدانی را دارا است و کم‌ترین میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مربوط به عصاره حلال کلروفرم:آب (۵۰:۵۰) بود. فلاونوئیدها ترکیبات پلی‌فنلی هستند که بطور عمده در گیاهان یافت می‌شوند و به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان و ضد رادیکال قوی ظاهر می‌شوند. تحقیقات نشان داده‌اند افزایش سطح فلاونوئیدها در رژیم غذایی انسان‌ها، می‌توانند منجر به کاهش برخی بیماری‌ها در انسان گردد (۳۰). استاکوویک و همکاران (۲۰۱۱) عصاره آبی و متانولی قسمت‌های مختلف گیاه سیزاب کوهستان (*Tecurium Montanum*) را از نظر محتوی فنلی و فلاوونوئیدی بررسی نمودند و در این پژوهش به این نتیجه رسیدند که محتوی فنلی و فلاوونوئیدی عصاره آبی بیشتر از عصاره متانولی است (۳۱). میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی مختلف با توجه به ساختار شیمیایی آن‌ها متفاوت است. علاوه براین، در طی فرآیند استخراج ترکیبات دیگری که حلالیت بالایی در محلول‌های الکلی دارند، همراه با ترکیبات فنولی وارد عصاره می‌شوند. در زمینه استخراج ترکیبات فنولی عصاره اتانولی رزماری اثرات مؤثری روی توقف تکثیر سلول‌های سرطانی در سرطان پستان و لوسمی و همچنین فعالیت ضدالتهابی نشان داد (۲۵). دلیل کم بودن محتوای مواد فنلی در عصاره‌های آب نیز می‌تواند در افزایش فعالیت آنزیم‌ها (پلی‌فنل‌اکسیداز) باشد که باعث تخریب مواد فنلی می‌شود، در حالی که در محیط الکلی این آنزیم‌ها غیرفعال هستند. استفاده از اتانول خالص به عنوان حلال باعث کاهش راندمان استخراج پلی‌فنول‌ها می‌شود، به دلیل تعدادی از گروه‌های هیدروکسیل (مانند فلاونوئیدها، به ویژه آنهایی که حاوی قند در مولکول هستند)، آب دوست هستند و بطور کلی در محلول‌های آب-اتانول محلول‌تر از محلول‌های الکلی خالص هستند (۳۲).

۲-۳ درصد ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدی و مهار رادیکال‌های آزاد در گیاه رزماری با روش‌های مختلف عصاره‌گیری

ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدی و مهار رادیکال‌های آزاد در گیاه رزماری با روش‌های مختلف عصاره‌گیری، شامل روش‌های ماسراسیون، روش عصاره‌گیری گرم، روش پرکولاسیون، روش مداوم (سوکسله) و سونیکاسیون انجام شدند. نتایج بدست آمده از استخراج ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدی و مهار رادیکال‌های آزاد در گیاه رزماری با استفاده از روش‌های مختلف عصاره‌گیری ارائه شده در جدول (۲) نشان می‌دهد که روش عصاره‌گیری ماسراسیون و گرم نسبت به سایر روش‌ها برتری دارند، بطوری که روش ماسراسیون در هر سه فاکتور اندازه‌گیری شده با سایر روش‌های استخراج اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$). ولی جهت استخراج ترکیبات فنلی تام استفاده از دمای

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-22]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.153.13]

روش ماسراسیون، استخراج را افزایش می‌دهد (نمودار شماره ۲).

Table 2. Results of determining the best methods for extracting phenolic compounds, flavonoids and inhibiting the free radicals of Rosemary extract*

Methods	Total phenolic (Mg/g of extract)	Flavonoid (Mg/g of extract)	DPPH (Mg/lit of extract)
Maceration	7.486± 0.006[a**]	47.852± 0.003[a]	73.524± 0.003[a]
Hot extraction	6.151± 0.003[b]	32.753± 0.006[b]	66.828± 0.004[b]
Percolation	3.33± 0.11[d]	28.57± 0.043[c]	44.160± 0.004[e]
Soxhlet extraction	3.176± 0.003[d]	22.246± 0.024[d]	47.114± 0.003[d]
Sonication	5.525± 0.002[c]	17.623± 0.033[e]	50.748± 0.004[c]

*Data are reported in two replications in terms of (Mean ± SD value).

** The similar small letters (a-e) in each column indicate a significant no difference ($p<0.05$) based on the Duncan test between the data.

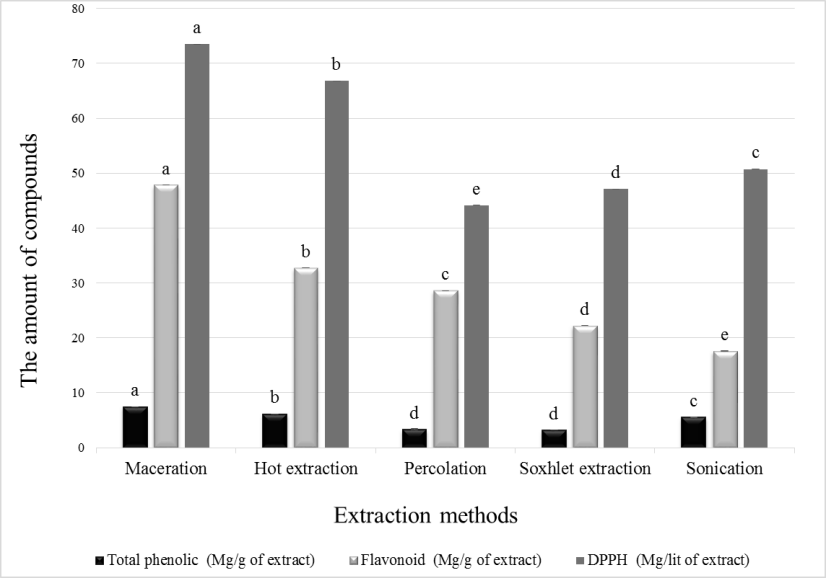

Figure 2. Results of determining the best methods for extracting phenolic compounds, flavonoids and inhibiting the free radicals of Rosemary extract

فرآیندهای استخراج ترکیبات فنلی یک فاکتور اصلی در خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره است اما دما، قدرت استخراج کنندگی حلال، زمان و روش اتخاذ برای استخراج بطور قابل توجهی ترکیب عصاره را تحت تاثیر قرار می‌دهد. گیاهان حاوی ترکیبات متعددی هستند که ساختارهای متفاوتی دارند. استخراج این ترکیبات به عوامل متعددی بستگی دارد که مهم‌ترین آنها حلال و روش استخراج می‌باشد. انتخاب حلال و روش استخراج بستگی به قسمت‌های مختلف یک گیاه و نیز مواد متشکله آن دارد. نقش کلیدی ترکیبات فنلی به عنوان حذف کننده‌های رادیکالی در چندین مقاله گزارش شده است (۳۳). روش استفاده از دستگاه سوکسله کمترین کارایی را در استخراج نشان داد و این نمایانگر این امر است که در روش سوکسله، دمای بالا منجر به تخریب برخی ترکیبات می‌شود. مقایسه نتایج این تحقیق با تحقیقات دیگر نشان می‌دهد که گرچه برای

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-22]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.153.13]

استخراج اسید شیکوریک[9] و اسید کافئیک استفاده از همزن و روش سونیکاسیون در دمای اتاق مناسب است (۱۷). در مطالعه‌ای از نه روش استخراج برای ساپونین‌های تام استفاده شده که بهترین روش گزارش شده در آن مطالعه روش پرکولاسیون بود (۳٤)، که با مطالعه حاضر همخوانی ندارد.

۳-۳ درصد ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره گیاه رزماری با اندازه ذره‌ای متفاوت

میانگین نتایج تعیین بهترین اندازه ذره‌ای پودر گیاه رزماری جهت استخراج ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدی و آنتی-اکسیدانی موجود در عصاره گیاه رزماری در جدول (۳) گزارش شده است و همچنین نتایج بصورت نمودار در شکل (۳) نشان داده شده است. نتایج حاصل از آزمون اندازه ذره‌ای متفاوت در استخراج ترکیبات نشان می‌دهد با کاهش اندازه ذره‌ای، کارآیی استخراج افزایش می‌یابد بطوری که استفاده از پودر گیاه با اندازه ذره‌ای ۳۰۰ میکرومتر بهترین کارآیی را در استخراج ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدی و مهار رادیکال‌های آزاد در گیاه رزماری داشت ($p < ۰/۰۵$)، که علت این امر را می‌توان به شکستن بیشتر دیواره سلولی گیاه در اثر ریز شدن بیشتر و بالطبع نفوذ بیشتر حلال به داخل گیاه نسبت داد.

Table 3. Results of determining the best particle size for extracting phenolic compounds, flavonoids and inhibiting the free radicals of Rosemary extract*

Particle size (Micrometer)	Total phenolic (Mg/g of extract)	Flavonoid (Mg/g of extract)	DPPH (Mg/lit of extract)
300	7.217± 0.006^{a**}	4.894± 0.006^{a}	8.596± 0.006^{a}
500	5.288± 0.006^{b}	3.250± 0.006^{b}	7.123± 0.010^{b}
800	4.462± 0.006^{c}	1.478± 0.004^{c}	5.016± 0.032^{c}

*Data are reported in two replications in terms of (Mean ± SD value).

** The similar small letters (a-c) in each column indicate a significant no difference ($p<0.05$) based on the Duncan test between the data.

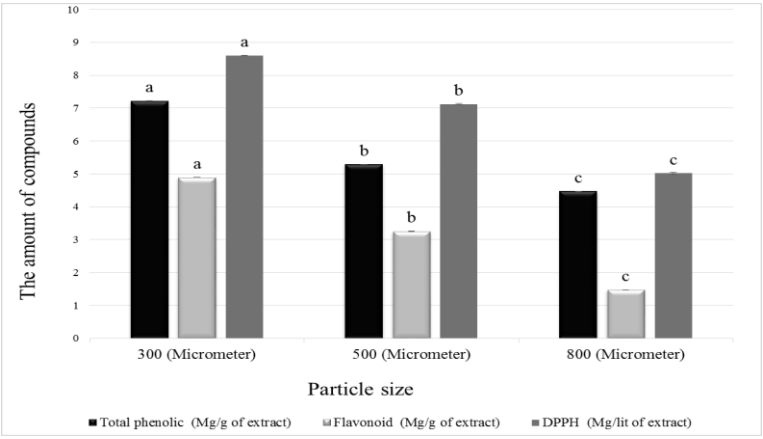

Figure 3. Results of determining the best particle size for extracting phenolic compounds, flavonoids and inhibiting the free radicals of Rosemary extract

9 -Cichoric acid

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-22]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.153.13]

اندازه ذرات احتمالاً مهم‌ترین فاکتور مربوط به ماده اولیه است که بر استخراج ترکیبات فنلی تأثیر می‌گذارد. کاهش اندازه ذرات باعث افزایش سطح ماده گیاهی در تماس با حلال و در نتیجه سرعت انتقال جرم می‌شود (۳۵). از این‌رو کاهش اندازه ذرات نیز به عنوان یک فاکتور مثبت برای بهبود استخراج ترکیبات پلی‌فنل‌ها نشان داده شده است (۳٦). در مطالعه پینلو و همکاران (۲۰۰۷) اندازه ذرات قهوه (۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومتر) را جهت بررسی میزان استخراج ترکیبات پلی‌فنل‌ها بررسی کردند که نتایج آنها ارتباط مستقیم کاهش ذرات در افزایش استخراج ترکیبات را نشان داد (۳۷)، که نتایج انها با مطالعه حاضر مطابقت دارد. از این‌رو می‌توان بیان کرد که یکی از پارامترهای تأثیرگذار بر فرآیندهای صنعتی مورد استفاده برای استخراج، اندازه ذرات ماده است. احتمالاً وقتی اندازه ذرات کاهش می‌یابد، سطح قابل دسترس برای حلال استخراجی و حمله آنزیم افزایش می‌یابد، و در نتیجه افزایش بازده استخراج مشاهده می‌شود (۳۷). اثر مثبت کاهش اندازه ذرات قبلاً در سایر مطالعات در مورد استخراج فنولیک گزارش شده بود، این نتایج در سایر مواد گیاهی مانند تفاله انگور سیاه و کوهوش سیاه نیز نتایج بسیار مثبتی را به همراه داشته است (۳٦, ۳۸). با اینحال، اثرات مثبت کاهش اندازه ذرات همیشه آشکار نیستند، زیرا کاهش اندازه ذرات می‌تواند دسترسی حلال به تمام نواحی سطح جامد را مسدود کرده و ترکیبات فنل را آزاد کند (۳۹). علاوه براین، آسیاب کردن که معمولاً برای بدست آوردن ذرات ریزتر استفاده می‌شود، ممکن است باعث پارگی سلول‌های گیاه و در نتیجه آزاد شدن برخی از ترکیبات فنلی واقع در داخل سلول شود (۳۵). آسیاب کردن رزماری به اندازه ذرات در محدوده ۰/۸-۰/۲ میلی‌متر، بسته به حلال و ترکیب استخراج شده، باعث افزایش عملکرد فنل تام، رزمارینیک اسید و اسید کارنوزیک ۲ تا ۱۰ برابر شد (۱٤). مطابق با نتایج و گزارشات بیان شده، توزیع اندازه ذرات به عنوان یک تأثیر چشمگیر در استخراج ترکیبات فنلی یافت شد، که میزان استخراج این ترکیبات و ویژگی آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد هنگامی که اندازه ذرات کوچک‌تر استفاده می‌شود.

٤-۳ درصد ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره گیاه رزماری با نسبت‌های متفاوت گیاه: حلال

نتایج به دست از آمده این آزمایش در جدول (٤) نشان می‌دهد که بهترین نسبت گیاه به حلال جهت استخراج ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی در عصاره گیاه رزماری که مقدار۱، ۲، ۳، ٤، ۵ گرم از پودر این گیاه به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسید یعنی نسبت‌های ۱:۱۰۰، ۲:۱۰۰، ۳:۱۰۰، ٤:۱۰۰ و ۵:۱۰۰ از گیاه به حلال حاصل شد، نسبت ۱:۱۰۰ مطابق نتایج مشاهده شده در جدول (٤) و شکل (٤) باعث استخراج بهینه این ترکیبات شده است و با سایر نسبت‌های جامد به حلال اختلاف معنی‌داری در هر سه فاکتور وجود داشت ($p <$ ۰/۰۵). همانطور که در نتایج مشاهده گردید با افزایش نسبت جرم به حلال میزان استخراج کاهش معنی‌داری داشت ($p <$ ۰/۰۵). البته لازم به ذکر است که این نتایج با ثابت نگه داشتن شرایط بهینه تعیین شده در مراحل قبل همین پژوهش با حداکثر میزان استخراج یعنی نوع حلال (متانول ۸۰ درصد)، روش استخراج (ماسراسیون) و اندازه ذرات (۳۰۰ میکرومتر) بدست آمد.

Table 4. Results of determining the best plant to solvent ratio for extracting phenolic compounds, flavonoids and inhibiting the free radicals of Rosemary extract*

Plant to solvent ratio Methanol (80%)	Total phenolic (Mg/g of extract)	Flavonoid (Mg/g of extract)	DPPH (Mg/lit of extract)
1:100 (g/ml)	7.358± 0.006[a**]	5.988± 0.007[a]	9.115± 0.007[a]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-22]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.153.13]

2:100 (g/ml)	6.183± 0.006[b]	5.680± 0.009[b]	7.907± 0.012[b]
3:100 (g/ml)	5.478± 0.049[c]	3.668± 0.008[c]	7.648± 0.009[c]
4:100 (g/ml)	5.145± 0.005[d]	3.660± 0.01[c]	5.269± 0.008[d]
5:100 (g/ml)	3.689± 0.006[e]	2.142± 0.011[d]	2.845± 0.012[e]

*Data are reported in two replications in terms of (Mean ± SD value).

** The similar small letters (a-e) in each column indicate a significant no difference ($p<0.05$) based on the Duncan test between the data.

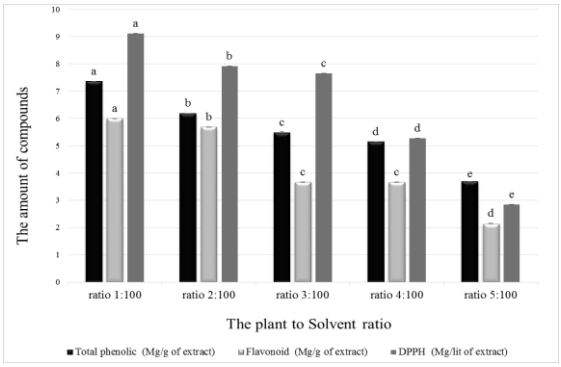

Figure 4. Results of determining the best plant to solvent ratio for extracting phenolic compounds, flavonoids and inhibiting the free radicals of Rosemary extract

استخراج یک مرحله بسیار مهم در جداسازی و همچنین شناسایی ترکیبات فنلی است. در نتیجه، بسیاری از محققان تأثیر شرایط مختلف استخراج بر عملکرد استخراج ترکیبات فنلی از منابع طبیعی را مطالعه کرده‌اند (۳۲). با افزایش نسبت جامد به حلال، مقدار فنول‌های تام، فلاوونوئیدها و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کاهش معنی‌داری یافت ($p <$ ۰/۰۵). نسبت جامد/مایع از نظر سودآوری فرآیند یک پارامتر عملیاتی مهم است، که تا حد زیادی بر هزینه‌های عملیاتی استخراج گیاهان تأثیر می‌گذارد. افزایش مقدار حلال باعث ایجاد تعاملات مطلوبی می‌شود که بین زیست توده و حلال به دلیل افزایش تماس بین دو ماده اتفاق می‌افتد، از این‌رو باعث افزایش استخراج تا رسیدن به تعادل می‌شود، علاوه براین، در این مرحله، ممکن است اشباع حلال نیز اتفاق بیفتد و مقدار املاح قابل استخراج بیشتر را محدود کند (۴۰). علاوه براین، نسبت بالای جامد/مایع (مقدار جامد کم‌تر) باعث افزایش شیب غلظت می‌شود و این مستقیماً با سرعت انتشار متناسب است و همانطور که در قانون فیک بیان شده است، این توانایی استخراج حلال را افزایش می‌دهد (۴۱). در همین راستا، مطالعه اُزترک و همکاران (۲۰۱۸) نشان داد که افزایش نسبت جامد/مایع از (mg/ml) ۱:۵ به ۱:۱۰ مقدار ترکیبات پلی‌فنول تام (TPC) عصاره‌ها را برای بیشتر حلال‌ها افزایش داد، آنها همچنین بیان کردند که گرچه نسبت (mg/ml) ۱:۲۰ بطور کلی منجر به TPC بالاتر برای همه اجزای مورد مطالعه می‌شود، پلی‌فنول‌های غلیظ کمتری به دست می‌آیند و استفاده از مقادیر بالاتر حلال ممکن است از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نباشد؛ از این‌رو نسبت (mg/ml) ۱:۱۰ را به عنوان نسبت مطلوب برای افزایش بازده استخراج پلی‌فنول‌ها به عنوان حلال‌های استخراج انتخاب کردند (۴۰). نسبت بالاتر حلال به جامد به دلیل اختلاف بیشتر غلظت بین ماتریس جامد و فاز بالای حلال، پدیده‌های انتقال جرم را تسریع می‌کند. در نتیجه، عصاره‌گیری با سرعت بیشتری انجام می‌شود، و غلظت ترکیبات فنلی موجود در عصاره بالاتر است (۳۵). یانگ و ژانگ (۲۰۰۸) نتیجه گرفتند که نسبت بهینه برای بازیابی کوئرستین و روتین از یک گیاه

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-22]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.153.13]

دارویی چینی (ml/g) ۱:۴۰ است، در حالی که نسبت بالاتر بازدهی بالاتری را ارائه نداد (۴۲). بطور کلی، محققان سعی می‌کنند از نسبت حلال به جامد پایین برای به حداقل رساندن هزینه فرآیند استفاده کنند. نسبت (ml/g) ۱:۲۰ برای استخراج ترکیبات فنلی آنتی‌اکسیدانی از پونه کوهی (۴۳) و مریم گلی (۴۴) اثبات شد.

٤- نتیجه‌گیری

گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) منبع بالقوه غنی از پلی‌فنل است. پارامترهای تأثیرگذار بر فرآیندهای مورد استفاده جهت استخراج ترکیبات فنلی مانند نوع حلال، ترکیب حلال، نسبت جامد به حلال، اندازه ذرات ماده استخراج شده، می‌باشند. بنابراین، برآورد شرایط عملیاتی بهینه برای استخراج ضروری است. در مطالعه حاضر برای دستیابی به حداکثر میزان استخراج ترکیبات فنلی تام، فلاوونوئید و آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره گیاه رزماری، استفاده از پودر گیاه با اندازه ذرات ۳۰۰ میکرومتر، حلال آب: متانول (۲۰:۸۰)، نسبت گیاه به حلال (g/ml) ۱۰۰: ۱ و استفاده از روش ماسراسیون باید به عنوان شرایط عملیاتی مطلوب استفاده شود.

٥-منابع

[1] Nieto G, Huvaere K, Skibsted LH. Antioxidant activity of rosemary and thyme by-products and synergism with added antioxidant in a liposome system. European Food Research and Technology. 2011;233(1):11-8.

[2] del Baño MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-García O, Marín MP, Del Río JA, et al. Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of Rosmarinus officinalis. Postulation of a biosynthetic pathway. Journal of agricultural and food chemistry. 2004;52(16):4987-92.

[3] Nieto G, Ros G, Castillo J. Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (Rosmarinus officinalis, L.): A Review. Medicines. 2018;5(3):98.

[4] Botsoglou N, Christaki E, Fletouris D, Florou-Paneri P, Spais A. The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. Meat science. 2002;62(2):259-65.

[5] Lakshmanashetty RH, Nagaraj VB, Hiremath MG, Kumar V. In vitro antioxidant activity of Vitex negundo L. leaf extracts. Chiang Mai J Sci. 2010;37(3):489-97.

[6] Fathiazad F, Ahmadi-Ashtiani H, Rezazadeh S, Jamshidi M, Mazandarani M, Khaki A. Study on phenolics and antioxidant activity of some selected plant of Mazandaran Province. Journal of Medicinal Plants. 2010;9(34):177-83.

[7] Abdelli M, Moghrani H, Aboun A, Maachi R. Algerian Mentha pulegium L. leaves essential oil: chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities. Industrial Crops and Products. 2016;94:197-205.

[8] Nagy M, Tofana M, Socaci SA, Pop AV, Bors MD, Farcas A, et al. Total phenolic, flavonoids and antioxidant capacity of some medicinal and aromatic plants. Bulletin UASVM Food Science and Technology. 2014;71(2):209-10.

[9] Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Boskou D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (Citrus sinensis). Food chemistry. 2006;94(1):19-25.

[10] Puangsombat K. Formation and inhibition of heterocyclic amines in meat products: Kansas State University; 2010.

[11] Karaman Ş, Tütem E, Başkan KS, Apak R. Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC–CUPRAC assay. Food Chemistry. 2010;120(4):1201-9.

[12] **Nasri Z**. Cross-flow multi-stage process for extracting phenolic and antioxidant compounds from rosemary on a semi-industrial scale

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-22]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.153.13]

[13] Journal of Innovative Food Technologies 2018;5(3):427-46.

[14] Authority EFS. Use of rosemary extracts as a food additive-Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food. EFSA Journal. 2008;6(6):721.

[15] Rodríguez-Rojo S, Visentin A, Maestri D, Cocero MJ. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. Journal of Food Engineering. 2012;109(1):98-103.

[16] Del Bano MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-García O, Del Rio JA, Ortuño A, et al. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of Rosmarinus officinalis. Antioxidant activity. Journal of agricultural and food chemistry. 2003;51(15):4247-53.

[17] Wellwood CR, Cole RA. Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, Rosmarinus officinalis (L.), accessions for optimization of antioxidant yield. Journal of agricultural and food chemistry. 2004;52(20):6101-7.

[18] Yesil-Celiktas O, Nartop P, Gurel A, Bedir E, Vardar-Sukan F. Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from Rosmarinus officinalis' calli. Journal of plant physiology. 2007;164(11):1536-42.

[19] Jamshidi M, Ahmadi A, Rezazadeh S, Fathi Azad F. Study and comparison of phenolic compounds and antioxidant activity of some native plant species of Mazandaran. Quarterly J Med Plants. 2010;9(34):178-83.

[20] Weerakkody NS, Caffin N, Turner MS, Dykes GA. In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. Food Control. 2010;21(10):1408-14.

[21] Şahin S, Şamlı R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. Ultrasonics Sonochemistry. 2013;20(1):595-602.

[22] Anokwuru C, Anyasor G, Ajibaye O, Fakoya O, Okebugwu P. Effect of extraction solvents on phenolic, flavonoid and antioxidant activities of three nigerian medicinal plants. Nature and Science. 2011;9(7):53-61.

[23] Kasparavičienė G, Ramanauskienė K, Savickas A, Velžienė S, Kalvėnienė Z, Kazlauskienė D, et al. Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of different Rosmarinus officinalis L. ethanolic extracts. Biologija. 2013;59(1).

[24] Hirondart M, Rombaut N, Fabiano-Tixier AS, Bily A, Chemat F. Comparison between pressurized liquid extraction and conventional Soxhlet extraction for rosemary antioxidants, yield, composition, and environmental footprint. Foods. 2020;9(5):584.

[25] Sharma Y, Velamuri R, Fagan J, Schaefer J. Full-Spectrum Analysis of Bioactive Compounds in Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) as Influenced by Different Extraction Methods. Molecules. 2020;25(20):4599.

[26] Yesil-Celiktas O, Girgin G, Orhan H, Wichers H, Bedir E, Vardar-Sukan F. Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of Rosmarinus officinalis extracts with focus on location and harvesting times. European Food Research and Technology. 2007;224(4):443-51.

[27] Al-Farsi M, Alasalvar C, Morris A, Baron M, Shahidi F. Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (Phoenix dactylifera L.) varieties grown in Oman. Journal of agricultural and food chemistry. 2005;53(19):7592-9.

[28] Sultana B, Anwar F, Ashraf M. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. Molecules. 2009;14(6):2167-80.

[29] Jakopic J, Veberic R. Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. Acta Agriculturae Slovenica. 2009;93(1):11.

[30] Turkmen N, Velioglu YS, Sari F, Polat G. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-22]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.153.13]

antioxidant and antibacterial activities of black tea. Molecules. 2007;12(3):484-96.

[31] Fathi H, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant and free radical scavenging activities of Hypericum perforatum L.(st. John's wort). International Journal of Forest, Soil and Erosion (IJFSE). 2013;3(2):68-72.

[32] Stankovic MS, Niciforovic N, Topuzovic M, Solujic S. Total phenolic content, flavonoid concentrations and antioxidant activity, of the whole plant and plant parts extracts from Teucrium montanum L. var. montanum, f. supinum (L.) Reichenb. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2011;25(1):2222-7.

[33] Jokic S, Velic D, Bilic M, Bucic-Kojic A, Planinic M, Tomas S. Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. Czech Journal of Food Sciences-UZEI (Czech Republic). 2010.

[34] Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food chemistry. 2006;94(4):550-7.

[35] 34. Phrompittayarat W, Putalun W, Tanaka H, Jetiyanon K, Wittaya-areekul S, Ingkaninan K. Comparison of various extraction methods of Bacopa monnieri. Naresuan university journal: science and technology (NUJST). 2013;15(1):29-34.

[36] Oreopoulou A, Tsimogiannis D, Oreopoulou V. Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants: an overview of the methods and the effect of extraction parameters. Polyphenols in plants. 2019:243-59.

[37] Landbo A-K, Meyer AS. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (Ribes nigrum). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001;49(7):3169-77.

[38] Pinelo M, Tress AG, Pedersen M, Arnous A, Meyer AS. Effect of cellulases, solvent type and particle size distribution on the extraction of chlorogenic acid and other phenols from spent coffee grounds. Am J Food Technol. 2007;2(7):641-51.

[39] Mukhopadhyay S, Luthria DL, Robbins RJ. Optimization of extraction process for phenolic acids from black cohosh (Cimicifuga racemosa) by pressurized liquid extraction. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2006;86(1):156-62.

[40] Pinelo M, Del Fabbro P, Manzocco L, Nuñez MJ, Nicoli MC. Optimization of continuous phenol extraction from Vitis vinifera byproducts. Food chemistry. 2005;92(1):109-17.

[41] Ozturk B, Parkinson C, Gonzalez-Miquel M. Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents. Separation and Purification Technology. 2018;206:1-13.

[42] Chew K, Khoo M, Ng S, Thoo Y, Aida WW, Ho C. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of Orthosiphon stamineus extracts. International Food Research Journal. 2011;18(4):1427.

[43] Yang Y, Zhang F. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from Euonymus alatus (Thunb.) Sieb. Ultrasonics sonochemistry. 2008;15(4):308-13.

[44] Majeed M, Hussain AI, Chatha SA, Khosa MK, Kamal GM, Kamal MA, et al. Optimization protocol for the extraction of antioxidant components from Origanum vulgare leaves using response surface methodology. Saudi Journal of Biological Sciences. 2016;23(3):389-96.

[45] Dong J, Liu Y, Liang Z, Wang W. Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from Salvia miltiorrhiza root. Ultrasonics Sonochemistry. 2010;17(1):61-5.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-22]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.153.13]

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Comparison between different techniques for extracting rosemary extract: solvent, extraction method, particle size, plant to solvent ratio

Zahra Latifi[1], Feryal Khademi[2], Romina Mohebi[3], Maryam Mohsen Soltani[4], Zahra Esparvarini[5], Niloufar Alavi[6], Mahtab Vakilian[7*]

1-Ph.D. Student, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Nour Branch, Nour, Iran.
2-MSc Student, Department of Food Science and Technology, Department of Ayatollah Amoli Amol, Islamic Azad University, Amol, Iran.
3-Graduated Student of the Department of Food Science and Technology, Shahre Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4-Bachelor Degree, Department of Food Science and Technology, Department of Ayatollah Amoli Amol, Islamic Azad University, Amol, Iran.
5- MS.C.Student, Department of Hygiene and Food quality control, Bu-Alisina university, Hamedan, Iran.
6 -Bachlor of Science in food Science and Technology, Facuity of Engineering, Neyshabour Girls, Neyshabour , Iran.
7-Master of Science, Department of Food Science and Technology, Varamin Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:
Received:2019/5/13
Accepted:2021/3/8

Keywords:

Antioxidant,

Flavonoid Compounds,

Phenolic Compounds,

Rosemary Plant Extract

DOI: **10.22034/FSCT.21.153.13.**

*Corresponding Author E-M.vakilian68@gmail.com

ABSTRACT

Rosemary is a plant from the *Lamiaceae* family with antioxidant properties, Therefore, the purpose of this study was to extract rosemary plant extract using different solvents, methods (maceration, hot extraction, Soxhlet, percolation and sonication), particle size (300, 500 and 800 µm) and plant to solvent ratios (1:100, 2:100, 3:100, 4:100 & 5:100) were. In this experimental study, the amount of phenolic and flavonoid compounds was measured by aluminum chloride colorimetric method and the antioxidant activity of plant extracts was evaluated by DPPH method. To extract these compounds, different solvents and methods were used and compared and analyzed and Data analysis was performed using SPSS software and ANOVA test. The best solvents for the extraction of phenolic, flavonoid and antioxidant compounds were water-methanol (20:80). The amount of total phenolic compounds using this solvent was 7.172 (mg/g) and flavonoid compounds were 28.157 (mg/g) and the antioxidant activity to inhibit free radicals was 87.2586 (mg/lit). The best method for extracting phenolic compounds was Maceration method with a rate of 7.481 (mg/g) and for flavonoid compounds with a rate of 47.85 (mg/g) and 73.524 (mg/lit) to inhibit free radicals.The results show that in order to achieve the maximum extraction of total phenolic compounds, flavonoids and antioxidants in rosemary extract, use plant powder with a particle size of 300 µm, water solvent: methanol (80:20), plant to solvent ratio 1:100 (g/ml) and the use of maceration method should be used as optimal operating conditions.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-22]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.153.13]