تعیین مقادیر ترکیبات فنولی و فعالیت رادیکال گیرندگی عصاره استخراج شده از برگ‌های گیاه چویل (*Ferulagoangulata*) با تکنیک مایکروویو و روش غرقابی

عبدالرضا آقاجانی[۱]، سید علی مرتضوی[۲*]، فریده طباطبایی یزدی[۲]، مسعود شفافی زنوزیان[۱]، محمدرضا سعیدی اصل[۱]

۱- دانشگاه آزاداسلامی، واحد سبزوار، گروه علوم و صنایع غذایی، سبزوار، ایران
۲- استاد گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۷)

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی مقادیر ترکیبات فنولی و فعالیت رادیکال‌گیرندگی گیاه چویل به عنوان جایگزین آنتی اکسیدان های سنتزی انجام شد. بدین منظور، عصاره‌گیری از پودر برگ‌های چویل با دو روش خیساندن (زمان ۱۲ ساعت) و مایکروویو (۶۰ ثانیه) و با کمک حلال‌های اتانول و آب (با نسبت‌های ۰: ۱۰۰؛ ۲۵: ۷۵؛ ۵۰: ۵۰ از هر دو حلال) و سنجش میزان کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به روش اسپکتروفتومتری صورت گرفت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه با استفاده از روش مهار رادیکال آزاد ۲، ۲ ـ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازین (DPPH) اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SPPS نسخه ۲۴ و روش آزمون آنالیز واریانس انجام گردید. نتایج نشان داد که بین عصاره‌های استخراج شده با دو روش و حلال‌های اتانول و آب، تفاوت کاملاً معنی‌داری وجود داشت ($p<0.01$). بالاترین فلاونوئید (۰/۰۰۸±۰/۷۵ میلی‌گرم معادل روتین به گرم نمونه خشک) و بالاترین فعالیت رادیکال‌گیرندگی (۰/۱±۱/۰۴ درصد) مربوط به عصاره‌های استخراج شده با مایکروویو با نسبت اتانول به آب برابر با ۰ : ۱۰۰ درصد بود. در مقابل، بالاترین فنول کل (۰/۰۹±۳/۶۶۵ میلی گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک) در عصاره‌های استخراج شده با روش خیساندن و نسبت اتانول به آب برابر با ۰ : ۱۰۰ درصد به دست آمد. در هر دو روش استخراج، میزان استخراج تحت تأثیر نسبت حلال‌ها قرار داشت و حلال آب، کارامدتر از اتانول بود.

کلید واژگان: آنتی‌اکسیدان، خیساندن، چویل، فنول، مایکروویو.

*مسئول مکاتبات: Mortazavi_s.a@yahoo.com

۱- مقدمه

چویل[1] با نام علمی *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss و موسوم به چویر[2]، گارچی[3] در زبان فارسی، از خانواده کرفسیان و جنس Ferula [۱]، گیاهی علفی و چندساله است [۲]. چویل یکی از مهمترین گیاهان دارویی و معطر در ایران و کشورهایی نظیر ترکیه، عراق، استرالیا و یوگسلاوی، یونان، صربستان و مقدونیه می‌باشد [۳]. این گیاه منبع غنی فیتواسترول‌ها و ترکیبات پلی‌فنول نظیر آلفا- پینن، بتا - پینن، بورنیل‌استات، پی- سیمن، ترپنن- ٤- اُل، سیس- اُسیمن، فلاونوئیدها به ویژه فلاونول است که دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدباکتریایی است. اثرات ضدقارچی، ضد انگلی، ضدلاروی عصاره و اسانس حاصل از چویل گزارشات مختلفی وجود دارد (٤). استخراج به روش خیساندن از جمله تکنیک‌هایی است که به کمک حلال‌هایی با قطبیت‌های متفاوت انجام می‌گیرد و موجب استخراج طیف وسیعی از مواد شیمیایی می‌شود [٥]. استخراج با این روش به طور معنی‌داری تحت تأثیر حلال صورت می‌گیرد [٦]. امروزه در کنار روش‌های معمول استخراج، روش‌هایی مانند مایکروویو و فراصوت نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند. تکنیک مایکروویو، نوعی از استخراج است که به عنوان روش «دوست دار محیط زیست» معرفی شده است [۷]. کاهش طول زمان عصاره‌گیری از مهمترین مزایای استخراج با مایکروویو است [۸]. این روش بازده عصاره گیری را هم افزایش می‌دهد، اگرچه این مورد در استخراج بعضی از ترکیبات زیست فعال اتفاق نمی‌افتد [۹]. اما در مقابل، گرمای ایجاد شده می‌تواند به ترکیبات حساس به حرارت آسیب برساند. همچنین، این روش برای استخراج ترکیبات با قطبیت پائین مناسب نیست و فیلتراسیون انتهایی مورد نیاز بعد از به کارگیری این روش از دیگر معایب آن محسوب می‌شود [۱۰]. نتایج مطالعه گزیاو و همکاران (۲۰۰۸) [۱۱] در بررسی تأثیر زمان‌های مختلف اشعه‌دهی امواج مایکروویو (۵ الی ۳۰ دقیقه) بر میزان استخراج فلاونوئیدها از گیاه آستراگالوس[4] نشان داد که بازده فلاونوئیدها در ابتدا با افزایش زمان اشعه‌دهی افزایش یافت و به بیشترین مقدار خود (۱/۰۳۳ میلی گرم به گرم) در ۲۵ دقیقه رسید و بعد از آن، به تدریج کاهش یافت. با توجه به اهمیّت ترکیبات فنولی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره یا اسانس گیاهان دارویی و استخراج این اجزاء فراسودمند، تعیین مقادیر ترکیبات مذکور و نیز انتخاب روش استخراج بهینه آنها می‌تواند نقش مؤثری را در افزایش کارایی استخراج و دستیابی به سطوح بیشتر و یا غلیظ‌تر ترکیبات زیست فعال ایفا نماید. از طرفی، نظر به بومی بودن گیاه چویل در ایران، دسترسی آسان و ارزان و مصرف غذایی و دارویی این گیاه از زمان‌های دور در کشور، این مطالعه می‌تواند مقدمه‌ای جهت استفاده عملی از عصاره‌های این گیاه (منبع ترکیبات فنولی) به عنوان آنتی‌اکسیدان در صنایع غذایی و دارویی باشد تا بدین طریق هم امکان استفاده از یک منبع سهل الوصول و مقرون به صرفه فراهم گردد و هم از هدر رفتن محصول و خسارت های ناشی از آن جلوگیری شود. با توجه به این موضوع، پژوهش حاضر با هدف مقایسه مقادیر فنول کل، فلاونوئیدها و قدرت به دام انداختن رادیکال‌های آزاد ۲،۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)[5] عصاره استخراج شده از پودر برگ‌های گیاه چویل با امواج مایکروویو و روش خیساندن انجام گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- آماده‌سازی نمونه

پس از تأیید گونه گیاه چویل توسط محققین بخش هرباریوم مؤسسه جنگل‌ها و مراتع ایران (استان البرز، کرج)، سرشاخه‌های هوایی گیاه پس از خشک‌شدن در سایه، آسیاب شده و به بخش عصاره‌گیری (آزمایشگاه پارک علم و فناوری دانشگاه تهران، واقع در کرج) انتقال یافت.

۲-۱-۱- روش خیساندن (غرقابی)

در روش خیساندن، از حلال‌های آب و اتانول ۹٦ درصد استفاده شد. برای این منظور ۱۰۰ گرم از برگ‌های پودر شده گیاه چویل به دقت توسط ترازوی دیجیتال وزن شد. سپس جهت تهیه عصاره‌های آبی، اتانولی و آبی ـ اتانولی هر کدام به طور جداگانه به ارلن حاوی ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر و اتانول ۹٦ درجه اضافه گردید و سر ارلن ها با پارافیلم بسته و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق روی دستگاه هم زن مغناطیسی قرار گرفت تا استخراج عصاره به طور کامل و مطلوب صورت گیرد. سپس مخلوط حلال و گیاه توسط کاغذ صافی (واتمن) از هم جدا شد. در ادامه، تفاله‌ها فشرده شد تا تخلیه به طور کامل انجام گردد. در نهایت عصاره‌های اولیه به دست آید. عصاره‌های اولیه حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی جمع آوری و به منظور تبخیر حلال، عصاره‌های حاصل وارد دستگاه تقطیر در خلاء (روتاری) شده و در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد حلال آنها به مدت یک ساعت تبخیر و عصاره‌های تغلیظ شده به دست آمد. پس از خشک‌شدن کامل عصاره‌ها، آنها توسط کاردک آزمایشگاهی کاملاً تراشیده شدند. عصاره‌های حاصل تا زمان انجام آزمایشات در ظرف تیره استریل ریخته شده و در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شدند [۱۲].

1. Chavil
2. Chavir
3. Garchi
4. *Radix astragali*
5. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

۲-۱-۲- روش مایکروویو

در این روش، از مایکروویو آزمایشگاهی استفاده شد. نمونه-های ۵ گرمی با امواج مایکروویو تحت کنترل دما و در زمان ۶۰ ثانیه و توان ۱۵۰ وات صورت گرفت. برای استخراج بهتر توسط امواج مایکروویو، نمونه به مدت ۹۰ دقیقه در حلال مربوطه بدون هم زدن خیسانده شده و در نهایت، عصاره به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی از مواد گیاهی جدا گردید [۱۳].

۲-۲- روش آزمایشات

۲-۲- ۱- اندازه گیری میزان فنول کل

مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌ها از طریق رنگ سنجی به روش فولین ـ سیوکالتو اندازه‌گیری شد [۱۴]. اساس کار، احیاء معرف فولین توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷۶۰ نانومتر نشان می دهد [۱۵].

به طور خلاصه در این روش، ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره درون لوله آزمایش با ۱/۱۶۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین ـ سیوکالتو مخلوط شد. بعد از گذشت حداکثر ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم (۲۰ درصد وزنی ـ حجمی) به محتوی لوله آزمایش افزوده شد. لوله‌های آزمایش بعد از تکان دادن، درون حمام آب با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت و پس از گذشت ۳۰ دقیقه، میزان جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت گردید. برای رسم منحنی استاندارد اسید گالیک، محلول پایه‌ای از این ماده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد.

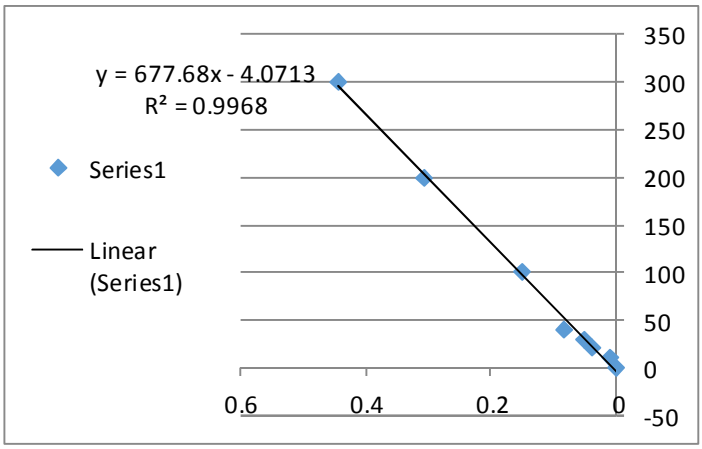

Fig 1 The standard curve of gallic acid to determine of total phenol of *F.angulata*.

سپس از این محلول پایه غلظت‌های مختلف آماده گردید و بعد از انجام مراحل مختلف مطابق روش ذکر شده در بالا مقدار جذب نمونه‌ها خوانده شد. بعد از رسم منحنی کالیبراسیون اسید گالیک، با قرار دادن مقدار جذب عصاره در معادله خطی مربوط به منحنی استاندارد، مقدار کل فنول موجود در عصاره محاسبه گردید [۱۲]. در نهایت، داده ها بر اساس معادل میلی-گرم اسید گالیک بر گرم عصاره بیان شد که Y میزان جذب و X مقدار ترکیبات فنولی است (شکل ۱).

۲-۲-۲- اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل

میزان فلاونوئید کل با استفاده از روش رنگی آلومینیوم کلرید انجام شد. ۰/۵ میلی لیتر عصاره با ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شده و پس از نگهداری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، جذب مخلوط در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت گردید. میزان فلاونوئید بر اساس میزان معادل «میلی‌گرم روتین در گرم عصاره» گزارش گردید [۱۷]. از روتین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد (شکل ۲).

۲-۲-۳- اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی: توانایی مهار رادیکال‌های DPPH

در این روش، بررسی خاصیت ضدرادیکالی به روش DPPH و توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون در ترکیبات و عصاره-های مختلف با میزان بی‌رنگ کردن محلول بنفش DPPH در متانول مورد سنجش قرار می‌گیرد. DPPH رادیکال چربی دوستی است که ماکزیمم جذب را در طول موج ۵۱۷ نانومتر دارد. در این آزمون، گروه‌های هیدروکسیلِ ترکیبات آنتی-اکسیدانی با دادن هیدروژن به رادیکال‌های آزاد DPPH منجر به کاهش مولکول‌های DPPH می‌شوند که با تغییر رنگ محلول واکنش از رنگ بنفش تیره به زرد روشن همراه است. در نتیجه جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر کاهش می‌یابد [۱۸].

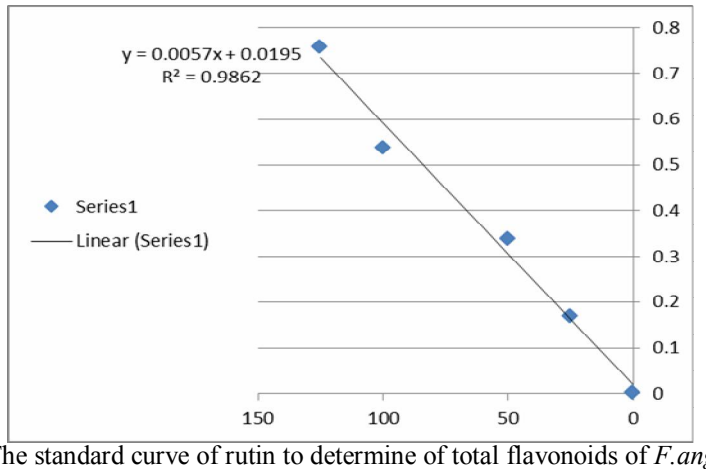

Fig 2 The standard curve of rutin to determine of total flavonoids of *F.angulata*.

در پژوهش حاضر، ٤٠ میکرولیتر از عصاره چویل به لوله آزمایش منتقل شده و یک میلی‌لیتر از محلول ۰/۲ میلی مولار DPPH به آن اضافه گردید. در ادامه، کاهش جذب در ۵۱۷ نانومتر بعد از ۳۰ دقیقه برای نمونه‌ها قرائت شد. جذب رادیکال DPPH بدون عصاره به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. درصد جمع آوری رادیکال مطابق فرمول زیر محاسبه گردید:

معادله (۱) $((A_0-A_1)/A_0)\times 100$ = مهار درصد DPPH

A_0 جذب کنترل بدون حضور عصاره (بلانک) و A_1 جذب عصاره ضد اکساینده در حضور عصاره است. لازم به ذکر است که بلانک نیز مانند نمونه اصلی تهیه گردید، با این تفاوت که به جای عصاره، 40 میکرولیتر آب مقطر درون لوله آزمایش ریخته شد.

۲-۳- تیمارهای مورد بررسی

مشخصات تیمارهای مورد بررسی در استخراج به روش خیساندن و مایکروویو در جدول ۱ ارائه شده است. پس از انجام آزمایشات در زمان‌های مختلف، زمان مورد استفاده جهت استخراج با این روش، ٦٠ ثانیه انتخاب گردید.

Table 1. The treatments properties in maceration and microwave- assisted extraction.

Maceration method			Microwave method		
water :ethanol	Extraction time (h)	Treatment	water :ethanol	Extraction time (sec)	Treatment
100-0	12	**T6**	100-0	60	**T1**
75-25		**T7**	75-25		**T2**
50-50		**T8**	50-50		**T3**
25-75		**T9**	25-75		**T4**
0-100		**T10**	0-100		**T5**

۲-٤- تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز آماری داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ٢٤ و مقایسه میانگین داده ها با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال 1 درصد ($p< 0.01$) انجام شد. تمامی نمودارها با نرم افزار Excel 2013 رسم گردید. تست نرمال بودن داده ها به روش کمولوگروف اسمیرنوف[1] با نرم افزار SPSS نسخه ٢٤ انجام شد و تمام داده ها نرمال بود.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تأثیر روش‌های عصاره‌گیری بر میزان فنول کل

اثر تیمارهای مختلف بر مقادیر فنول کل عصاره چویل به روش مایکروویو و خیساندن معنی‌دار است ($p<0.01$)(جدول۲). بر اساس شکل۳، تیمار استخراج شده با روش مایکروویو (T_1) بالاترین میزان فنول کل را نشان داد.

1. Kolmogorov–Smirnov test

Table 2 The analysis of variance the effect of different treatments on the total phenolic of *F. angulata* extract by microwave and maceration method.

Microwave Method			
Source of variation	Sum of square	Degree of freedom	Mean square
Treatment	0.52	4	0.13**
Error	0.0003	10	0.00003
Total	0.52	14	
CV(%):0.3			
Maceration Method			
Source of variation	Sum of square	Degree of freedom	Mean square
Treatment	13.67	4	3.42**
Error	0.001	10	0.0001
Total	13.68	14	
CV(%):0.62			

**Stars mean: Statistically significant different at the 5% level of probability ($p< 0.01$).

جز این تیمار، در مورد سایر تیمارها با افزایش میزان (نسبت) آب، مقادیر فنول کل، افزایش یافت که تفاوت آنها با تیمار T_1 کاملاً معنی‌دار بود ($p<0.01$). در نتیجه، حلال آب (۱۰۰ درصد) توانایی بیشتری در استخراج میزان فنول داشت و بعد از آن حلال‌های با نسبت بیشتر اتانول نسبت به مقادیر کمتر از ۱۰۰ درصد آب، بیشترین فنول کل را نتیجه دادند.

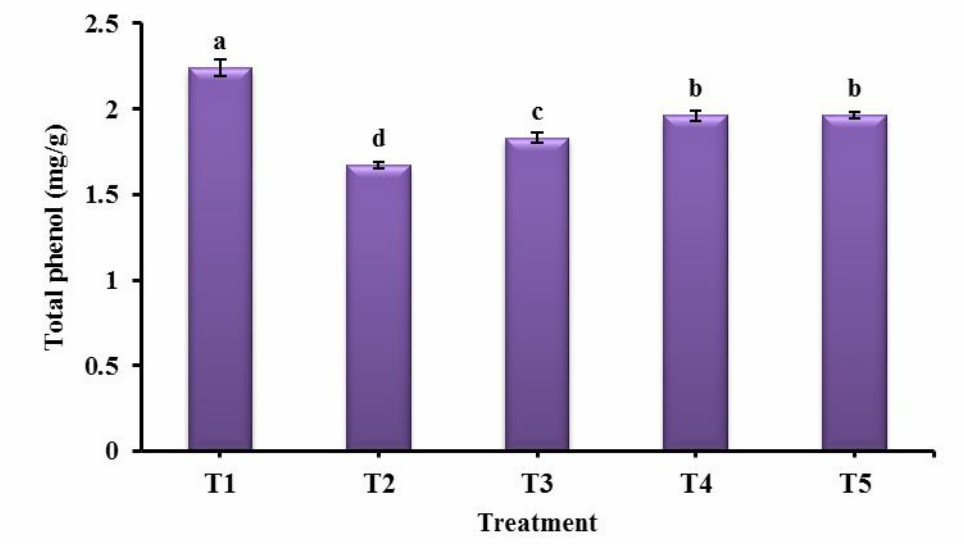

Fig 3 Mean comparison of the effect of diferent treatments on total phenolic content of *F. angulata* by microwave.

مطابق با شکل٤، بین مقادیر فنول کل تمام تیمارهای مورد بررسی در روش خیساندن تفاوت معنی داری وجود داشت ($p<0.01$). بالاترین میانگین فنول کل (۰/۰۹±۳/٦٦) متعلق به تیمار T_7 (اتانول: آب برابر با ۲۵: ۷۵ درصد) بود. ضمن اینکه تیمار T_9 (اتانول: آب برابر با ۷۵: ۲۵ درصد) کمترین میزان فنول کل (۰/۰۱±۰/۹۱) را داشت. به عبارت بهتر، در روش خیساندن نیز نسبت بالای آب به اتانول توانست بالاترین میزان فنول کل را استخراج نماید.

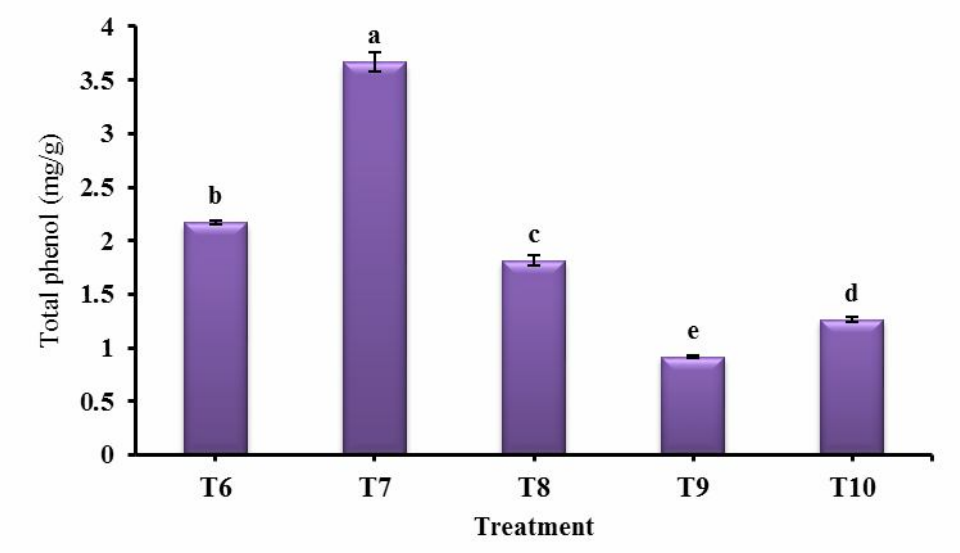

Fig 4 Mean comparison of the effect of diferent treatments on total phenolic content of *F. angulata* by maceration method.

افزایش بازده استخراج احتمالاً به دلیل نفوذ بیشتر آب و افزایش پدیده اُسمز است که قابلیت حل شدن فنول را افزایش داده و در نتیجه میزان فنول بیشتری خارج گردید. این نتیجه با نتایج تحقیقات نیرمال و همکاران (۲۰۱۲) [۲۱] در تضاد است. در مطالعه این محققین، میزان ترکیبات فنولی موجود در عصاره گیاه تاجریزی[1] حاصل از استخراج با اتانول بیش از آب و پترولیوم اتر بود. در مورد حلال آب مورد استفاده در پژوهش حاضر، برخی از پژوهش ها نشان داده اند که این حلال توانایی بالاتری نسبت به بسیاری از حلال‌های دیگر در استخراج ترکیبات فنولی دارد [۲۲]. روند استخراج ترکیبات فنولی یک فاکتور مهم در تعیین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره بوده و زمان عصاره‌گیری تأثیر معنی‌داری در محتویات عصاره دارد [۱۹]. از بین ترکیبات گیاهی که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند، ترکیبات فنولی توزیع گسترده‌ای در بسیاری از گیاهان دارند. ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات عمدتاً ناشی از قدرت احیاء کنندگی و ساختار شیمیایی است که آنها را قادر به خنثی‌کردن رادیکال‌های آزاد، تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی و خاموش کردن مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه گانه می سازد. ترکیبات فنولی از طریق اهداء الکترون به رادیکال‌های آزاد، واکنش‌های اکسایش چربی را مهار می کنند [۲۰]. از آنجا که در زمان‌های بالاتر اشعه‌دهی با امواج مایکروویو، احتمال کاهش میزان استخراج ترکیبات فنولی به دلیل تخریب حرارتی وجود دارد [٦]. در بررسی زمان‌های مختلف اشعه دهی امواج مایکروویو (۱ تا ۱۰ دقیقه) برای استخراج پلی فنول ها و کافئین از برگ های چای سبز، زمان ٤ دقیقه بیشترین میزان استخراج را برای هر دو ترکیب داشت. به طوری که با افزایش زمان از ٤ تا ۱۰ دقیقه میزان استخراج پلی فنول‌ها تقریباً ثابت بود، ولی میزان استخراج کافئین چای کاهش یافت [۲۳]. ماریسیو و همکاران (۲۰۰۳) [٢٤] از روش مایکروویو برای استخراج ایزوفلاون‌ها از دانه سویا استفاده کردند و شرایط بهینه شامل دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۲۰ دقیقه را برای استخراج به دست آوردند [۲۵].

در این پژوهش، در روش خیساندن نیز نسبت بالای آب به اتانول توانست بالاترین میزان فنول کل را استخراج نماید (شکل٤). یکی از دلایل می‌تواند مربوط به زمان طولانی روش خیساندن با حفظ ترکیبات مؤثره نمونه ها حین استخراج باشد. تأثیر مثبت افزایش زمان بر میزان بازدهی در روش خیساندن به طور کامل قابل توجیه است. در این روش، استخراج مواد مؤثره از بافت های گیاهی بر اساس پدیده نفوذ حلال به داخل بافت-های گیاهی و انتشار حلال به همراه مواد حل شده در آن از بافت گیاهی به داخل حلال صورت می گیرد [۲]. بنابراین اگرچه این روش از روش های متداول و قدیمی استخراج می-باشد، ولی با توجه به مکانیسم استخراج، انتظار می رود که برای رسیدن به یک بازدهی خوب به زمان طولانی و دمای بالا نیاز باشد و نتایج پژوهش حاضر در مورد استخراج ترکیبات فنولی تأیید کننده این مطلب بود. به طور کلی نتیجه‌گیری شد

1. *Solanum nigrum L.*

که استخراج به روش خیساندن در مقایسه با روش مایکروویو توانایی بیشتری در دستیابی به بالاترین میزان فنول کل موجود در عصاره چویل داشت. حلال آب در نسبت‌های بیشتر از اتانول نیز توانست مقادیر فنول کل بیشتری را به دست دهد. اختلاف در میزان ترکیبات فنولی عصاره‌های حاصل از دو روش می‌تواند به علت تفاوت شرایط استخراج عصاره مثلاً زمان بسیار کوتاه روش مایکروویو در مقایسه با روش خیساندن باشد. هم راستا با نتایج این پژوهش، چی آنگ و همکاران (۲۰۰۳) [۲۶] در استخراج ترکیبات فنولی از قارچ خوراکی با استفاده از 4 نوع حلال (آب، متانول، اتیل استات و پترولیوم اتر) گزارش کردند که عصاره آبی بیشترین مقدار ترکیبات فنولی را استخراج کرد.

۳-۲- تأثیر روش‌های عصاره‌گیری بر میزان فلاونوئید

بر اساس جدول ۳، اثر روش تیمارهای مختلف بر مقادیر فلاونوئید عصاره چویل در هر دو روش عصاره گیری در سطح ۱ درصد معنی‌دار است ($p<0.01$).

Table 3 The analysis of variance the effect of different treatments on the flavonoid content of *F. angulata* extract by microwave.

Microwave Method			
Source of variation	Sum of square	Degree of freedom	Mean square
Treatment	0.12	4	0.03**
Error	0.0004	10	0.00
Total	0.12	14	0.01
CV(%):0.62			
Maceration Method			
Source of variation	Sum of square	Degree of freedom	Mean square
Treatment	0.39	4	0.10**
Error	0.0001	10	0.00001
Total	0.39	14	
CV(%):0.62			

**Stars mean: Statistically significant different at the 5% level of probability ($p< 0.01$).

مطابق شکل ۵ بین تمام تیمارهای مورد بررسی در روش مایکروویو تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p<0.01$). با افزایش نسبت اتانول از صفر تا ۵۰ درصد، میزان فلاونوئید کاهش و از ۵۰ تا ۱۰۰ درصد، افزایش یافت. به عبارت بهتر، بالاترین میزان فلاونوئید (۰/۷۵±۰/۰۰۸) در عصاره چویل استخراج شده با نسبت اتانول: آب برابر با ۰ : ۱۰۰ درصد حاصل شد و بعد از آن، نسبت اتانول : آب (۱۰۰: ۰) (۰/۶۶±۰/۰۰۹) قرار داشت.

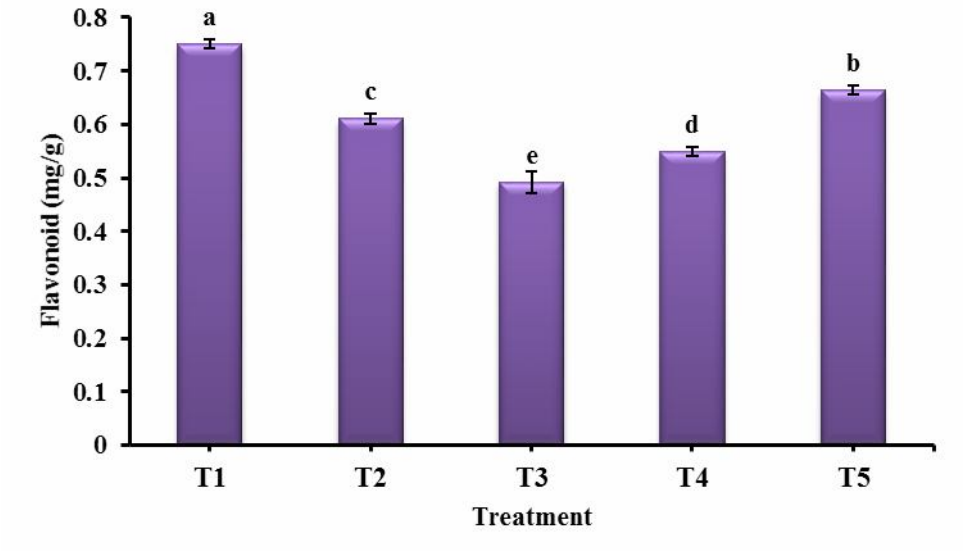

Fig 5 Mean comparison of the effect of diferent treatments on flavonoid content of *F. angulata* by microwave.

مطابق شکل ٦، بین تمامی تیمارهای مورد ارزیابی در روش خیساندن، تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p<0.01$) و با کاهش نسبت آب به اتانول، مقادیر فلاونوئیدهای حاصل کاهش یافت. بالاترین میزان فلاونوئید مربوط به تیمار با نسبت اتانول : آب برابر با ۰ : ۱۰۰ درصد (T_6) و کمترین میزان نیز به تیمار با نسبت اتانول : آب برابر با ۷۵ : ۲۵ درصد (T_9) بود. بنابراین، حلال آب در روش خیساندن در مقایسه با اتانول کارایی بیشتری در استخراج فلاونوئیدهای عصاره چویل داشت. نتایج حاصل از بررسی مقادیر فنول کل و فلاونوئید در دو روش خیساندن و مایکروویو در پژوهش حاضر نشان داد که روش خیساندن در استخراج فنول کل و روش مایکروویو در استخراج فلاونوئیدها توانایی بهتر و بالاتری دارند، اگرچه در هر دو مورد استخراج، حلال آب کارایی بالاتری را نشان داد. ترکیبات پلی فنولی که دارای دو بخش فنولی باشند، فلاونوئیدها را تشکیل می دهند [۱۰].

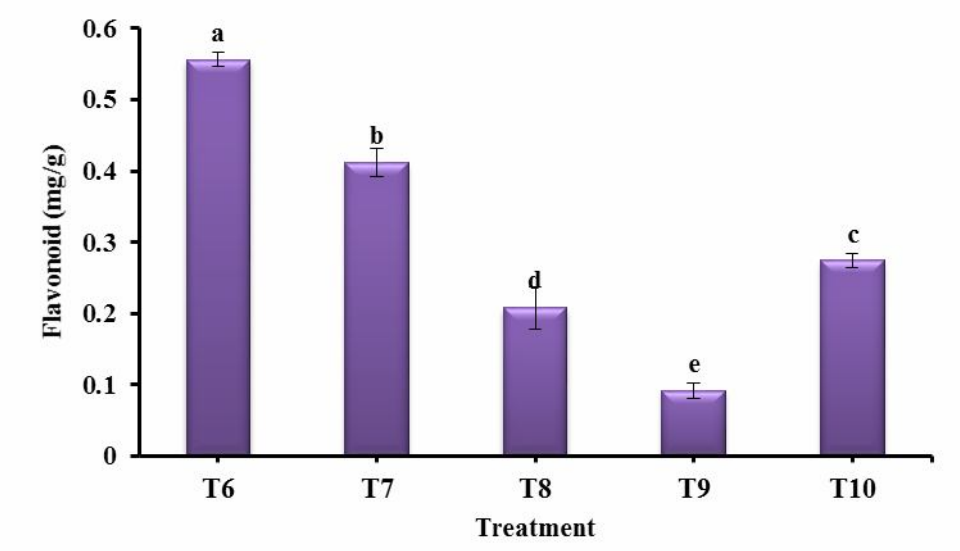

Fig 6 Mean comparison of the effect of diferent treatments on flavonoid content of *F. angulata* by maceration method.

نتایج حاصل از بررسی مقادیر فنول کل و فلاونوئید در دو روش خیساندن و مایکروویو در پژوهش حاضر نشان داد که روش خیساندن در استخراج فنول کل و روش مایکروویو در استخراج فلاونوئیدها توانایی بهتر و بالاتری دارند، اگرچه در هر دو مورد استخراج، حلال آب کارایی بالاتری را نشان داد. در این راستا، ابراهیم زاده و همکاران (۲۰۰۹) [٤] در ارزیابی اثرات روش‌های مختلف عصاره‌گیری (خیساندن و فراصوت) بر روی محتوی فنول کل و فلاونوئیدهای گیاه *Lythrum salicaria* نشان دادند که محتوی فنول کل در عصاره فراصوت بیش از عصاره حاصل از روش خیساندن بود. به عنوان نتیجه گیری در این بخش، می‌توان گفت که عصاره‌های حاصل از روش مایکروویو مقادیر فلاونوئید بیشتری در مقایسه با روش خیساندن داشتند. این نتایج با نتایج پژوهش پان و همکاران (۲۰۰۲) (۲۷) مطابقت دارد. این محققین در بررسی استخراج تانشینون ها از *Salvia miltiorrhiza* با روش‌های سوکسله، مایکروویو و فراصوت بیان کردند که تکنیک مایکروویو طی زمان ٦۰ ثانیه بالاترین میزان استخراج را بین سه روش مورد ارزیابی به دست داد. در هر دو روش مورد بررسی در این پژوهش، نسبت بالای حلال آب توانست فلاونوئیدهای بالاتری را به دست دهد. در این راستا، در تحقیق قره خانی و همکاران (۱۳۸۹) (۲۸) در مقایسه روش‌های مختلف استخراج فلاونوئیدها از گیاه گزنه، دلیل بالا بودن میزان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی در روش خیساندن به استخراج بیشتر این ترکیبات با حلال کلروفرم نسبت داده شد که بیش از دو برابر در مقایسه با روش‌های دیگر نظیر مایکروویو و فراصوت بود. همچنین به دلیل اینکه حلال کلروفرم حالت شفاف (گذرا) به امواج مایکروویو دارد، میزان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌های این حلال برای روش استخراج به کمک مایکروویو بسیار کمتر بود.

۳-۳- تأثیر روش‌های عصاره‌گیری بر توانایی به دام انداختن رادیکال‌های DPPH

مطابق جدول ٦ اثر تیمارهای مختلف بر فعالیت رادیکال-گیرندگی و به عبارت دقیق تر میزان IC_{50} عصاره چویل با روش مایکروویو و خیساندن در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. بالاترین فعالیت رادیکال‌گیرندگی مربوط به تیمار با نسبت اتانول: آب برابر با ۰ : ۱۰۰ درصد بود که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشت ($p<0.05$).

Table ۴. The analysis of variance the effect of different treatments on free radical scavenging activity of *F. angulata* extract by microwave.

Microwave Method			
Source of variation	Sum of square	Degree of freedom	Mean square
Treatment	52.96	4	13.24**
Error	0.0002	10	0.00002
Total	52.96	14	
CV(%):0.62			
Maceration Method			
Source of variation	Sum of square	Degree of freedom	Mean square
Treatment	32.95	4	8.24**
Error	0.0004	10	0.00004
Total	32.95	14	
CV(%):0.62			

**Stars mean: Statistically significant different at the 5% level of probability ($p< 0.01$).

بر اساس شکل۷، با کاهش نسبت آب به اتانول از ۱۰۰ (T_1) به ۲۵ درصد (T_4)، فعالیت رادیکال‌گیرندگی کاهش می یابد.

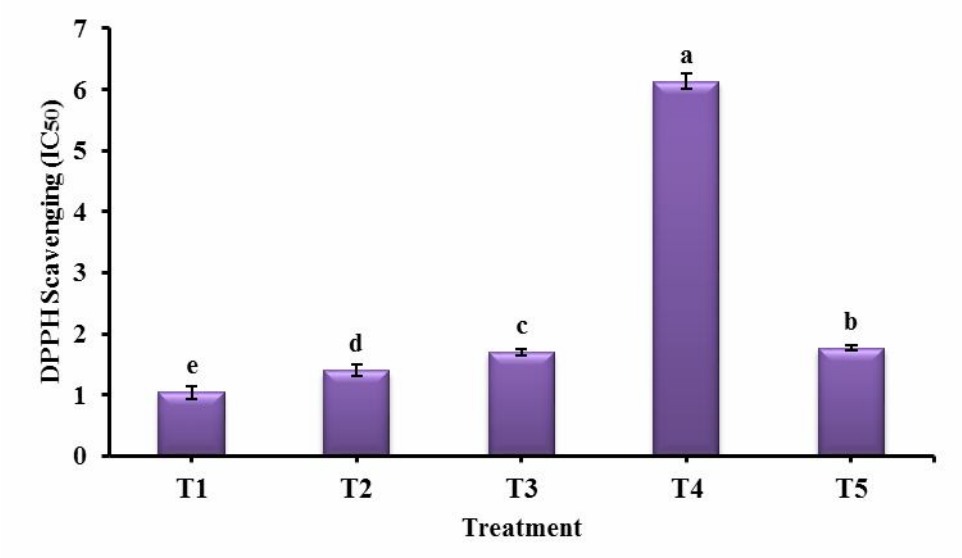

Fig 7 Mean comparison of the effect of diferent treatments on IC_{50} values of *F. angulata* by microwave method.

تیمار استخراج شده با نسبت اتانول به آب ۰ : ۱۰۰ (T_1) بالاترین فعالیت رادیکال‌گیرندگی و به عبارتی پائین ترین میزان IC_{50} (۱/۰٤±۰/۱ درصد) را داشت که تفاوت آن با سایر تیمارها از نظر آماری کاملاً معنی‌دار بود ($p<0.01$). تیمار با نسبت اتانول: آب برابر با ۷۵: ۲۵ درصد، کمترین فعالیت رادیکال‌گیرندگی (٦/۱۳±۰/۱۲ درصد) را داشت و به عبارت دیگر، این نسبت کمترین و پائین ترین اثر را بر قدرت رادیکال‌گیرندگی داشت که تفاوت آن نیز با تمام تیمارها معنی-دار بود ($p<0.01$). مطابق شکل ۸ با کاهش نسبت آب به اتانول تا میزان ۲۵ درصد، فعالیت رادیکال‌گیرندگی کاهش یافت. بالاترین فعالیت رادیکال‌گیرندگی مربوط به تیمار با نسبت اتانول: آب برابر با ۰ : ۱۰۰ درصد بود که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشت ($p<0.05$). مطابق نتایج پژوهش حاضر، در آزمون DPPH، روش مایکروویو توانایی

بیشتری در استخراج عصاره‌های با فعالیت رادیکال‌گیرندگی بیشتری در مقایسه با روش خیساندن داشت. توانایی یک ماده به منظور خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد با فاکتور IC_{50} بیان می‌شود که بیان‌کننده میزان نمونه مورد نیاز برای بازدارندگی ۵۰ درصدی رادیکال‌های آزاد است. بنابراین، IC_{50} کمتر نشان دهنده پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بیشتر (غلظت کمی از نمونه قادر به جلوگیری میزان زیادی از رادیکال‌های آزاد است) می باشد [۲۹و۱۱].

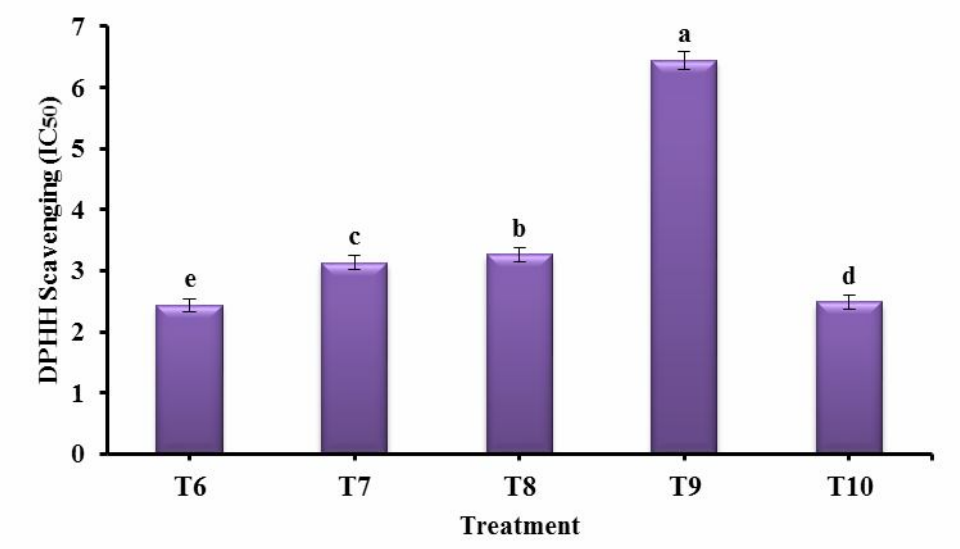

Fig 8 Mean comparison of the effect of diferent treatments on IC_{50} values of *F. angulata* by maceration.

مدل به دام اندازی رادیکال DPPH به طور گسترده برای ارزیابی توانایی به دام‌اندازی رادیکال آزاد در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ترکیب یک رادیکال آزاد با اتم مرکزی نیتروژن است که با احیاء شدن و تولید مولکول پایداری می کند که از ارغوانی به زرد تغییر رنگ می‌دهد. این رادیکال در ۵۱۵ تا ۵۲۸ نانومتر جذب دارد (۳۰). مطابق نتایج پژوهش حاضر، در آزمون DPPH، روش مایکروویو توانایی بیشتری در استخراج عصاره‌های با فعالیت رادیکال‌گیرندگی بیشتری در مقایسه با روش خیساندن داشت. این پژوهش با نتایج تحقیقات مزدستان و همکاران (۱۳۹٤) [۳۱] در ارزیابی تأثیر روش استخراج (سوکسله، خیساندن و فراصوت) با حلال متانول بر محتوی ترکیبات فنولی کل، ترکیبات فلاونوئیدی و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ «گیاه مورد»[1] مطابقت دارد که اعلام کردند بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد به عصاره حاصل از روش خیساندن مربوط می‌شود که IC_{50} برابر با ۱۷۳/۳ میکروگرم بر میلی لیتر داشت، در حالی که مقادیر IC_{50} به ترتیب برای روش سوکسله و فراصوت برابر با ٤۰۲/۹ و ۳۵۵/۱ میکروگرم بر میلی لیتر بود. در مقابل، با نتایج گزارشات گاشی و همکاران (۲۰۰۹) [۳۲] در تضاد است که بیان نمودند طولانی بودن زمان استخراج در روش خیساندن با فراهم نمودن فرصت کافی برای انتشار حجم مناسبی از حلال به داخل سلول ها و خروج مواد آنتی‌اکسیدانی از جایگاه‌های استقرارشان کارایی روش عصاره گیری را افزایش می‌دهد [۳۳].

نکته دیگر در نتایج بررسی فعالیت رادیکال‌گیرندگی عصاره‌های مورد بررسی در پژوهش حاضر، این بود که در هر دو نوع تکنیک استخراج با مایکروویو و خیساندن، نسبت‌های بالای حلال آب به اتانول نتایج بهتری داشت و اتانول با میزان ۱۰۰ درصد، بالاترین IC_{50} را نشان داد که تفاوت آن با سایر تیمارهای مورد بررسی کاملاً معنی‌دار بود ($p<0.01$). این نتیجه با گزارشات ماندال و همکاران (۲۰۰۷)[۳٤] همخوانی دارد که اعلام نمودند در روش مایکروویو، نسبت های بالاتر حلال اتانول در برابر آب، ممکن است بازیابی‌های کم تری را به دلیل همزنی نامناسب و ناکافی حلال توسط مایکروویو داشته باشد. تفاوت بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف، به دلیل تفاوت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات موجود در آن ها می باشد که با حلال‌های مختلف دارای قطبیت متفاوت استخراج شده اند. به عبارت دیگر، استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از مواد گیاهی به حلالیت این ترکیبات در حلال‌های مختلف بستگی دارد. به علاوه قطبیت حلال‌های

1. *Myrtus communis*

مورد استفاده نقش کلیدی را در افزایش حلالیت این ترکیبات ایفا می کند [۳۵]. گزارش شده است که عصاره‌های قطبی نسبت به انواع غیرقطبی، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری هستند که این امر در ارتباط با حضور اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها در آنها می باشد [۳۶].

٤- نتیجه‌گیری نهایی

نتایج پژوهش حاضر داد که روش مایکروویو در استخراج عصاره‌های چویل با بالاترین میزان فلاونوئید و بیشترین فعالیت رادیکال‌گیرندگی در مقایسه با روش خیساندن، کارامدتر است. در مقابل، روش خیساندن نتایج بهتری را در استخراج عصاره های با میزان بالاتر فنول به دست داد. کارایی روش استخراج به کمک مایکروویو زمانی که ترکیبات هدف یا حلال غیر قطبی باشند و یا زمانی که آنها فرار باشند، بسیار پائین است. بنابراین در مورد ترکیبات فلاونوئیدی نیز باید گفت که روش استخراج به کمک مایکروویو در بین حلال‌های قطبی (آب و اتانول) بهتر از روش خیساندن عمل کرد و میزان استخراج بیشتری داشت. در هر دو روش طی آزمایشات مورد نظر، حلال آب نسبت به حلال اتانول عملکرد بهتری را نشان داد و با افزایش میزان اتانول در ترکیب با آب، مقادیر فنول کل، فلاونوئید و فعالیت رادیکال‌گیرندگی کاهش یافت.

٥- منابع

[1] Hadjiakhoondi, A., Aghel, N. & Etemadi, R. (2002). Chemical and biological study of essential oil of *Ferulago macrocarpa* (Fenzi) Boiss. Hamdard Medicus, 45, 35-38.

[2] Ghasemi, K., Ghasemi, Y. & Ebrahimzadeh, M.A. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus specis peels and tissues. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 22(3), 277-281.

[3] Ghafoor, K., Hui, T. & Choi, Y.H. (2011). Optimization of ultrasound-assisted extraction of total anthocyanins from grape peel. Journal of Food Biochemistry, 35, 735–746.

[4] Ebrahimzadeh,M.A., Nabavi, S.M., Nabavi, S.F.,Eslami,B. & Ehsanifar,S. (2009). Antioxidant activity of *Hyoscyamus squarrosus* fruits. Pharmacology online, 2, 644-650.

[5] Pokorny,J., Yanislieva,N. & Gordom, M. (2001). Antioxidants in food-Practical Applications, Woodhead Publishing, Washington DC.CRC Press, 1-400.

[6] Rafaela, G. M., Gloria Lobo, M. & Monica, G. (2010). The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. Separation and Purification Technology, 71, 347–355.

[7] Chemat, F. (2009). Essential oils and aromas: Green extractions and Applications, Dehradun: HKB Publishers.

[8] Kwon, J. H., Belanger, J.M.R., Jocelyn Pare, J.R. & Yaylayan, V.A. (2003). Application of microwaveassisted process (MAP TM) to the fast extraction of Ginseng saponins. Food Research International, 36, 491–498.

[9] Hao, J. Y., Han, W., Huang, S.D., Xue, B. Y. & Deng, X. (2002). Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua L*. Separation and Purification Technology, 28, 191–196.

[10] Kaufmann, B. & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: Microwaveassisted extraction and pressurized solvent. Phytochemical Analysis,13, 105–113.

[11] Xiao, W., Han, N. & Shi, B. (2008). Microwaveassisted extraction of flavonoids from *Radix Astragali*. Separation and Purification Technology, 62(3), 614-618.

[12] Tabatabaei Yazdi, F., Alizade Behbahani, B. & Heidari Sureshjani, M. 2014. The comparison of antimicrobial effects of Chevil (*Ferulago angulata*) extract with a variety of common therapeutic antibiotics in vitro. Arak Medical University Journal, 17 (84), 35-46. [In Persian].

[13] Pan, X., Liu, H., Jia, G. & Shu, Y.Y. (2000). Microwaveassisted extraction of glycyrrhizic acid fromlicorice root. Biochemistry Engineering. J, 5, 173-177.

[14] McDonald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M. & Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chemistry, 73, 73-84.

[15] Salmanian, S.H., Sadeghi Mahoonak, A.R., Alami,M. & Ghorbani,M. 2018. Evaluation of Total Phenolic, Flavonoid, Anthocyanin Compounds, Antibacterial and Antioxidant Activity of Hawthorn *(Crataegus Elbursensis*) Fruit Acetonic Extract. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 13(1), 53-66. [In Persian].

[16] Ashrafi Yorghanloo, R., Rezazad Bari, M., Alizadeh Khaledabad, M. & Pour Akbar, L. 2015. Total phenolics, flavonoids content and

antioxidant capacities of grape pomace fermented by *Aspergillus oryzae*. Journal of Food Hygiene, 4(16), 55-67. [In Persian].

[17] Chen, Y., Xie, M.Y. & Gong, X.F. (2007). Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from Ganoderma atrum. Journal of Food Engineering, 81, 162–170.

[18] Sousa, C.M.M., Silva G.M., Vieira Junior, M.C., Ayres, C.L.S., Costa, D.S., Araujo, L.C.D., Cavalcante, E.D., Barros, P.B.M., Araujo, M.S., Brandao, M.H. & Chaves, M.H. (2007). Fenois totaise atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quimica Nova, 30, 351-355.

[19] Xia, T., Shi, S. & Wan, X. (2006). Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion. Journal of Food Engineering, 74, 557-560.

[20] Ahmadi, F., Kadivar, M. & Shahedi, M. (2007). Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Moza, in model and food systems. Food Chemistry, 105, 57-64.

[21] Nirmal, S.A., Patel, A. P., Bhawar, S. B. & Pattan, S. R. (2012). Antihistaminic and antiallergic actions of extracts of *Solanum nigrum* berries: Possible rolein the treatment fasthma. Journal of Ethnopharmacology,142, 91-97.

[22] Vilkhua, K., Raymond, M., Simonsa, L. & Bates, D. (2007). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9(۲), 161 - 9.

[23] Pan, X., Niu, G. & Liu, H. (2003). Microwaveassisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. Chemical Engineering and Processing, 42, 129-133.

[24] Mauricio, A., Rostagno, M.A. & Carmelo, G.B. (2003). Ultrasound assisted extraction of soyflavones. Journal of Chromatography, 1012, 119-128.

[25] Cheung, L.M., Cheung, P.C.K. & Ooi, V.E.C. (2003). Antioxidant activity and total phenolices of edible mushroom extracts. Food Chemistry, 81, 249-255.

[26] Pan, X.; Niu, G. & Liu, H. (2002). Comparison of microwave-assisted extraction and conventional extraction techniques for the extraction of tanshinones from Salvia miltiorrhiza bunge. Biochemical Engineering Journal, 12, 71-77.

[27] Gharekhani, M., Ghorbani, M., Ebrahimzadeh, M. A., Jaafari, S.M. and Sadeghi Mahoonak, A. R. 2010. Compare different methods of phenolic and flavonoid compounds extraction from *Urtica dioica L.* Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 26 (3), 389-405. [In Persian].

[28] Vatai, T., Skerget, M. & Knez, Z. (2009). Extraction of phenolic compounds from elder berry & different grape marc varieties using organic solvents &/or supercritical carbon dioxide. Journal of Food Engineering, 90, 246–254.

[29] Khalili, M. & Ebrahimzadeh, M.A. (2015). A review on antioxidants and some of their common evaluation methods. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 24(120),188-208.

[30] Mozdastan, SH., Ebrahimzadeh, M.A. & Khalili,M. 2015. Comparing the Impact of Different Extraction Methods on Antioxidant Activities of Myrtle (*Myrtus communis L.*). Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 25 (127), 10-24. [In Persian].

[31] Joshi, B., Lekhak, S. & Sharma, A. (2009). Antibacterial property of different medicinal plants: *ocimum sanctum*, *Cinnamomum zeylanicum*. *Xanthoxylum armatum* and *Origanum majorana*. Journal of Engineering Science and Technology, 5(1), 143-50.

[32] Ebrahimzadeh, M.A., Hashemi, Z. & Jamshidi,M. (2013). Evaluation of antioxidant activities of *Laurus nobilis L.* (Lauraceae) fruits, Impact of extraction methods. World Scietific Journal, 5(2), 79-87.

[33] Mandal V., Mohan Y. & Hemalatha S. (2007). Microwave assisted extraction, an innovative & promising extraction tool for medicinal plant research. Pharmacognosy Reviews,1, 8-14.

[34] Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Agriculture and Food Chemistry, 40, 945-۹٤٨.

[35] Kamkar, A., Jebelli Javan, A., Asadi, F. & Kamalinejad, M. (2010). The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. Food and Chemical Toxicology, 48, 1796-1800.

Determination of the phenolic content and free radical scavenging activity of extract obtained from chevil (*Ferulago angulata*) leaves by microwave and maceration

Aghajani, A. R.[1], Mortazavi, S. A.[2*], Tabatabai Yazdi, F.[2], Shafafi Zenozian, M. [1], Saedi Asl, M. R.[1]

1. Department of Food Science & Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar,Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

(Received: 2018/05/10 Accepted:2019/01/18)

This study was conducted to investigate the content of phenolic compound and radical scavenging capacity (IC_{50}) of chevil as a replacement for synthetic antioxidants. The extract of chevil leaves powder was obtained by maceration (12 h) and microwave (60 s) with ethanol or water (100: 0, 75: 25 , 50:50) and the amount of total phenolics and flavonoids was measured by spectrophotometry and antioxidant activity was measured by scavenging free radical 2,2-diphenyl -1- picryl hydrazine (DPPH). Data were analyzed by SPSS versiov 24 as well as variance analysis. The results showed that there was a significant difference between the extracts obtained by two used solvents ethanol and water ($p<0.01$). The extracts obtained by microwave showed the highest flavonoids content (0/75±0.008 mg Eq. Rutin/g dry sample) and the highest radical scavenging activity (1/04 ± 0/1) at ethanol to water ratio of 0:100 % as comared to maceration method. In contrast, the highest total phenol content (TPC) (3/665±0.09 mg Eq. gallic acid / g dry sample) was obtained by maceration at ethanol to water ratio of 0: 100%. For both methods, the rate of extraction was affected by solvents ratio and water was more effective than ethanol.

Key words: Antioxidant, Maceration, Chevil, Phenol, Microwave.

* Corresponding Author E-Mail Address: Mortazavi_s.a@yahoo.com