Journal of Advanced Researches in Medicinal Plants, 1 (1): 1-10, (2022)

Effect of different extraction methods on the metabolites and biological activities of chaville seeds (*Ferulago angulate*)

Mollaei Saeed[1*], Sedighi Farzaneh[2], Hazrati Saeed[3]

[1]Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
[2]M.Sc. Student, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
[3]Associate Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

ABSTRACT INFO

Research Paper

Received: 14 May 2022

Accepted: 08 Oct 2022

ABSTRACT

Chaville (*Ferulago angulate*) belonging to the Apiaceae family, is a native medicinal plant which is distributed in the west and south west regions of Iran. It is used as a sedative and digestive drug since ancient time and is consumed to treat intestinal worms, antioxidants, antimicrobials, anticancer drugs, blood pressure treatments, and Alzheimer's and diabetes effects. In this study, the effects of different extraction methods including ultrasound, agitation, maceration, soxhlet, reflux and microwave were investigated on the content of phenolic compounds and antioxidant activity of methanolic extract. Determination of total phenol and flavonoid contents were determined using spectrophotometric methods and antioxidant activity of the extracts were also assayed by DPPH method. According to the results, the extract obtained by soxhlet method had the highest yield. Also, the highest total phenol content (26.77 mg GAE/ g extract) belonged to the agitation method, while the highest total flavonoid content (5.82 mg QE/ g extract) was reported by the soxhlet method. The highest antioxidant activity was achieved at the extract obtained by soxhlet and reflux methods with IC50 = 59 µg/mL. The results indicated that extraction methods play an important role in the quality and antioxidant activity of active compounds. In conclusion, soxhlet method was the best method in order to increase the yield of active compounds at *Ferulago angulate.*

Key words: Antioxidant, *Ferulago angulate*, Microwave, Phenol, Soxhlet, Ultrasonic.

How to cite this article:
Mollaei S, Sedighi F, Hazrati S. 2022. Effect of different extraction methods on the metabolites and biological activities of chaville seeds (*Ferulago angulate*). Journal of Advanced Researches in Medicinal Plants 1 (1): 1-10. (In Farsi)
DOI: 10.30479/ARMP.2022.17249.1000

©The Author(s).
Publisher: Imam Khomeini International University
ARMP is an open access journal under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/BY/4.0/)

*Corresponding Author Email: **s.mollaei@azaruniv.ac.ir**

نشریه پژوهش‌های پیشرفته در گیاهان دارویی، دوره اول، شماره ۱، زمستان ۱۴۰۱، ص ۱۰-۱

تأثیر روش‌های مختلف استخراج بر متابولیت‌ها و خواص بیولوژیکی بذر گیاه چویل (*Ferulago angulata*)

سعید ملائی[1*]، فرزانه صدیقی[2]، سعید حضرتی[3]

[1]استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز
[2]دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز
[3]دانشیار، هیات علمی، گروه گیاهان داروئی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز

اطلاعات مقاله

علمی-پژوهشی

دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۴

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۶

چکیده

گیاه چویل با نام علمی *Ferulago angulata* متعلق به تیرهٔ چتریان (Apiaceae) و از گیاهان دارویی با ارزش و بومی است که در غرب و جنوب غرب ایران پراکنش زیادی دارد. این گیاه از گذشته‌های دور به عنوان داروی آرام‌بخش و گوارشی است و در زمینه‌های مختلف از جمله درمان‌کنندهٔ کرم‌های روده‌ای، آنتی‌اکسیدان، ضدمیکروبی، ضدسرطان، درمان فشارخون، آلزایمر و دیابت کاربرد دارد. در این مطالعه، تأثیر روش‌های مختلف استخراج از جمله التراسونیک، هم‌زدن، خیساندن، سوکسله، رفلاکس و میکروویو بر محتوای ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ متانولی مورد بررسی قرار گرفت. میزان فنل و فلاونوئید کل با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری و عملکرد آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها نیز با استفاده از روش DPPH اندازه گیری شد. با توجه به نتایج بدست آمده، عصارهٔ بدست آمده از روش سوکسله دارای بیشترین بازده بود. بیشترین مقدار فنل کل (۲۶٫۷۷ mg GAE/g extract) و فلاونوئید کل (mg QE/g extract ۵٫۸۲) به ترتیب به عصارهٔ حاصل از هم‌زدن و سوکسله اختصاص داشت. بیشترین میزان عملکرد آنتی‌اکسیدانی متعلق به عصاره سوکسله و رفلاکس با میزان IC_{50}= ۵۹ µg/mL در مهار رادیکال آزاد گزارش شد. بررسی نتایج نشان داد که روش‌های استخراج عصاره، نقش مهمی در کمیت و خاصیت آنتی‌اکسیدانی مواد مؤثر گیاهان ایفا می‌کند. در نتیجه، روش سوکسله بهترین روش عصاره‌گیری به منظور افزایش بازده ترکیبات مؤثر گیاه چویل بود.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدان، التراسونیک، سوکسله، فنل، گیاه چویل، میکروویو.

استناد به این مقاله

Mollaei S, Sedighi F, Hazrati S. 2022. Effect of different extraction methods on the metabolites and biological activities of chaville seeds (*Ferulago angulate*). Journal of Advanced Researches in Medicinal Plants 1 (1): 1-10. (In Farsi)
DOI: 10.30479/ARMP.2022.17249.1000

حق‌مؤلف © نویسندگان
ناشر: دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)

[*]نشانی پست الکترونیکی نویسنده مسئول: **s.mollaei@azaruniv.ac.ir**

مقدمه

گیاه چویل با نام علمی *Ferulago angulata* (Schlecht) Boiss. گیاهی علفی از تیرهٔ Apiaceae و از گیاهان دارویی با ارزش مرتعی و بومی ایران است که در غرب، جنوب غرب و مرکز ایران پراکنش زیادی دارد (Mozaffarian, 2008). چویل گیاهی علفی و چند ساله است که اسانس و ترکیبات فیتوشیمیایی متعددی در پیکر رویشی خود دارد. این گیاه در طب سنتی به عنوان آرام‌بخش گوارشی، درمان‌کنندهٔ کرم‌های روده‌ای، تونیک، هضم‌کنندهٔ غذا، ضدباکتری و ضدعفونی‌کننده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Amirghofran *et al.,* 2009; Sodeifian *et al.,* 2011). اسانس چویل به عنوان نگهدارندهٔ غذا و افزایش تاریخ انقضاء روغن سویا، محصولات لبنی، روغن سبزیجات و مخلوط روغن گل آفتابگردان و نخل و همچنین برای حفظ محصولات حیوانی از فساد کاربرد دارد (Rustaiyan *et al.,* 2002; Khanahmadi and Janfeshan, 2006; Sadeghi *et al.,* 2016). مطالعات نشان می‌دهد که این گیاه می‌تواند به عنوان آنتی‌اکسیدان و مکمل غذایی طبیعی در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد (Khanahmadi and Janfeshan, 2006).

Govahi و همکاران (۲۰۱۳) میزان فنل و فلاونوئید کل و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ گیاه چویل را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این تحقیق، نشان‌دهندهٔ خاصیت بالای آنتی‌اکسیدانی این گیاه و ارتباط مستقیم و معنی‌دار میان خاصیت آنتی‌اکسیدانی با ترکیبات فنلی بود. بنابراین این گیاه دارای میزان زیادی از ترکیبات فنلی است و می‌تواند به عنوان بهترین جایگزین طبیعی در جلوگیری از فساد مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد (Govahi *et al.,* 2013). همچنین طی تحقیقات صورت گرفته، گیاه چویل سبب افزایش رشد میکروب‌های مفید و کاهش رشد میکروب‌های مخرب می‌شود. در نتیجه این گیاه علاوه بر این‌که یک افزودنی مناسب است در بهبود عملکرد دستگاه گوارش نیز تأثیر بسزایی دارد (Naghiha *et al.,* 2015). محققین پس از استخراج عصارهٔ متانولی گل گیاه چویل و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان فنل و فلاونوئید کل، آن را به موش‌های مبتلا به بیماری کبدی تزریق کردند. نتایج نشان داد که عصارهٔ متانولی گل این گیاه که حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی است در درمان بیماری‌های کبدی مؤثر بوده است. با توجه به تأثیر مثبت و تغییرات شایان توجه در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بافت کبد، این گیاه می‌تواند به عنوان ضد ویروس در درمان بیماری‌های کبدی استفاده شود (Govahi *et al.,* 2013; Kiziltas *et al.,* 2017). همچنین با توجه به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، عصارهٔ گیاه چویل می‌تواند گزینهٔ مناسبی برای یافتن ترکیبات فعال در جلوگیری از سرطان باشد. در شرایط *in vitro*، تأثیرات عصارهٔ چویل بر سلول سرطانی MCF-7 بررسی شد که طی آن، سلول‌های سرطانی ناپدید شدند. نتایج نشان داد که فورانوکومارین‌های جدا شده از عصارهٔ چویل به عنوان ترکیبات فعال در جلوگیری از سرطان مؤثرند (Lorigooini *et al.,* 2019). تأثیرات سمیت سلولی عصارهٔ برگ و گل گیاه چویل بر سلول‌های آدنوکارسینومای معده (AGS) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تأثیر عصارهٔ برگ و گل بر سمیت سلولی در سلول‌های AGS به غلظت وابسته بود و عصارهٔ برگ نسبت به عصارهٔ گل، فعالیت سمیت سلولی بیشتری داشت (Heidari *et al.,* 2014).

تهیهٔ عصاره‌های گیاهی، اولین مرحله در آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی و استفاده از عصارهٔ گیاهان در صنعت است. عصاره‌های گیاهی در صنایع مختلفی همچون آرایش و بهداشتی، داروسازی و غذایی کاربرد دارند. بنابراین انتخاب روش مناسب عصاره‌گیری می‌تواند کارایی استخراج مواد آنتی‌اکسیدانی گیاه را به میزان چشم‌گیری افزایش دهد. تا به حال مطالعات گسترده‌ای در زمینهٔ استخراج عصاره‌های گیاهی انجام شده است تا از این طریق بتوان به عصاره‌هایی با خواص بیولوژیکی بالا دست یافت (Starmans, 1996; Azmir *et al.,* 2013). روش‌های مختلفی برای استخراج ترکیبات طبیعی از گیاهان وجود دارد و هر روش در مقایسه با دیگر روش‌ها از محدودیت‌ها و مزایای منحصر به فردی برخوردار است. برخی از روش‌های عصاره‌گیری همچون خیساندن، نیازمند زمان بیشتری برای انجام استخراج است و ممکن است نسبت به دیگر روش‌ها بازده کمتری داشته باشد و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نباشد، ولی از آنجائی که عصاره‌گیری در دمای محیط اتفاق می‌افتد باعث تخریب ترکیبات حساس به دما نمی‌شود. در گیاهانی نیز که دارای ترکیبات تخریب‌پذیر دمایی نیستند، روش‌های عصاره‌گیری همچون میکروویو، که نیازمند زمان کمتر و دمای بالا برای انجام عصاره‌گیری است، مناسب است (Oniszczuk *et al.,* 2014; Ghasemzadeh *et al.,* 2015; Vega Arroy *et al.,* 2017). بر اساس بررسی‌های اولیه‌ای که روی بذر گیاه چویل صورت گرفت مشخص شد که تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینهٔ استخراج ترکیبات با روش‌های مختلف، انجام نشده است. بنابراین هدف از این تحقیق، بهینه کردن انواع روش‌های استخراج همچون

التراسونیک، رفلاکس، خیساندن، سوکسله و میکروویو برای بدست آوردن عصاره‌ای با بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی و همچنین ارزیابی میزان فنل، فلاونوئید و خواص آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌های مختلف گیاه دارویی چویل است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه

گیاه دارویی چویل در زمان میوه‌دهی از شهرستان سپیدان واقع در استان فارس در مردادماه سال ۱۳۹۹ جمع‌آوری، و توسط تیم گیاه‌شناسی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان شناسایی شد و نمونه‌ای از آن در هرباریوم با شماره ASMUH 2415 مورد نگهداری قرار گرفت. بذرهای این گیاه پس از تمیز شدن در محیط سایه خشک گردید. سپس در آزمایشگاه به قطعات ریز خرد، و به شکل تصادفی برای انجام آزمایش‌ها وزن شد.

عصاره‌گیری با روش‌های مختلف

عصاره‌گیری به روش التراسونیک

مقدار ۲ گرم از پودر بذر در داخل ارلن ریخته شد و به آن ۲۰ میلی‌لیتر متانول اضافه گردید و در دستگاه التراسونیک با مدل mod-lab 4.5lt با قدرت ۱۰۰وات، فرکانس ٤٠ کیلوهرتز به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، عصاره‌گیری صورت گرفت. پس از صاف کردن عصاره با کاغذ صافی، خشک کردن آن با استفاده از دستگاه تبخیرکنندهٔ چرخان انجام شد.

عصاره‌گیری به روش هم‌زدن

در عصاره‌گیری به روش هم‌زدن، مقدار ۲ گرم از بذر پودر شده گیاه با ۲۰ میلی‌لیتر متانول مخلوط، و در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت با کمک مگنت در همزن مغناطیسی همزده شد. سپس مخلوط مورد نظر با استفاده از کاغذ صافی، صاف گردید و خشک کردن عصاره با تبخیرکنندهٔ چرخان صورت گرفت.

عصاره‌گیری به روش خیساندن

در عصاره‌گیری به روش خیساندن، مقدار ۲ گرم از پودر بذر به بشر انتقال داده شد و به آن ٤٠ میلی‌لیتر متانول اضافه گردید و در دمای اتاق، نگه داشته شد. به منظور بهتر انجام شدن عصاره‌گیری، گاهی ظرف نمونه تکان داده می‌شد. پس از گذشت ۷ روز، عصاره با کاغذ صافی، صاف و خشک گردید.

عصاره‌گیری به روش سوکسله

در روش عصاره‌گیری با سوکسله، مقدار ۲ گرم از بذر پودر شده گیاه در انگشتانهٔ دستگاه سوکسله قرار داده شد و ۱۵۰ میلی‌لیتر متانول به بالن اضافه گردید و عصاره‌گیری به مدت ۵ ساعت در دمای بالاتر از جوش حلال انجام، و در ادامه عصاره با دستگاه تبخیرکنندهٔ چرخان خشک شد.

عصاره‌گیری به روش رفلاکس

مقدار ۲ گرم از بذر پودر شده گیاه با ٤٠ میلی‌لیتر حلال متانول مخلوط، و در داخل بالن رده‌دار ریخته، و به کمک دستگاه رفلاکس به مدت ۳ ساعت و در دمای ۸۰ درجهٔ سانتیگراد عصاره‌گیری انجام شد. در نهایت، عصاره، صاف و خشک گردید.

عصاره‌گیری به روش میکروویو

در عصاره‌گیری به روش میکروویو، مقدار ۲ گرم از بذر پودر شده گیاه به مدت ۵ دقیقه با توان ۳۰۰ وات و دمای ٦٠ درجه در ۲۰ میلی‌لیتر متانول در دستگاه میکروویو با مدل Microwave labstation for synthesis, Microsynth قرار داده شد. پس از پایان عصاره‌گیری، عصاره صاف شد و با کمک دستگاه تبخیرکنندهٔ چرخان خشک گردید.

اندازه‌گیری محتوای ترکیبات فنلی کل

برای اندازه‌گیری محتوای ترکیبات فنل کل، از گالیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۵۰۰ میکرولیتر از معرف فولین سیوکالتو (۱۰ درصد حجمی/حجمی) مخلوط شد. پس از گذشت ۵ دقیقه، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات ۷ درصد به مخلوط فوق افزوده گردید و جذب نمونه‌ها (پس از گذشت ۲ ساعت در تاریکی) در طول موج ۷٦۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Haghighi *et al.*, 2012).

اندازه‌گیری محتوای ترکیبات فلاونوئیدی کل

برای اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل، از کوئرستین به عنوان استاندارد استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره با ۵۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلرید و ۱۰۰ میکرولیتر استات آمونیوم مخلوط شد. پس از ۱۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ٤۲٦ نانومتر اندازه گیری شد (Haghighi *et al.*, 2012).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها بر اساس روش DPPH انجام گرفت و نتایج آن با خاصیت آنتی‌اکسیدانی استاندارد آسکوربیک اسید مورد مقایسه قرار گرفت. برای انجام این عمل، ابتدا ۲ میلی‌گرم از عصاره‌ها در ۱ میلی‌لیتر متانول حل شد و سپس غلظت‌های مختلف از آن (۲۰، ٤٠، ٦٠، ۸۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تهیه گردید. به ۵۰ میکرولیتر از هر کدام از محلول‌های تهیه شده، ۵۵۰ میکرولیتر محلول DPPH اضافه، و در شرایط تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس جذب تمام محلول‌ها و نمونه‌های شاهد با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد (Mollaei *et al.*, 2018). غلظتی از عصاره که قادر به مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH باشد به عنوان IC_{50} در نظر گرفته می‌شود. IC_{50} عصاره‌ها از طریق رسم نمودار درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در مقابل غلظت‌های مختلف عصاره‌ها و بدست آوردن غلظتی که باعث مهار ۵۰ درصد رادیکال‌ها می‌شود، محاسبه گردید.

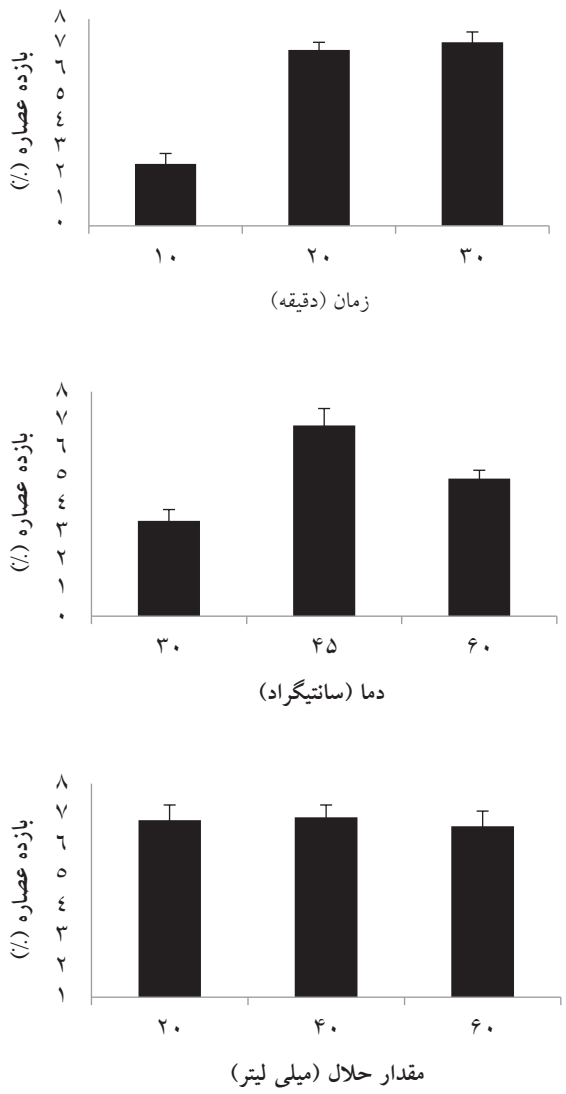
نتایج

عصاره‌گیری به روش التراسونیک

با ثابت نگهداشتن مقدار متانول (۲۰ میلی‌لیتر) و زمان استخراج (۲۰ دقیقه)، دمای استخراج بهینه شد. نتایج نشان داد که با افزایش دما از ۳۰ به ٤٥ درجهٔ سانتیگراد، بازده استخراج عصاره به طور معنی‌داری افزایش یافت و سپس افزایش دما باعث کاهش بازده عصاره شد (شکل ۱). همچنین، زمان استخراج بر میزان بازده عصاره مورد مطالعه، تأثیر داشت و نتایج حاصل از آزمایش‌ها نشان داد که با افزایش زمان از ۱۰ به ۲۰ دقیقه، بازده استخراج افزایش یافت ولی تفاوت معنی‌داری بین بازده استخراج در زمان ۲۰ با ۳۰ دقیقه ملاحظه نشد (شکل ۱). نتایج حاصل از بررسی تأثیر مقدار حلال بر بازده عصاره نشان داد که این فاکتور تأثیر معنی‌داری بر بازده عصاره نداشت؛ اما در مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از حلال متانول، نتیجه بهتری حاصل شد (شکل ۱). بنابراین بر اساس نتایج بدست آمده، دمای ٤٥ درجهٔ سانتیگراد، زمان ۲۰ دقیقه و مقدار ۲۰ میلی‌لیتر متانول به عنوان شرایط بهینه برای استخراج عصاره از بذر گیاه دارویی چویل انتخاب شد که تحت شرایط ذکر شده، بازده عصاره ٦٫۸ درصد بدست آمد.

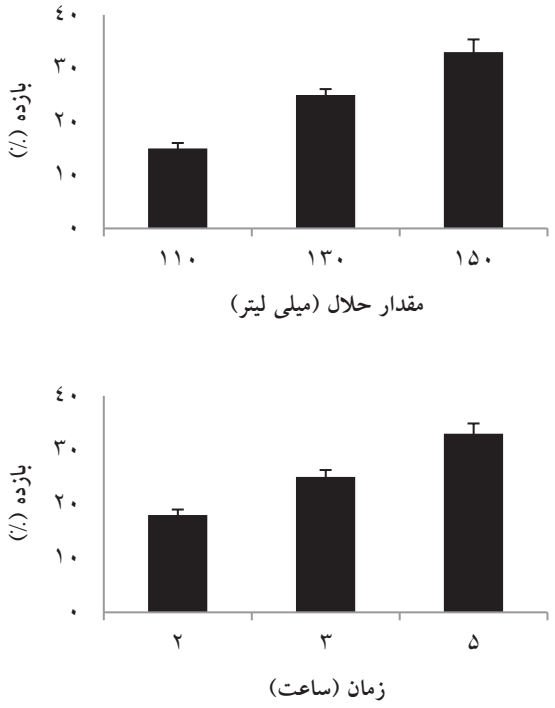
عصاره‌گیری به روش سوکسله

در عصاره‌گیری از گیاه داروئی چویل به روش سوکسله در



شکل ۱- تأثیر زمان، دما و مقدار حلال استخراج بر بازده عصاره بدست آمده از گیاه دارویی چویل به روش التراسونیک

مقدار ثابت متانول (۱۵۰ میلی‌لیتر) با افزایش زمان از ۲ ساعت تا ۵ ساعت، بازده استخراج به طور معنی‌داری افزایش یافت؛ به طوری که بیشترین بازده عصاره در مدت زمان ۵ ساعت به میزان ۳۳ درصد حاصل شد که در مقایسه با مدت زمان دو ساعت، ٤٥ درصد بیشتر بود (شکل ۲). همچنین در شرایط ثابت مقدار گیاه و دما، افزایش حلال از ۱۱۰ به ۱۵۰ میلی‌لیتر باعث افزایش بازده تا ۳۳ درصد شد (شکل ۲). در نتیجه، زمان ۵ ساعت و مقدار ۱۵۰ میلی‌لیتر متانول به عنوان شرایط بهینه برای استخراج عصاره از بذر گیاه چویل انتخاب شد که تحت شرایط گفته شده، بازده عصاره ۳۳ درصد بدست آمد.



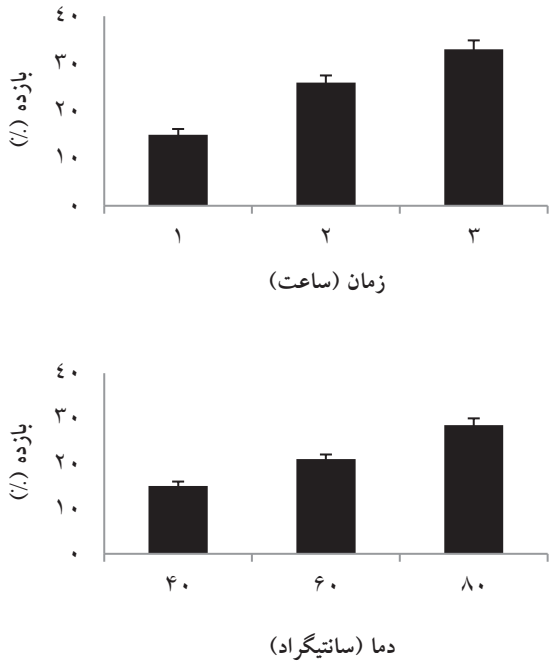
شکل ۲- تأثیر مقدار حلال استخراج و زمان بر بازده عصارهٔ بدست آمده از گیاه دارویی چویل به روش سوکسله

عصاره‌گیری به روش رفلاکس

آزمایش‌های اولیه در زمینهٔ تأثیر مقدار حلال بر بازده عصاره نشان داد که این پارامتر تأثیر معنی‌داری بر بازده ندارد. بنابراین با ثابت نگه داشتن مقدار حلال (۲۰ میلی‌لیتر)، تأثیر زمان و دما بر بازده عصاره مورد بررسی قرار گرفت. در مقدار ثابت حلال (۲۰میلی‌لیتر)، زمان استخراج بهینه شد و نتایج نشان داد که با افزایش زمان از ۱ تا ۳ ساعت، بازده استخراج افزایش یافت (شکل ۳). همچنین تأثیر دما بر بازده عصاره مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که با افزایش دما در شرایط ثابت نسبت گیاه به حلال و زمان، بازده عصاره افزایش یافت؛ به طوری که بیشترین بازده عصاره در دمای ۸۰ درجهٔ سانتیگراد به میزان ۲۸٫۵ درصد و کمترین در دمای ۴۰ درجهٔ سانتیگراد به میزان ۱۵ درصد حاصل شد (شکل ۳). بنابراین شرایط بهینهٔ استخراج عصاره با روش رفلاکس از بذر گیاه دارویی چویل در زمان ۳ ساعت و دمای ۸۰ درجهٔ سانتیگراد و به میزان ۲۸٫۵ درصد بدست آمد.

عصاره‌گیری به روش میکروویو

در فرآیند عصاره‌گیری به روش میکروویو، بر اساس



شکل ۳- تأثیر زمان و دمای استخراج بر بازده عصارهٔ بدست آمده از گیاه دارویی چویل به روش رفلاکس

آزمایش‌های اولیه مشخص شد که مقدار حلال متانول تأثیر معنی‌داری بر بازده عصاره ندارد. بنابراین با ثابت نگه داشتن مقدار گیاه (۲ گرم) و مقدار حلال متانول (۲۰ میلی‌لیتر)، تأثیر دما و قدرت میکروویو بر بازده عصاره مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بهینه کردن استخراج با کمک روش میکروویو نشان داد که دما تأثیر مثبتی بر بازده استخراج داشت و با افزایش دما مقدار آن افزایش یافت (شکل ٤). همچنین اثر قدرت میکروویو در میزان بازده عصاره مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن نشان از افزایش بازده با افزایش قدرت دستگاه میکروویو داشت و بیشترین بازده در قدرت ۳۰۰ وات به میزان ۱۵٫۷ درصد حاصل شد (شکل ٤). بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده، دمای ٦۰ درجهٔ سانتیگراد و قدرت ۳۰۰ وات میکروویو به عنوان شرایط بهینه برای استخراج عصاره از بذر گیاه چویل انتخاب شد که میزان بازده عصاره ۱۵٫۷ درصد بدست آمد.

عصاره‌گیری به روش خیساندن

نتایج نشان داد که با افزایش زمان (در مقدار ثابت گیاه و حلال با نسبت ۲ گرم به ۲۰ میلی‌لیتر)، بازده استخراج افزایش یافت؛ به طوری که بیشترین بازده عصاره در زمان ۷ روز به میزان ۲۳٫۸۳ درصد و کمترین در ۳ روز به میزان ۱۰ درصد حاصل شد

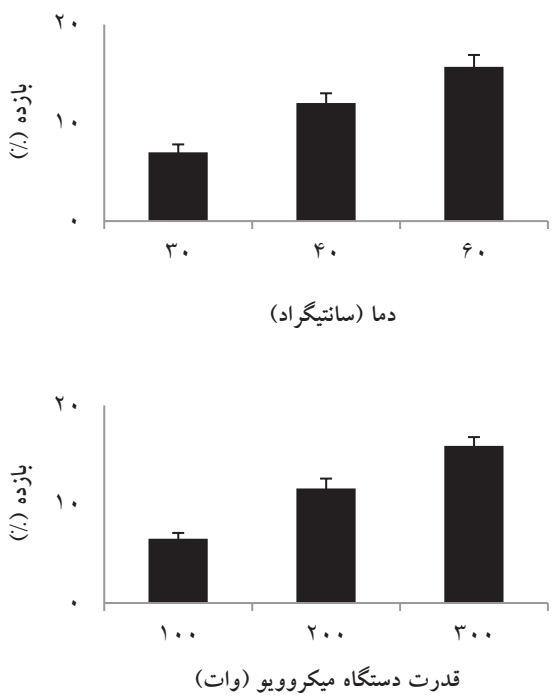
(شکل ۵). همچنین میزان حلال در بازده عصاره مورد بررسی تأثیرگذار بود و نتایج نشان داشت که با افزایش حلال، بازده استخراج افزایش یافت؛ به طوری که بیشترین بازده در میزان ٤٠ میلی‌لیتر حلال حاصل شد (شکل ۵). بر اساس نتایج بدست آمده از این آزمایش‌ها زمان ۷ روز و مقدار ٤٠ میلی‌لیتر حلال متانول به عنوان شرایط بهینه برای استخراج ترکیبات از بذر گیاه چویل انتخاب شد که تحت شرایط گفته شده، بازده عصاره ۲۳٫۸۳ درصد بود.

بررسی فنل و فلاونوئید کل و خواص آنتی‌اکسیدانی در روش‌های بهینه شده

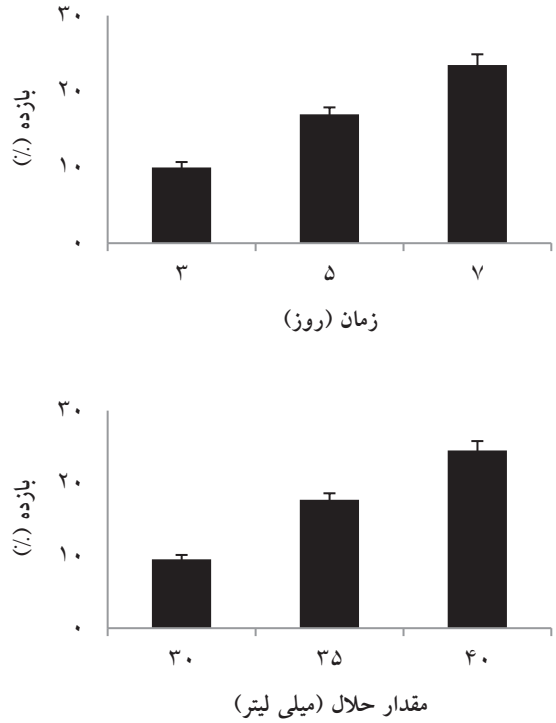
برای ارزیابی محتوای فنل و فلاونوئید کل در عصاره‌های بدست آمده از روش‌های مختلف استخراج، به ترتیب از روش‌های فولین سیوکالتو و کلریدآلومینیوم استفاده شد. نتایج حاصل از میزان فنل و فلاونوئید کل در عصاره‌های بدست آمده از روش بهینه در شرایط مختلف استخراج، نشان داد که بیشترین مقدار ترکیبات فنلی مربوط به عصارهٔ بدست آمده از روش هم‌زدن است و تفاوت معنی‌داری در میزان فنل عصاره‌های بدست آمده با دیگر روش‌های استخراج وجود نداشت (جدول ۱). آنالیز میزان فلاونوئید کل نیز نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری در میزان فلاونوئید بدست آمده با روش‌های مختلف استخراج موجود نیست (جدول ۱).

بحث

بر اساس نتایجی که از شرایط بهینهٔ روش‌های مختلف استخراج بدست آمد، مشخص شد که روش سوکسله دارای بیشترین بازده استخراج با مقدار ۳۳ درصد است. در این روش، طولانی بودن مدت زمان و حرکت مکرر حلال از روی گیاه می‌تواند نقش مؤثری در افزایش بازده داشته باشد (Nile *et al.*, 2017). طی مطالعات انجام گرفته، محققان دریافتند که بازده بالای بدست آمده از روش سوکسله به درجهٔ حرارت و حرکت مکرر حلال مرتبط است که سبب افزایش قدرت حلال می‌شود. در واقع افزایش انرژی حلال، سبب افزایش قدرت نفوذ مولکول‌های آن به بافت‌های گیاهی و ایجاد پدیدهٔ انتقال جرم می‌شود. بر اساس مطالعه‌ای، که توسط Yenge و همکاران (۲۰۱۷) دربارهٔ مقایسهٔ روش سوکسله و خیساندن صورت گرفت، مشخص شد که سوکسله، روش بهتری برای استخراج ترکیبات با بیشترین بازده است. Karabegović و همکاران (۲۰۱٤) استخراج ترکیبات



شکل ٤- تأثیر زمان و قدرت دستگاه میکروویو بر بازده عصارهٔ بدست آمده از گیاه دارویی چویل به روش میکروویو



شکل ۵- تأثیر زمان و مقدار حلال استخراج بر بازده عصارهٔ بدست آمده از گیاه دارویی چویل به روش خیساندن

جدول ۱- فنل کل، فلاونوئید کل و قدرت آنتی‌اکسیدان عصاره‌های به دست آمده با روش‌های مختلف عصاره‌گیری

روش‌های عصاره‌گیری	بازدۀ عصاره (٪)	فنل کل (میلی‌گرم بر گرم عصاره)	فلاونوئید کل (میلی‌گرم بر گرم عصاره)	IC_{50} (µg/mL)
التراسونیک	٦٫٨±٠٫٢	٢٠٫٣٦±١٫٣	٥٫٤٢±٠٫٢	٦٠±٥
هم‌زدن	١١٫٩٥±٠٫٨	٢٦٫٧٧±٠٫٨	٤٫٢٢±٠٫١	١٠١±٨
خیساندن	٢٣٫٨٣±١٫١	٢٢٫٥±٠٫٥	٥٫٧٦±١٫١	١٠٧±٧
سوکسله	٣٣±١٫١	٢٢٫٨٧±٠٫٩	٥٫٨٢±٠٫٥	٥٤±٢
رفلاکس	٢٨٫٥±١٫٢	٢٢٫٠٥±٠٫٨	٥٫٧±٠٫٣	٥٤±٤
میکروویو	١٥٫٧±٠٫٩	٢١٫٨٨±١٫٠	٥٫٥٢±٠٫٤	١٣٣±٩

فنلی گیاه *Prunus laurocerasus* را با روش‌های سوکسله، التراسونیک و میکروویو مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که به دلیل زمان طولانی‌تر روش استخراج سوکسله، این روش بیشترین بازده عصاره را داشت و در ادامه روش میکروویو و در نهایت روش التراسونیک به دلیل تشدید انتقال جرم و قدرت نفوذ بیشتر حلال نسبت به روش‌های کلاسیک، بازده بیشتری داشتند. Xiong و همکاران (۲۰۱۷) استخراج مواد موثره گیاه *Swertia mussotii* را با سه روش التراسونیک، سوکسله و رفلاکس مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که بازده روش رفلاکس برای استخراج، بالاتر از بازده روش سوکسله، و روش التراسونیک دارای کمترین بازده بود. همچنین نتایج نشان داد که پس از سوکسله به ترتیب روش‌های رفلاکس و خیساندن بیشترین بازده استخراج را داشتند. از آنجائی که در استخراج ترکیبات از گیاه چویل، مدت زمان روش سوکسله بیشتر از رفلاکس بوده است، سوکسله دارای بازده بیشتری از روش رفلاکس است و روش خیساندن به دلیل نداشتن حرارت، تأثیر کمتری نسبت به رفلاکس در میزان بازده از خود نشان داده است. علاوه بر این، روش میکروویو با وجود استفاده از امواج فراصوت نسبت به سوکسله، رفلاکس و خیساندن، بازده کمتری از خود نشان داد که می‌تواند به دلیل زمان کم استخراج باشد؛ اما نسبت به هم‌زدن و التراسونیک، به دلیل داشتن قدرت بالای دستگاه، دارای راندمان بالاتری بود. همچنین، روش هم‌زدن، بازده عصارۀ بیشتری نسبت به التراسونیک داشت که احتمالاً به دلیل مقدار حلال و زمان بیشتر و هم‌زدن پیوسته با کمک مگنت مغناطیسی بود.

فنل‌ها و فلاونوئیدها از مهم‌ترین ترکیبات طبیعی گیاهان به شمار می‌روند و به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل متصل به حلقه آروماتیک، نقش مهمی در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از تبدیل هیدروکسیدها به رادیکال آزاد، که عامل اساسی برای ایجاد سرطان در انسان است، دارند (Lin *et al.*, 2016). تحقیقات نشان داده‌اند که مصرف مواد غذایی دارای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی به کاهش بسیاری از بیماری‌ها در انسان منجر می‌شود (Varela, 2016). مکانیسم عمل ترکیبات پلی‌فنلی برای دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی در اثر جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد همچون پراکسیدهای چربی، آنیون‌ها، سوپراکسیدها و رادیکال‌های هیدروکسیل است (Nimse and Pal, 2015). همچنین، این ترکیبات توانایی به دام‌اندازی اکسیژن منفرد را دارند. نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان فنل و فلاونوئید کل در عصاره‌های بدست آمده از روش بهینه در شرایط مختلف استخراج نشان داد که بیشترین مقدار ترکیبات فنلی، به عصارۀ بدست آمده از روش هم‌زدن مربوط است و تفاوت معنی‌داری در میزان فنل عصاره‌های بدست آمده با دیگر روش‌های استخراج وجود نداشت. آنالیز میزان فلاونوئید کل نیز نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری در میزان فلاونوئید بدست آمده با روش‌های مختلف استخراج موجود نیست. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که ارتباط معنی‌داری بین خاصیت آنتی‌اکسیدانی با مقدار فنل و فلاونوئید عصاره‌ها وجود دارد (Li *et al.*, 2018; Tamuly *et al.*, 2013). این ترکیبات پلی‌فنلی به عنوان عامل کاهنده عمل می‌کنند و با دادن الکترون، با ترکیبات رادیکالی واکنش می‌دهند و آنها را به ترکیبات پایدار تبدیل می‌کنند که در نهایت باعث خنثی شدن زنجیرۀ رادیکال آزاد می‌شود. در واقع ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، از سلول‌ها در برابر واکنش‌های اکسیداتیو محافظت، و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را با محافظت از ترکیبات هیدروکسیلی حفظ می‌کند (Leopoldini *et al.*, 2004). اندازه‌گیری خاصیت

آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های بدست آمده با روش DPPH انجام گرفت و با توجه به نتایج، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به عصارهٔ بدست آمده با روش سوکسله و رفلاکس مربوط بود و روش میکروویو نیز کمترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را به خود اختصاص داد. طبق مطالعات انجام گرفته، ترکیبات فنلی می‌توانند به عنوان عوامل شلات‌کننده عمل کنند و با اتصال به آهن، پتانسیل احیای آهن را کاهش دهند و ترکیبات پایداری را ایجاد کنند که از طریق مدفوع یا ادرار دفع می‌شود (Perron and Brumaghim, 2009). بر اساس نتایج بدست آمده، میزان فنل عصارهٔ بدست آمده از روش هم‌زدن در مقایسه با دیگر عصاره‌ها بیشتر است؛ در حالی که فعالیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره در مقایسه با عصاره‌های بدست آمده از روش‌های سوکسله، التراسونیک و رفلاکس کمتر است. بنابراین بر اساس این یافته‌ها می‌توان به این نتیجه رسید که فعالیت آنتی‌اکسیدانی فقط به میزان فنل مربوط نیست و ترکیبات فنلی مختلف با خاصیت آنتی‌اکسیدانی متفاوت می‌تواند بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره تأثیر بگذارد. در نتیجه، یافتن دلیل بیشتر بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌هایی که دارای میزان فنل کمتری در مقایسه با دیگر عصاره‌ها هستند نیازمند مطالعهٔ ترکیبات فنلی عصاره‌ها با روش‌های مختلف همچون HPLC است. بنابراین می‌توان احتمال داد که خاصیت بالای آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ بدست آمده از روش سوکسله و رفلاکس به نوع ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی آنها مربوط است. همچنین با توجه به یکسان بودن میزان فنل و فلاونوئید عصاره‌های مختلف، می‌توان گفت که تفاوت در خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به تفاوت در نوع ترکیبات فنلی و یا فلاونوئیدی عصاره‌ها مربوط باشد.

نتیجه‌گیری

از آنجائی که رادیکال‌های آزاد، محصولات فرعی اجتناب‌ناپذیر واکنش‌های اکسیداسیون و احیاء هستند، مصرف بیشتر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، که سالم و ایمن است، می‌تواند راهکاری برای حذف رادیکال‌های آزاد مضر از بدن باشد. از طرفی، شناسایی روش استخراجی، که بتواند عصاره‌ای را با بیشترین بازده و ترکیبات فنلی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بدست آورد، حائز اهمیت است. بنابراین نتایج این پژوهش نشان داد که روش استخراج سوکسله، روش مناسبی برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با بیشترین بازده است و می‌تواند نقش مهمی را در کمیت مواد مؤثر و عملکرد آنتی‌اکسیدانی گیاه داروئی چویل در مهار رادیکال‌های آزاد ایفا کند.

سپاس‌گزاری

از دانشگاه شهید مدنی آذربایجان به دلیل حمایت مالی انجام این کار تحقیقاتی کمال تشکر را داریم.

References

Amirghofran Z, Bahmani M, Azadmehr A, Javidnia K, Miri R. 2009. Immunomodulatory activities of various medicinal plant extracts: effects on human lymphocytes apoptosis. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A 38: 181-192.

Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Omar AKM. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. Journal of Food Engineering 117 (4): 426-436.

Ghasemzadeh A, Jaafar H, Juraimi A, Tayebi-Meigooni A. 2015. Comparative evaluation of different extraction techniques and solvents for the assay of phytochemicals and antioxidant activity of hashemi rice bran. Molecules 20 (6): 10822-10838.

Govahi R, Ghalamkari G, Toghyani M, Eghbal Saied S, Mohammadrezaei M, Shahryari M, Dehghani Abari A. 2013. Effect of *Ferulago angulata* sub. carduchorum on total serum antioxidant activity and some of the humoral immune responses in broiler chicks. Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs) 4(3): 119-126.

Haghighi Z, Modarresi M, Mollayi S. 2012. Enhancement of compatible solute and secondary metabolites production in *Plantago ovata* Forsk. by salinity stress. Journal of Medicinal Plants Research 6 (18): 3495-3500.

Heidari S, Akrami H, Gharaei R, Jalili A, Mahdiuni H, Golezar E. 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): 1335-1345.

Karabegović IT, Stojičević SS, Veličković DT, Todorović ZB, Nikolić NČ, Lazić ML. 2014. The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. Industrial Crops and Products 54: 142-148.

Khanahmadi M, Janfeshan K. 2006. Study on antioxidation property of *Ferulago angulate* plant. Asian Journal of Plant Sciences 5 (3): 521-526.

Kiziltas H, Ekin S, Bayramoglu M, Akbas E, Oto G, Yildirim S, Ozgokce F. 2017. Antioxidant properties of *Ferulago angulata* and its hepatoprotective effect against

N-nitrosodimethylamine-induced oxidative stress in rats. Pharmaceutical Biology 55 (1): 888-897.

Leopoldini M, Marino T, Russo N, Toscano M. 2004. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. The Journal of Physical Chemistry A 108 (22): 4916-4922.

Li Z, Lee HW, Liang X, Liang D, Wang Q, Huang D, Ong CN. 2018. Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of 12 cruciferous vegetables. Molecules 23 (5): E1139.

Lin D, Xiao M, Zhao J, Li Z, Xing B, Li X, Chen H. 2016. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. Molecules 21 (10): 1374.

Lorigooini Z, Koravand M, Haddadi H, Rafieian-Kopaei M, Shirmardi HA, Hosseini Z. 2019. A review of botany, phytochemical and pharmacological properties of *Ferulago angulata*. Toxin Reviews 38 (1): 13-20.

Mollaei S, Habibi B, Amani Ghadim A, Shakouri M. 2018. A green approach for the synthesis of silver nanoparticles using *Lithospermum officinale* root extract and evaluation of their antioxidant activity. Journal of Particle Science & Technology 3 (4): 187-195.

Mozaffarian V. 2008. Flora of Ilam. Farhang Moaser Publication, Tehran, Iran.

Naghiha R, Keshtkaran A, Hosseini H. 2015. Effects of ethanolic Chavill extract on growth of lactobacillus and salmonella bacteria, in skimmed milk and imaging gastric-intestine media in vitro. Armaghane Danesh 20 (5): 393-403.

Nile SH, Nile AS, Keum YS. 2017. Total phenolics, antioxidant, antitumor, and enzyme inhibitory activity of Indian medicinal and aromatic plants extracted with different extraction methods. 3 Biotech 7 (1): 76.

Nimse SB, Pal D. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. Rsc Advances 5 (35): 27986-28006.

Oniszczuk A, Podgórski R, Oniszczuk T, Żukiewicz-Sobczak W, Nowak R, Waksmundzka-Hajnos M. 2014. Extraction methods for the determination of phenolic compounds from *Equisetum arvense* L. herb. Industrial Crops and Products 61: 377-381.

Perron NR, Brumaghim JL. 2009. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. Cell Biochemistry and Biophysics 53 (2): 75-100.

Rustaiyan A, Sedaghat S, Larijani K, Khossravi M, Masoudi S. 2002. Composition of the essential oil of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss. from Iran. Journal of Essential Oil Research 14 (6): 447-448.

Sadeghi E, Mahtabani A, Etminan A, Karami F. 2016. Stabilization of soybean oil during accelerated storage by essential oil of *Ferulago angulate* boiss. Journal of Food Science and Technology 53 (2): 1199-1204.

Sodeifian G, Ansari K, Bamoniri A, Mirjalili B. 2011. Study of chemical composition of the essential oil of *Ferulago angulata* (Schelcht) Boiss. from Iran using supercritical fluid extraction and nanoscale injection. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 6: 161-168.

Starmans DA, Nijhuis HH. 1996. Extraction of secondary metabolites from plant material: a review. Trends in Food Science & Technology 7 (6): 191-197.

Tamuly C, Saikia B, Hazarika M, Bora J, Bordoloi MJ, Sahu OP. 2013. Correlation between phenolic, flavonoid, and mineral contents with antioxidant activity of underutilized vegetables. International Journal Vegetable Science 19 (1): 34-44.

Varela MC. 2016. Phenolic compounds: natural antioxidants, other benefices and future perspectives. Austin Biomol Open Access 1 (1): 1001.

Vega Arroy JD, Ruiz-Espinosa H, Luna-Guevara JJ, Luna-Guevara ML, Hernández-Carranza P, Ávila-Sosa R, Ochoa-Velasco CE. 2017. Effect of solvents and extraction methods on total anthocyanins, phenolic compounds and antioxidant capacity of *Renealmia alpinia* (Rottb.) maas peel. Czech Journal of Food Science 35 (5): 456-465.

Xiong Y, Zhou L, Zhao Y, Liu Y, Liu X, Zhu G, Liu Z. 2018. Effects of different extraction methods on the extraction rates of five chemical ingredients of *Swertia mussotii* Franch by UPLC-ESI-MS/MS. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 301 (1): 120-24.

Yenge GB, More HG, Kanawade RKV, Nimbalkar CA, Patil AP. 2017. Effect of different extraction methods on yield and physico-chemical properties of garden cress (*Lepidium sativam* L.) oil. Journal of Oilseed Brassica 81 (2): 138-142.