

Effect of maceration time and type of solvent on the content of phenolic compounds and antioxidant activity of *Digitalis purpurea* L

Afsoon Rezaie Allolo¹ , Mohsen Sanikhani^{1*} , Azizollah Kheiry¹ , Maliheh Yaghoobi² 

¹Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

²Dept of Engineering, Faculty of Chemical Engineering, University of Zanjan, Zanjan, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: Jul. 9, 2023

Revised: Sep. 30, 2023

Accepted: Nov. 8, 2023

Published Online: Jan. 21, 2024

* Correspondence to:

Mohsen Sanikhani

Faculty of Agriculture,
University of Zanjan, Zanjan,
Iran

Email:

sani@znu.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: The extraction of chemical compounds from plants is influenced by various factors, such as methodology and duration of extraction, sample preparation, and the type and concentration of solvent used. This study was performed to investigate the effect of extraction time and type of solvent on the contents of phenolic compounds, flavonoids, and antioxidant activity of *Digitalis purpurea* L. plant.

Material & Methods: An experiment based on a completely randomized design in a factorial arrangement with three replications was conducted at the Horticulture Laboratory at the University of Zanjan, Zanjan, Iran, in 2021. The experimental treatments included two levels of extraction duration (24 and 48 h) as the main factor, and two levels of methanol, ethanol, and acetone solvents (100% and 80%), compared with the control (distilled water), as sub-factors. Extraction of purple foxglove leaf powder was done by macerating 24 or 48 h using two levels of methanol, ethanol, or acetone as solvents (100%, 80%, and distilled water for the control). Evaluation of phenolic compounds, flavonoids, and antioxidant activity was performed. The resulting data were analyzed in SAS software version 9, and mean comparisons were performed by Duncan's Multi-Range Tests at the 1% and 5% probability levels. To determine the correlation between parameters, Pearson's correlation coefficient was checked using SPSS version 20 software.

Results: The results showed that there was a significant difference between 24 and 48 h of maceration to extract chemical compounds ($P < 0.01$). The highest amounts of total phenol (24.75 mg GAE/g dw) and antioxidant activity (71.36%) were obtained in 80% acetone extract, and the maximum flavonoid content (6.03 mg Q/g dw) was achieved in 80% ethanol and 48 h maceration time. Generally, increasing the maceration time from 24 h to 48 h caused a significant rise in the extraction of phenolic compounds, flavonoids, and antioxidant activity. Moreover, there was a positive correlation between flavonoid content ($P = 0.86$) and phenolic content ($P = 0.82$) with antioxidant activity.

Discussion & Conclusion: According to the results, increasing the extraction time and also utilizing hydroalcoholic solvents were more effective in extracting these compounds than pure alcohols.

Keywords: Antioxidant, Flavonoid, Methanol, Acetone, Phenol, *Digitalis purpurea* L

➤ How to cite this paper

Rezaie-allolo A, Sanikhani M, Kheiry A, Yaghoobi M. Effect of maceration time and type of solvent on the content of phenolic compounds and antioxidant activity of *Digitalis purpurea* L. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2024;31(6): 11-22.



بررسی اثر مدت زمان عصاره‌گیری و نوع حلال بر میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه گل انگشتانه ارغوانی (*Digitalis purpurea L.*)

افسون رضایی علولو^۱ ID، محسن ثانی‌خانی^{۱*} ID، عزیزاله خیری^۱ ID، ملیحه یعقوبی^۲ ID

^۱ گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
^۲ مرکز مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۱۸

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۱۱/۰۱

نویسنده مسئول:

محسن ثانی‌خانی

گروه باغبانی، دانشکده

کشاورزی، دانشگاه زنجان،

زنجان، ایران

Email:

sani@znu.ac.ir

مقدمه: استخراج ترکیبات شیمیایی از گیاهان تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند روش و مدت زمان عصاره‌گیری، نحوه آماده‌سازی نمونه‌ها، نوع و غلظت حلال استفاده‌شده قرار دارد. این تحقیق به منظور بررسی اثر مدت زمان عصاره‌گیری و نوع حلال بر مقادیر ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه گل انگشتانه ارغوانی انجام شد.

مواد و روش‌ها: آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه دانشگاه زنجان در سال ۱۴۰۰ اجرا گردید. تیمارهای آزمایش شامل دو سطح مدت زمان عصاره‌گیری (۲۴ و ۴۸ ساعت) به عنوان عامل اصلی و دو سطح حلال‌های متانول، اتانول و استون (۱۰۰ و ۸۰ درصد) به همراه شاهد (آب مقطر) به عنوان عامل‌های فرعی به کار برده شدند. ارزیابی میزان ترکیبات فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی انجام گردید. تجزیه داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS vol.9 و مقایسه میانگین داده‌ها از طریق آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد تجزیه و تحلیل شدند. برای تعیین همبستگی میان مؤلفه‌ها، ضریب همبستگی پیرسون با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.20 بررسی گردید.

یافته‌های پژوهش: نتایج نشان داد که میان دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت عصاره‌گیری برای استخراج ترکیبات شیمیایی تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.01$). بیشترین میزان فنل کل (۲۴/۷۵ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۷۱/۳۶ درصد) با عصاره استونی ۸۰ درصد و بیشترین مقدار فلاونوئید کل (۶/۰۳ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) با عصاره حاصل از حلال اتانول ۸۰ درصد با ۴۸ ساعت زمان عصاره‌گیری به دست آمد. در کل، افزایش مدت زمان عصاره‌گیری از ۲۴ به ۴۸ ساعت روند افزایشی معنی‌داری را در استخراج ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجب شد؛ همچنین همبستگی مثبتی میان محتوای فلاونوئیدی ($P = 0.86$) و فنلی ($P = 0.82$) با فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج، افزایش مدت زمان عصاره‌گیری و نیز استفاده از حلال‌های هیدروالکی نسبت به الکل‌های خالص در استخراج این ترکیبات مؤثرتر عمل می‌کنند و می‌تواند برای رسیدن به یک بازدهی خوب از لحاظ استخراج ترکیبات فنلی به کار گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، فلاونوئید، متانول، استون، فنل، گل انگشتانه

استناد: رضایی علولو افسون، ثانی‌خانی محسن، خیری عزیزاله، یعقوبی ملیحه. بررسی اثر مدت زمان عصاره‌گیری و نوع حلال بر میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه گل انگشتانه ارغوانی (*Digitalis purpurea L.*). مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، بهمن ۱۴۰۲؛ ۳۱(۶): ۲۲-۱۱.



در مطالعه‌ای که بر گونه‌های مختلفی از جنس *Digitalis* صورت گرفت، نتایج نشان داد که میزان ترکیبات فنلی *D. lamarckii* و *subsp. ferruginea D. ferruginea* میزان فنل کل (به ترتیب ۳۵/۷ و ۳۶/۶ میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) مشابه داشتند؛ اما از لحاظ میزان فلاونوئید، گونه *D. lamarckii* میزان فلاونوئید بالاتری (۴۴/۹۹ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) نسبت به گونه *D. ferruginea subsp ferruginea* (۲۰/۷۸ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) نشان داد (۶).

ترکیبات فنلی تنوع بالا و توزیع گسترده‌ای در گیاهان دارند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی فنل‌ها ناشی از توانایی احیاکنندگی و ساختار شیمیایی آن‌ها است که قدرت خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و نیز مبارزه با گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از طریق ایجاد کمپلکس با یون‌های فلزی را به این ترکیبات می‌دهد؛ همچنین مهار واکنش‌های اکسایش چربی با اهدا کردن الکترون به رادیکال‌های آزاد توسط این ترکیبات صورت می‌گیرد (۷). ROSها در صورت کنترل نشدن به سبب واکنش‌پذیری بالا و فعالیت‌های مخربی که نسبت به پروتئین‌ها، DNA و لیپیدها دارند، از طریق پراکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌ها موجب آسیب بافت‌ها، جهش‌های ژنی و در نهایت، ایجاد انواع بیماری‌ها مانند آلزایمر، دیابت نوع یک، فشارخون بالا و سرطان می‌گردد (۸، ۹). گزارشی مبنی بر گستردگی و فعالیت بیولوژیکی متنوعی از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد التهابی فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی در گیاهان توسط پژوهشگران ارائه شده است (۱۰) و از سویی، این ترکیبات نقش احیاکننده، شلاته‌کننده فلزات و دهنده هیدروژن دارند؛ بنابراین، دارای آثار آنتی‌اکسیدانی به علت تأثیر احیاکنندگی هستند (۱۱).

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که فرایند اکسیداسیون را مهار و عمر ماده اکسیدشونده را طولانی‌تر می‌کنند؛ همچنین این ترکیبات در غلظت‌های پایین قادر به مهار فرایند اکسیداسیون ناشی از ROSها هستند (۸). آنتی-اکسیدان‌ها دارای فعالیت‌هایی مانند افزایش قدرت

گل انگشتانه ارغوانی با نام علمی *Digitalis purpurea L.* از خانواده میمون (Scrophulariaceae)، گیاهی است بوته‌ای، استوار، دوساله و به‌ندرت ممکن است سه تا چهار سال عمر کند. منشأ این گیاه اروپا گزارش شده است و در جنگل‌ها، بیشه‌زارها و نواحی مرطوب می‌روید (۱). در سال اول رویش، برگ‌های طوقه‌ای تخم‌مرغی شکل تشکیل می‌شود و در سال دوم رویش، گیاهان پس از گذراندن سرمای زمستان به ساقه می‌روند و گل تولید می‌کنند (۱). برگ‌ها حاوی ماده مؤثره از نوع گلیکوزیدهای قلبی (۰/۳ تا ۰/۴ درصد) است. مهم‌ترین آن‌ها عبارت‌اند از: گلیکوزید آ و ب (A & B Glycosides)، دیجیتوکسین (Digitoxin)، جیتوکسین (Gitoxin) و جیتالوکسین (Gitaloxin). برگ‌ها همچنین حاوی مقادیر متفاوتی ساپونین به نام‌های دیجیتونین (Digitonin)، جیتونین (Gitonin) و تيجونین (Tigonin) هستند (۱).

علاوه بر نقش بسیار مهم گلیکوزیدهای قلبی حاصل از گیاهان جنس *Digitalis* در طب مدرن، برخی از گونه‌های *Digitalis* در طب سنتی ترکیه به‌عنوان مدر، محرک و مقوی استفاده می‌شوند و از لحاظ درمانی بسیار حائز اهمیت هستند (۲).

با توجه به اینکه برخی از گیاهان مهم‌ترین منابع آنتی‌اکسیدانی‌اند، تحقیق در این زمینه بسیار مورد توجه و روزبه‌روز در حال افزایش است. گیاهانی که حاوی آنتی‌اکسیدان‌های بالا هستند، توانایی حفاظت از سلول‌ها در برابر آسیب‌های حاصل از تنش اکسیداتیو را دارند (۳). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در صنایع دارویی، پزشکی و کشاورزی رواج فراوانی پیدا کرده است که آثار سمی این ترکیبات انکارنشده‌ای است؛ بنابراین، دست یافتن به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با منشأ گیاهی و کاربرد آن‌ها در زمینه‌های ذکر شده به علت داشتن آثار بیولوژیک گسترده و عوارض جانبی کمتر در مقادیرهای کنترل‌شده، بسیار مطلوب است (۴). وجود یک رابطه معکوس میان سطح مواد آنتی‌اکسیدانی موجود در بدن و بیماری‌های انسانی توسط

آنتی‌اکسیدان‌های پلاسما و کاهش ابتلا به بیماری‌های مانند بیماری‌های قلبی و سرطان می‌شوند. متابولیت‌های ثانویه حاصل از قسمت‌های مختلف (ریشه، برگ، میوه و پوست) گیاهان مانند فنل و فلاونوئیدها، قدرت پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد را دارند (۱۲).

استخراج ترکیبات شیمیایی گیاهان با استفاده از تکنیک خیساندن، روشی است که با کاربرد حلال‌هایی با قطبیت‌های متفاوت انجام می‌گیرد و موجب استخراج طیف گسترده‌ای از مواد شیمیایی می‌گردد (۱۳) که در این روش، حلال به-کار گرفته شده تأثیر معنی‌داری بر میزان ترکیبات استخراج‌شده دارد (۱۴). برای استخراج پلی‌فنل‌ها از گیاهان از آب و حلال‌های آلی مانند متانول، اتانول، استون و دی‌اتیل اتر استفاده می‌شود که تفاوت فراوانی میان مقادیر این ترکیبات در عصاره‌های مختلف مشاهده می‌گردد که این امر به علت تفاوت در نحوه آماده‌سازی نمونه‌ها، نوع و غلظت حلال و مدت‌زمان عصاره‌گیری است (۱۵).

خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی در عصاره و عطریات گیاهان دارویی مختلف از اهمیت بالایی برخوردار است؛ اما از آنجا که عصاره‌های حاصل از گروه‌های مختلف حلال (آب، متانول، اتانول، استون، هگزان و...) میزان ترکیبات فنلی و نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی متفاوتی دارند و این تفاوت به علت قطبیت، ویسکوزیته و فشار بخارهای ویژه هر حلال است (۱۶)، هیچ روش آزمایشی به‌تنهایی برای بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی گیاهان کافی نیست و ترکیب چند روش متفاوت انتخاب مناسبی برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف خواهد بود (۱۷). به‌طور کلی، برای استخراج پلی‌فنل‌ها از گیاهان از آب و حلال‌های آلی مانند اتانول، متانول، استون و دی‌اتیل اتر استفاده می‌شود که در این میان، تفاوت‌های آشکاری میان مقادیر ترکیبات فنلی در عصاره‌های مختلف مشاهده می‌گردد که ناشی از نحوه آماده‌سازی نمونه‌ها، روش و مدت‌زمان عصاره‌گیری و خواص فیزیکی و شیمیایی حلال‌های به‌کاررفته است (۱۵). در تحقیقی که بر روی گیاه *Jack Etlingeraelatior* انجام گرفت، آثار حلال‌های آلی

متانول، استون (۵۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد) و آب بر میزان ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی ارزیابی شد که اختلاف معنی‌داری میان نتایج به سبب نوع حلال به‌کاررفته در ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاه گزارش گردید (۱۸). در مطالعه‌ای روی پوست بنه (*Pistacia atlantica subsp.*) آثار گروه‌های مختلف حلال (آب، متانول، اتانول، استون، اتیل‌استات و هگزان) بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار فنل کل بررسی شد و تفاوت معنی‌داری در بازده استخراج این ترکیبات مشاهده گردید که این اختلاف به قطبیت، ویسکوزیته و فشار بخارهای ویژه هر یک از حلال‌ها نسبت داده شد (۱۶)؛ بنابراین، معرفی یک نوع و غلظت مشخصی حلال و نیز مدت‌زمان عصاره‌گیری برای دستیابی به بیشترین میزان ترکیبات فنلی با بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کار ساده‌ای نخواهد بود؛ به همین سبب، این تحقیق برای تعیین بهترین مدت‌زمان عصاره‌گیری، نوع و غلظت حلال‌های مناسب استخراج و دستیابی به بالاترین مقدار این ترکیبات زیست‌فعال از گیاه دارویی گل انگشتانه ارغوانی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در تابستان سال ۱۴۰۰، به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان صورت گرفت. برای انجام آزمایش، ابتدا نمونه‌های گیاهی از برگ‌های گیاهان کشت‌شده در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زنجان تهیه شد و سپس نمونه‌ها در شرایط سایه کاملاً خشک گردید و آسیاب شد و برای عصاره‌گیری به روش خیساندن آماده گردید. در روش خیساندن، از حلال‌های متانول ۱۰۰ و ۸۰ درصد (۸۰ میلی‌لیتر متانول + ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر)، اتانول ۱۰۰ و ۸۰ درصد (۸۰ میلی‌لیتر اتانول + ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و استون ۱۰۰ و ۸۰ درصد (۸۰ میلی‌لیتر استون + ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر) همراه شاهد (آب مقطر) استفاده شد. برای این منظور، ۵ گرم از پودر برگ با ۵۰ میلی‌لیتر از حلال‌ها به‌صورت جداگانه با نسبت ۱:۱۰ (وزنی/حجمی) مخلوط گردید و به‌طور جداگانه یک گروه از فاکتورها به مدت ۲۴

اسپکتروفتومتر؛ X: میزان فنل کل

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش مهار رادیکال آزاد ۲,۲-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) اندازه‌گیری گردید. این آزمایش بر اساس واکنش رادیکال‌های آزاد پایدار DPPH با ترکیبات دهنده هیدروژن مانند فنل‌ها استوار است. ابتدا محلول ۰/۱ میلی‌مولار از DPPH تهیه شد؛ سپس ۱/۵ میلی‌لیتر عصاره به همراه ۱/۵ میلی‌لیتر از DPPH به لوله آزمایش ریخته شد. جذب آن پس از ۳۰ دقیقه قرار گرفتن در اتاق تاریک، در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (۲۲).

$$= (Ac-As)/Ac * 100 \text{ (معادله شماره ۳)}$$

Ac: میزان جذب برای نمونه شاهد مثبت؛ As: میزان

جذب نمونه گیاهی

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS vol.9 و آمار توصیفی (مقایسه میانگین) داده‌ها از طریق آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال پنج درصد تجزیه و تحلیل شدند. برای بررسی همبستگی میان مؤلفه‌ها از ضریب همبستگی پیرسون با کمک نرم‌افزار SPSS vol.20 استفاده شد.

یافته‌های پژوهش

یافته‌های حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که مدت زمان عصاره‌گیری، نوع حلال و برهم‌کنش آن‌ها بر میزان فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) گیاه دارویی گل انگشتانه ارغوانی معنی‌دار بود ($P < 0.01$) (جدول شماره ۱).

ساعت و گروهی دیگر به مدت ۴۸ ساعت در دمای معمولی آزمایشگاه روی شیکر (با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه) قرار گرفت؛ سپس همه عصاره‌ها با استفاده از کاغذ واتمن شماره یک صاف و با دور (RCF=2910) 5000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و مایع رویی برای سنجش‌های بعدی استفاده گردید (۱۹).

سنجش فنل کل: میزان فنل کل بر اساس روش فولین سیوکالتو با استفاده از گالیک اسید به عنوان استاندارد به روش میدا و همکاران (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد. به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره صاف شده ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲ درصد، ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو ۵۰ درصد اضافه گردید و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شدند. میزان جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. با قرار دادن مقدار جذب نمونه‌ها در معادله مربوط به منحنی استاندارد (معادله شماره ۱)، مقدار فنل کل موجود در عصاره‌ها محاسبه شد. در نهایت، داده‌ها بر اساس معادل میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک گیاه محاسبه گردید (۲۰).

$$Y = 0.0161x + 0.3289 \text{ (معادله شماره ۱)}$$

Y: عدد جذب نمایش داده شده در دستگاه

اسپکتروفتومتر؛ X: میزان فنل کل

سنجش فلاونوئید کل: به ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره صاف شده ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری گردید. میزان جذب نور در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. با قرار دادن مقدار جذب نمونه‌ها در معادله مربوط به منحنی استاندارد (معادله شماره ۲)، مقدار فلاونوئید کل موجود در عصاره‌ها محاسبه گردید و محتوای فلاونوئید بر حسب معادل اکوی والان‌های کوئرستین بر گرم وزن خشک محاسبه شد (۲۱).

$$Y = 0.0392x + 0.013 \text{ (معادله شماره ۲)}$$

Y: عدد جذب نمایش داده شده در دستگاه

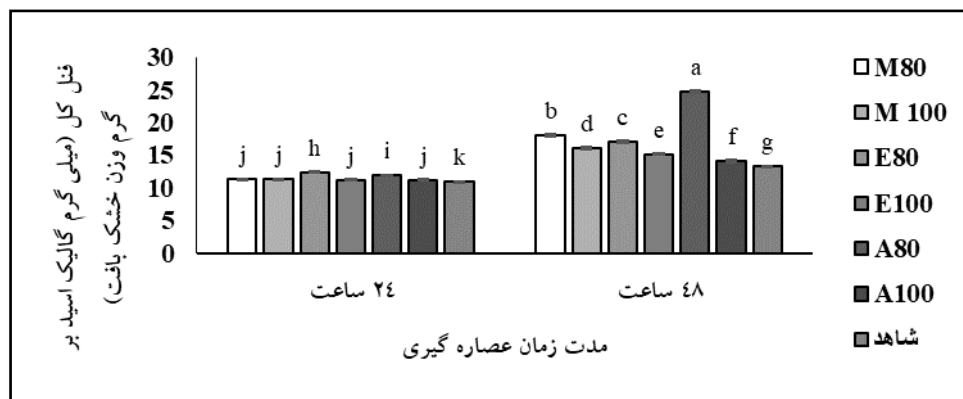
جدول شماره ۱. تجزیه واریانس اثر ساده و متقابل مدت زمان عصاره گیری و حلال‌های متانول (M)، اتانول (E) و استون (A) بر میزان فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه گل انگشتانه ارغوانی.

میانگین مربعات				منابع تغییرات
فعالیت آنتی‌اکسیدانی	فلاونوئید کل	فنل کل	درجه آزادی	
۳۳۸۹/۵۹**	۳۳/۳۸**	۳۰۹/۶۲**	۱	زمان (ساعت)
۱۲۶/۸۸**	۳/۱۷**	۲۵/۶۱**	۶	حلال
۲/۲۳**	۰/۳۵**	۱۸/۶۹**	۶	زمان * حلال
۰/۱۰	۰/۰۴	۰/۰۱	۲۸	خطا
۰/۵۸	۵/۸۶	۰/۹۴		ضریب تغییرات (در صد)

*** به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد، تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون چند دامنه Duncan. * زمان (ساعت): مدت زمان عصاره‌گیری نمونه‌ها، حلال‌ها شامل متانول (M)، اتانول (E) و استون (A)، زمان * حلال: اثر متقابل مدت زمان عصاره‌گیری و حلال‌ها.

که نشان داد، با افزایش مدت زمان عصاره‌گیری و نیز استفاده از هیدروالکل‌ها، میزان ترکیبات فنلی در عصاره‌ها افزایش یافت و به‌طور کلی، استون ۸۰ درصد بهترین عملکرد را نسبت به سایر هیدروالکل‌ها و آب کمترین تأثیر را در آزادسازی فنل کل نشان داد (شکل شماره ۱).

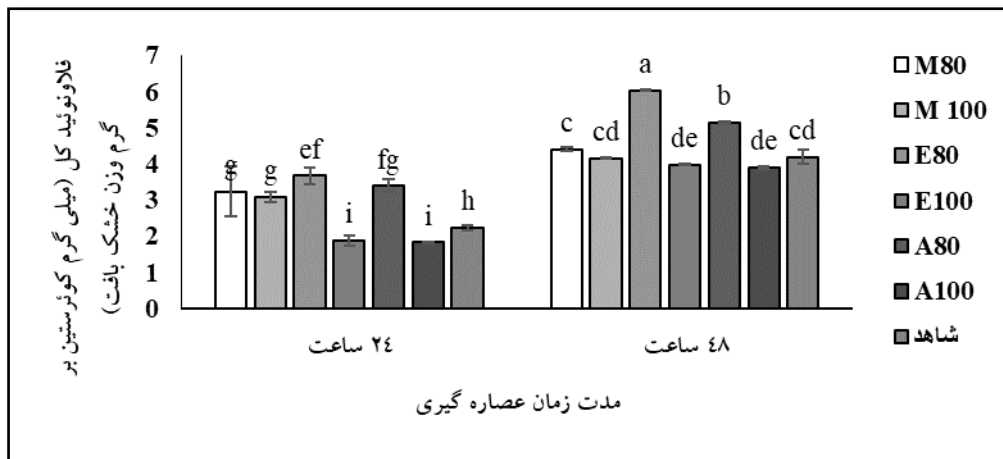
فنل کل: بیشترین محتوای فنل کل (۲۴/۷۵ میلی گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک) و کمترین مقدار آن (۱۰/۹۵ میلی گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک) به ترتیب مربوط به عصاره استونی ۸۰ درصد با مدت زمان ۴۸ ساعت عصاره‌گیری و عصاره آبی با مدت زمان ۲۴ ساعت عصاره‌گیری بود.



شکل شماره ۱. اثر متقابل مدت زمان عصاره‌گیری و متانول (M)، اتانول (E) و استون (A) بر میزان فنل کل. علامت بارهای روی ستون‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد (ES) است. ستون‌های دارای حروف مشابه نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار میان تیمارها است.

کوئرتستین بر گرم وزن خشک) در عصاره اتانولی ۸۰ درصد با ۴۸ ساعت عصاره‌گیری و کمترین میزان آن (۱/۸۲ میلی گرم کوئرتستین بر گرم وزن خشک) در عصاره استونی ۱۰۰ درصد با مدت زمان ۲۴ ساعت عصاره‌گیری مشاهده شد (شکل شماره ۲).

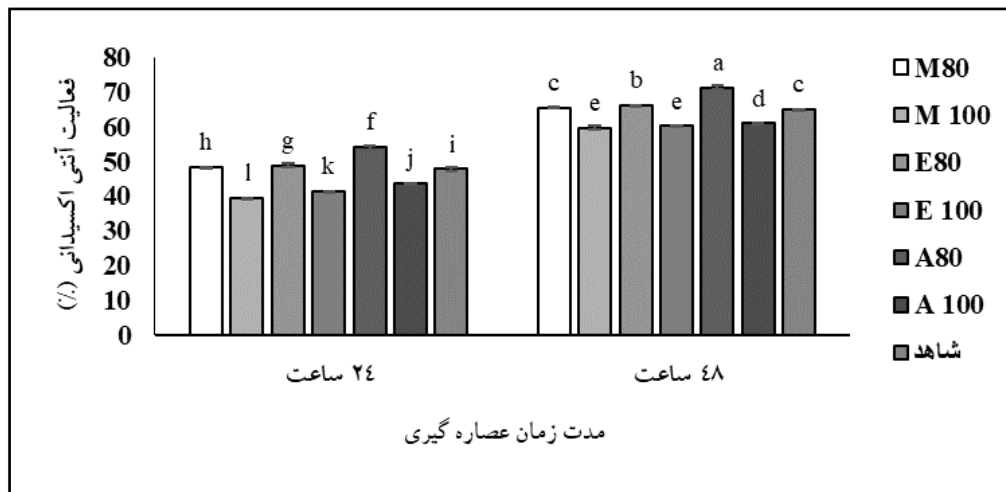
فلاونوئید کل: بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، با افزایش مدت زمان عصاره‌گیری از ۲۴ به ۴۸ ساعت و کاهش درصد الکل‌ها از ۱۰۰ به ۸۰ درصد، میزان فلاونوئید کل در همه عصاره‌ها افزایش پیدا کرد، به‌طوری که بیشترین قابلیت استخراج ترکیبات فلاونوئیدی با (۶/۰۳ میلی گرم



شکل شماره ۲. اثر متقابل مدت زمان عصاره‌گیری و متانول (M)، اتانول (E) و استون (A) بر میزان فلاونوئید کل. علامت بارهای روی ستون‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد (ES) است. ستون‌های دارای حروف مشابه نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار میان تیمارها است.

بیشترین مقدار آن (۷۱/۳۶ درصد) در عصاره استونی ۸۰ درصد با ۴۸ ساعت عصاره‌گیری به دست آمد که نسبت به کمترین مقدار آن (۳۹/۳۶ درصد) از عصاره متانولی ۱۰۰ درصد با مدت زمان ۲۴ ساعت عصاره‌گیری، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: مطابق با نتایج نشان داده شده در شکل شماره ۳ و بر اساس آزمون DPPH، افزایش غلظت الکل‌ها از ۸۰ به ۱۰۰ درصد موجب کاهش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌های هیدروالکلی نسبت به عصاره آبی شد. به‌طور کلی، با افزایش مدت زمان عصاره‌گیری از ۲۴ به ۴۸ ساعت، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش پیدا کرد و



شکل شماره ۳. اثر متقابل مدت زمان عصاره‌گیری و متانول (M)، اتانول (E) و استون (A) بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی. علامت بارهای روی ستون‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد (ES) است. ستون‌های دارای حروف مشابه نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار میان تیمارها است.

آنتی‌اکسیدانی با فلاونوئید کل ($P=0.86$) نشان‌دهنده وجود همبستگی مثبت میان این دو شاخصه بود (جدول شماره ۲).

بررسی ضریب همبستگی پیرسون میان میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با فنل کل ($P=0.82$) و نیز میان فعالیت

جدول شماره ۲. بررسی ضریب همبستگی پیروسون میان متغیرهای فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه دارویی گل انگشتانه ارغوانی.

DPPH	فلاونوئید کل	فنل کل	متغیر
		۱	فنل کل
		۱۰/۷۴**	فلاونوئید کل
۱	۰/۸۶**	۰/۸۲**	DPPH

**،* به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد، بررسی ضریب همبستگی با Pearson Correlation

بحث و نتیجه‌گیری

ترکیبات فنلی از تنوع بالا و توزیع وسیعی در گیاهان برخوردار هستند. این ترکیبات خاصیت آنتی‌اکسیدانی ناشی از قدرت احیاکنندگی و ساختار شیمیایی دارند که به این ترکیبات قدرت خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و نیز مبارزه با ROSها از طریق ایجاد کمپلکس با یون‌های فلزی را می‌دهد؛ همچنین این ترکیبات با اهدا کردن الکترون به رادیکال‌های آزاد، واکنش‌های اکسایش چربی را مهار می‌کنند (۷).

در پژوهش حاضر، کاربرد هیدروالکل‌ها و آب مقطر نسبت به الکل‌های خالص، میزان استخراج بالایی از ترکیبات فنلی را در هر دو مدت‌زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت عصاره‌گیری نشان دادند و بالاترین میزان فنل کل (۲۴/۷۵ میلی‌گرم گالیک-اسید بر گرم وزن خشک) مربوط به عصاره استونی ۸۰ درصد با ۴۸ ساعت عصاره‌گیری بود. بسیاری از محققان گزارش کرده‌اند که هیدروالکل‌ها نسبت به الکل‌های خالص، برای استخراج ترکیبات فنلی بسیار مؤثرتر عمل می‌کنند (۲۳) که علت این امر را به نفوذ بیشتر آب و افزایش پدیده اسمز نسبت داده‌اند که موجب افزایش قابلیت حل شدن فنل و در نتیجه، افزایش استخراج آن می‌شود (۲۴). در تحقیقی، تأثیر تیمار حلال‌های متانول، اتانول و استون (۵۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد) و آب مقطر بر میزان ترکیبات فنلی میوه عناب (Ziziphus jujuba Miller) بررسی شد و نتایج نشان داد که استون ۵۰ درصد در استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بهترین عملکرد را در میان سایر حلال‌ها داشته و در همه موارد، آب از حداقل قابلیت استخراج برخوردار بوده است (۲۵).

از مهم‌ترین عواملی که در انتخاب نوع حلال و غلظت آن می‌تواند نقش داشته باشد، نوع ترکیبات

فیتوشیمیایی مختص هر گیاه و مدت‌زمان استخراج است. طبق گزارش‌های محمدی و همکاران، بیشترین میزان ترکیبات فنلی استخراج‌شده از پوست خرمالو مربوط به عصاره اتانولی بود (۲۶). در مطالعه‌ای که روی گیاه گل زنجبیلی قرمز (Etingera elatior Jack) انجام شد، نتایج نشان داد که بیشترین میزان ترکیبات فنلی از عصاره استونی ۵۰ درصد به‌دست آمد (۱۸)؛ همچنین نتایج تحقیقی نشان داد که میزان ترکیبات فنلی عصاره استونی، اتانولی و متانولی به ترتیب حاوی بالاترین میزان ترکیبات فنلی هستند (۲۷). تفاوت موجود در میزان ترکیبات فنلی کل در عصاره‌های مختلف را می‌توان به نحوه آماده‌سازی نمونه‌ها، روش‌های استخراج و مدت‌زمان استخراج مربوط دانست؛ اما مهم‌ترین علت این امر قطبیت و ویسکوزیته پایین حلال در آزادسازی ترکیبات فنلی است (۱۵).

فلاونوئیدها ترکیبات دی‌فنیل پروپانوییدی هستند که تقریباً در همه گیاهان یافت می‌شوند و نقش‌های فراوانی در گیاهان عالی از جمله دفاع در برابر نور ماوراءبنفش، پاتوزنها و علفخواران دارند. نقش ویژه آن‌ها در گیاهان، ایجاد رنگ و تثبیت نیتروژن در گیاهانی است که زندگی همزیستی دارند. آثار سلامت فلاونوئیدها بیشتر در نتیجه خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و توانایی کلات‌کنندگی (توانایی احیاکنندگی آهن) آن‌ها است. نقش فلاونوئیدها به‌عنوان عوامل ضدقارچی، ضدباکتریایی، ضدویروسی، آنتی‌اکسیدانت، بازدارنده آنزیمی و عوامل موتاژنی سمی به اثبات رسیده است (۲۸).

در مطالعه حاضر، افزایش مدت‌زمان عصاره‌گیری موجب افزایش و برعکس، افزایش غلظت حلال‌ها موجب

(۳۳). در عصاره‌گیری به روش خیساندن، افزایش زمان استخراج به سبب اینکه فرصت کافی برای انتشار مقدار مناسبی از حلال به داخل سلول‌ها و به دنبال آن، خروج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند فنل‌ها و فلاونوئیدها از محل استقرارشان را فراهم می‌کند، بازدهی روش استخراج را افزایش می‌دهد (۳۴). استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از مواد گیاهی به حلالیت این ترکیبات در حلال‌های مختلف بستگی دارد. علاوه بر این، قطبیت حلال‌های استفاده‌شده نقش مهمی را در افزایش حلالیت این ترکیبات ایفا می‌کند (۳۵). گیاهانی که ترکیبات فنلی بالایی دارند، از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی نیز برخوردار هستند؛ بنابراین، توجه به روند استخراج ترکیبات فنلی که از عوامل مهم در تعیین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی به‌شمار می‌رود، ضروری است (۳۱، ۱۰).

نتایج مشابهی با نتایج پژوهش حاضر در تحقیقات مختلف گزارش شده است؛ از جمله در تحقیقی که روی گیاه سنا انجام شده بود، بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی از عصاره استونی به‌دست آمد (۳۲) که در بررسی حاضر نیز استون ۸۰ درصد نسبت به سایر حلال‌ها، افزایش معنی‌داری را در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها موجب شد؛ همچنین در تحقیق انجام‌گرفته بر دانه‌های جو با حلال‌های اتانولی، متانولی و استونی، عصاره استونی بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نسبت به عصاره‌های اتانولی و متانولی نشان داد (۲۷) که با نتایج تحقیق حاضر همسو بود. در تحقیقی که بر خواص آنتی‌اکسیدانی گونه‌های مختلف لامیاسه صورت گرفت، نتایج نشان داد که میزان ترکیبات فنلی و در نتیجه، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های اتانولی نسبت به عصاره متانولی بیشتر بود (۳۶). در مطالعه‌ای که بر پوست فندق با استفاده از حلال‌های مختلف انجام گرفت، نتایج نشان داد، با اینکه عصاره متانولی از لحاظ استخراج ترکیبات فنلی بازدهی بالاتری داشت؛ اما عصاره اتانولی از لحاظ قدرت به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد فعالیت بیشتری نشان داد (۳۷) که در تحقیق حاضر نیز، عصاره‌های اتانولی نسبت به عصاره‌های متانولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی داشتند.

در مطالعه حاضر، بررسی ضریب همبستگی پیرسون

کاهش میزان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی شد. بالاترین مقدار فلاونوئید کل از عصاره اتانولی ۸۰ درصد با مدت زمان ۴۸ ساعت عصاره‌گیری به‌دست آمد که نسبت به کمترین مقدار آن که از عصاره استونی ۱۰۰ درصد با ۲۴ ساعت عصاره‌گیری حاصل شد، تفاوت معنی‌داری را نشان داد که محققان مختلف علت این تفاوت مشاهده‌شده در میان عصاره‌های مختلف را به تفاوت در قطبیت حلال‌ها و حلالیت این ترکیبات در حلال‌های مختلف نسبت داده‌اند و بیان شده است که قطبیت حلال‌ها در افزایش حلالیت این ترکیبات نقش مهمی دارند (۲۹). در پژوهشی، در عصاره‌گیری با حلال‌های مختلف در گیاه چای، استون ۵۰ درصد نسبت به اتانول و متانول، به‌عنوان مؤثرترین حلال در استخراج ترکیبات شیمیایی این گیاه گزارش گردید که علت تفاوت مشاهده‌شده در میان عصاره‌های مختلف به تکنیک عصاره‌گیری و مدت‌زمان عصاره‌گیری نسبت داده شد (۱۸). افزایش دو برابری میزان فلاونوئید کل در گیاه گزنه با افزایش مدت‌زمان خیساندن با حلال کلروفرم نسبت به روش ماکروویو و فراصوت از سوی قره‌خانی و همکاران (۱۳۸۹) گزارش گردیده است (۳۰) که در پژوهش حاضر نیز، افزایش مدت‌زمان عصاره‌گیری (مدت‌زمان خیساندن) از ۲۴ به ۴۸ ساعت، موجب افزایش معنی‌داری در میزان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی شد.

در مطالعه حاضر، افزایش غلظت الکل‌ها از ۸۰ به ۱۰۰ درصد موجب کاهش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌های هیدروالکلی نسبت به عصاره آبی گردید؛ اما به‌طور کلی، با افزایش مدت‌زمان عصاره‌گیری از ۲۴ به ۴۸ ساعت، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها افزایش پیدا کرد و بیشترین مقدار آن (۷۱/۳۶ درصد) در عصاره استونی ۸۰ درصد با ۴۸ ساعت عصاره‌گیری به‌دست آمد. روند افزایشی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با افزایش مدت‌زمان عصاره‌گیری را می‌توان با این علت توجیه کرد که در روش خیساندن، استخراج ماده مؤثره از بافت‌های گیاهی بر اساس پدیده نفوذ حلال به داخل بافت‌های گیاهی و انتشار حلال به همراه مواد حل‌شده در آن به داخل حلال صورت می‌گیرد

در این پژوهش مطالعه‌ای روی انسان و حیوان انجام نشده و بدون کد اخلاق است.

میان متغیرهای فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که محتوای فنلی و فلاونوئیدی عصاره‌های حاصل از حلال‌های مختلف با میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها همبستگی مثبت دارد که این امر به علت خاصیت کاهشی ترکیبات فنلی است که به‌عنوان عامل کاهنده و دهنده هیدروژن و جداکننده اکسیژن ایفای نقش می‌کند (۳۸).

تاکنون مطالعه‌ای درباره تأثیر حلال‌های مختلف و مدت‌زمان عصاره‌گیری بر استخراج ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه دارویی گل انگشتانه ارغوانی انجام نگرفته است. با توجه به روند افزایشی معنی‌داری که در استخراج ترکیبات مدنظر با افزایش مدت‌زمان خیساندن از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت مشاهده شد، به‌نظر می‌رسد برای رسیدن به میزان ترکیبات مؤثره با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا از گیاه گل انگشتانه ارغوانی، به زمان حداقل ۴۸ ساعت نیاز باشد. در مجموع، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزایش مدت‌زمان عصاره‌گیری و نیز استفاده از حلال‌های هیدروالکلی نسبت به الکل‌های خالص، در استخراج این ترکیبات مؤثرتر عمل می‌کنند و می‌توانند برای رسیدن به یک بازدهی خوب از لحاظ استخراج ترکیبات فنلی به کار گرفته شوند. یکی از محدودیت‌های مهم پیش‌آمده در این مطالعه کاهش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با افزایش غلظت حلال‌ها بود که پیشنهاد می‌شود، برای تعیین بهترین غلظت حلال‌های مختلف برای استخراج عصاره‌های بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، پژوهش‌های بیشتری توسط محققان انجام گیرد.

سپاس‌گزاری

نویسندگان از همه کسانی که در این پژوهش همکاری داشتند، تشکر می‌کنند.

تعارض منافع

بدین‌وسیله نویسندگان اظهار می‌دارند که هیچ تعارض منافی درباره این تحقیق وجود ندارد. همه نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش تمام بخش‌های تحقیق حاضر مشارکت داشته‌اند.

کد اخلاق

References

- Omid baigi R. Production and Processing of Medicinal Plants. 2nd ed. Astan Quds Publication. 2008; P. 304-6. (Persian)
- Benli M, Yigit N, Geven F, Guney K, Bingol U. Antimicrobial activity of endemic *Digitalis lamarckii* Ivan from Turkey. *Indian J Exp Biol* 2009; 47: 218-21.
- Kumaran A, Karunakaran RJ. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem* 2006; 97:109-14. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.03.032.
- Milos H. Value-Function Approximations for Partially Observable Markov Decision Processes. *JAIR* 2011; 2000: 33-94. doi:10.48550/arXiv.1106.0234.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extract containing phenolic compounds. *Food Chem* 2006; 97: 654-60. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.04.028.
- Katanic J, Ceylan R, Matic S, Boroja T, Zengin G, Aktumsek A, et al. Novel perspectives on two *Digitalis* species: Phenolic profile, bioactivity, enzyme inhibition, and toxicological evaluation. *S Afr J Bot* 2017;109: 50-57. doi: 10.1016/j.sajb.2016.12.004.
- Ahmadi F, Kadivar M, Shahedi M. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Moza in model and food systems. *Food Chem* 2007; 105: 57-64. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.03.056.
- Chirag P, Tyagi S, Halligudi N, Yadav J, Pathak S, Singh S, et al. Antioxidant activity of herbal plants: a recent review. *JDDT* 2013; 1: 1-8.
- Ismail M, Ismail H I, Chan KW, Mariod AA. Phenolic content and antioxidant activity of Cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chem* 2010; 119: 643-47. doi: 10.11648/j.ijnfs.20160501.13.
- Jamshidi M, Ashtiani HR, Rezazade Sh, Fathiazad F, Mazandarani M, Khaki A. Evaluation and Comparison of phenolic compounds and antioxidant activity of some plant species in mazandaran. *J Med Plants* 2010; 9: 177-82. doi: 20.1001.1.2717204.2010.9.34.19.7.
- Safi Z, Saeidi K, Lorigooini Z, Shirmardi HA. Evaluation of total phenols and antioxidant activity of Mullein (*Verbascum songaricum*) ecotypes. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2016; 17: 68-75. (Persian)
- Mathew S, Abraham TE. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food Chem* 2006;44: 198-206. doi: 10.1016/j.fct.2005.06.013.
- Pokorny J, Yanislleva N, Gordom M. Antioxidants in food-Practical Applications. Wood head Publishing Ltd and CRC Press LLC.2001; P. 140.
- Rafaela GM, Gloria Lobo M, Monica G. The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. *Sep Purif Technol* 2010; 71: 347-355. doi: 10.1016/j.seppur.2009.12.022.
- Hayouni E, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem* 2007; 105:1126-34. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.02.010.
- Rezaie M, Farhoosh R, Iranshahi M, Sharif A, Golmohamadzadeh S. Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull using various solvents of different physicochemical properties. *Food Chem* 2015; 173:577-83. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.081.
- Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem* 2004;85: 633-40. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.07.024.
- Jeevani MM, Bhat R, Karim AA. Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etligeria elatior* Jack.) inflorescence. *J Food Compos Anal* 2011; 24:615-19. doi: 10.1016/j.jfca.2010.09.018.
- Lin M, Tsai M, Wen K. Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Scutellaria Radix*. *J Chromatogr A* 1999; 830: 387-95. doi:10.1016/S0021-9673(98)00906-6.
- Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their scavenging activity. *Food Chem* 2005; 91: 571-77. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.10.006.
- Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *JFDA* 2002; 10: 178-82. doi:10.38212/2224-6614.2748.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT* 1995; 28:25-30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
- Vilkhu K, Raymond M, Simons L, Bates D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry A

- review. *IFSET* 2007; 9: 161-69. doi: 10.1016/j.ifset.2007.04.014.
24. Nirmal SA, Patel AP, Bhawar SB, Pattan SR. Antihistaminic and antiallergic actions of extracts of *Solanum nigrum* berries: Possible role in the treatment of asthma. *J Ethnopharmacol* 2012; 142: 91-97. doi: 10.1016/j.jep.2012.04.019.
 25. Davarynejad G, Taghizadeh S, Asili J. Effect of different solvents on total phenolic contents and antioxidant activity of *Zizyphus jujube* Miller fruits. *J Hort Sci* 2017; 31: 158-66. doi: 10.22067/jhorts4.v0i0.47986.
 26. Mohamadi M, Elhamirad AH, Pourfallah Z. Determination of total phenolic compound contents and antioxidant capacity of persimmon skin. *Food Sci* 2012; 2: 41-55. (In Persian).
 27. Liu Q, Yao H. Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chem* 2007; 102:732-37. doi: 10.12691/jfnr-7-2-7.
 28. Medica-Saric M, Jasprica I, Smolicic-Bubalo A, Mornar A. Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. *Croat Chem Acta* 2004; 77: 361-66.
 29. Silva EM, Souza JNS, Rogez H, Rees JF, Larondelle Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chem* 2007; 101:1012-18. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.02.055.
 30. Gharekhani M, Ghorbani M, Ebrahimzadeh MA, Jaafari SM, Sadeghi Mahoonak AR. Compare different methods of phenolic and flavonoid compounds extraction from *Urtica dioica* L. *Iran J Med Aroma Plants* 2010; 26: 389-405. (In Persian).
 31. Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajid N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr J Biotechnol* 2006; 1142-45.
 32. Masoko D, Galolo S, Mokgotho MP, Eloff JN, Howard RI, Mampara LJ. Evaluation of the antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities of the acetone extract of the roots of sennaitulical (fabaceae). *JTCM* 2010; 7:138-48. doi:10.4314/AJTCAM.V7I2.50873.
 33. Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus species peels and tissues. *Pak J Pharm Sci* 2009; 22: 277-81.
 34. Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S. Microwave assisted extraction, an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Phcog Rev* 2007; 1: 8-14.
 35. Kamkar A, Jebelli Javan A, Asadi F, Kamalinejad M. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 1796-800. doi: 10.1016/j.fct.2010.04.003.
 36. Khanavi M, Hajimahmoodi M, Cheraghi-Niroomand M, Kargar Z, Ajani Y, Hadjiakhoondi A, et al. Comparison of the antioxidant activity and total phenolic contents in some *Stachys* species. *Afr J Biotechnol* 2009; 8:1143-47.
 37. Locatelli M, Travaglia F, Coisson JD, Martelli A, Stevigny C, Arlorio M. Analytical methods total antioxidant activity of hazelnut skin (*NocciolaPiemonte* PGD): Impact of different roasting conditions. *Food Chem* 2010;119: 1647-55. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2009.08.048.
 38. Chang ST, Wu JH, Wang SY, Kang PL, Yang NS, Shyur LF. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 3420-24. doi: 10.1021/jf0100907.