

اثر استخراجی التراسوند پروپ بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی فنول آزاد و باند شده عصاره زوفا

حدیث عظیمی‌نژاد^۱، رضا اسماعیل‌زاده‌کناری^{۲*} و زینب رفتنی‌امیری^۲

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۲

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

^۲ دانشیار گروه صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

*مسئول مکاتبه: Email: reza_kenari@yahoo.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: با جداسازی فراکسیون‌های فنولی آزاد و باندشده و تعیین محتوای فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌توان به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی و یک روش پیشگیری برای کاهش اثرات منفی ناشی از استرس اکسیداتیو استفاده نمود. هدف: این مطالعه باهدف استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از برگ گیاه زوفا (*Hyssopus officinalis*) انجام شد. روش‌کار: با استفاده از اولتراسوند پروپ تحت شرایط زمانی ۱۰ و ۲۰ دقیقه و شدت ۶۰ و ۱۰۰ وات و استفاده از حلال اتانول: آب با نسبت‌های (۸۰:۲۰) و (۵۰:۵۰) و جداسازی فراکسیون فنولی آزاد از عصاره‌ها با استفاده از حلال متانول و اولتراسوند و سپس جداسازی فراکسیون‌های فنولی باندشده با استفاده از حلال سود و اولتراسوند انجام گرفته است. و فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسط آزمون‌های مهار رادیکال آزاد (DPPH) و سنجش بی‌رنگ شدن بتاکاروتن - لینولئیک‌اسید و آزمون پایداری اکسایشی (OSI)، صورت گرفت. نتایج: تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که شرایط بهینه برای استخراج، مربوط به تیمار ۸۰ درصد اتانولی شدت ۱۰۰ و زمان ۲۰ دقیقه (۸۰-۲۰-۱۰۰) بوده که بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و فنولی آزاد و باند شده را دارد و بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پایداری اکسایشی را فراکسیون‌های فنولی آزاد نشان دادند. نتیجه‌گیری نهایی: می‌توان نتیجه گرفت که عصاره برگ زوفا به دلیل مقادیر قابل توجه ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بالا است که بین این ترکیبات و فعالیت آنتی‌اکسیدانی رابطه مستقیم وجود دارد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی فنول آزاد بیشتر از فنول باندشده است. همچنین اولتراسوند پروپ می‌تواند یک روش مناسب برای تولید عصاره‌های گیاهی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا باشد.

واژگان کلیدی: اولتراسوند پروپ، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، زوفا، ترکیبات فنولیک، فنول آزاد، فنول باند شده

مقدمه

عوامل، از قبیل سیگار کشیدن، پرتوافکنی و آلاینده‌های محیطی، می‌تواند باعث القاء استرس اکسایشی بیش‌ازحد در بدن انسان و افزایش ریسک ابتلا به این قبیل بیماری‌ها شود. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند به‌عنوان یک روش پیشگیری برای کاهش اثرات منفی ناشی از

استرس اکسایشی بیش‌ازحد باعث بیماری‌های مزمن چندگانه می‌شود، این بیماری‌ها از قبیل دیابت، بیماری‌های قلبی عروقی و سرطان و بیماری‌های مرتبط به پیری است (کاواباتا و همکاران ۲۰۱۵). بسیاری از

استرس اکسیداتیو استفاده شوند. (رولیرا و همکاران ۲۰۱۵) فیتوکمیکال‌ها با کاهش اکسیداسیون LDL، کاهش جذب و سنتز کلسترول، کاهش فشارخون و افزایش زمان لخته شدن خون بیماری‌های قلبی عروقی را کاهش می‌دهند و همچنین خاصیت پیشگیری شیمیایی بالقوه‌ی این ترکیبات از سرطان، ناشی از توانایی آن‌ها در تعدیل تغییرات اپی‌ژنتیک سلول‌های سرطانی است. مرحله اصلاح اپی‌ژنتیک در اوایل تکامل سلول سرطانی که قابل‌برگشت است. رخ می‌دهد. در بیماران دیابتی علاقه‌ای به تجویز مکمل ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانی ایجاد شده چراکه منافع بالقوه برای بیماران مبتلا به نوروپاتی محیطی داشته است (ماهان و همکاران ۲۰۱۲).

پلی‌فنول‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند، پلی‌فنول‌های گیاهی عملکرد مختلفی دارند و به‌عنوان یک عامل احیاء کننده می‌توانند عمل کنند. اسیدهای فنولی و مشتقات آن‌ها گروه بزرگی از پلی‌فنول‌ها را تشکیل می‌دهند که در ساختمان گیاهان ازجمله دیواره سلولی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. ازجمله اسیدهای فنولی می‌توان به هیدروکسی سینامیک‌اسیدها مثل کافئیک، فرولیک، کوماریک‌اسید و نیز هیدروکسی‌بنزوئیک اسیدها مثل الاجیک و گالیک‌اسید اشاره نمود (کشاورز و همکاران ۲۰۱۰).

ترکیبات فنول در سلول بر اساس قطبیت و حلالیتشان، توزیع می‌شود. مواد هیدروفیلی عمدتاً در واکوئل‌های سلولی یافت می‌شوند، درحالی‌که دیگر ترکیبات مانند بخش زیادی از لیگنین‌ها، فلاونوئیدها و پلی‌فنول‌های غیر محلول در دیواره سلولی از طریق پیوندهای هیدروفوب با پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها ذخیره می‌شوند (گالوان و همکاران ۲۰۱۲).

اسیدهای فنولی را می‌توان به اسیدفنولیک آزاد یا اسیدفنولیک باند شده تقسیم‌بندی کرد (رینجر و استیهارد ۲۰۰۰). ترکیبات فنولی آزاد در دستگاه گوارش می‌تواند در برابر بروز سرطان کولون و سایر

بیماری‌های مزمن عمل کنند (مین و همکاران ۲۰۱۲). اسیدهای فنولیک‌آزاد با حلال‌هایی مانند آب، متانول، اتانول و استون قابل‌استخراج هستند.

اسیدفنولیک باند شده ترکیباتی هستند که به شکل نامحلول وجود دارند و با پیوند کووالانسی به اجزای ساختاری دیواره‌سلولی مانند سلولز، همی‌سلولز (به‌عنوان مثال arabinoxylans)، لیگنین، پکتین و پروتئین‌های ساختاری متصل هستند (آکوستا استرادا و همکاران ۲۰۱۴).

کمپلکس پروتئین-ترکیبات فنولی باند شده می‌تواند با رسوبات به دور ریخته شود، همچنین هیدرولیز شدید نیز می‌تواند ساختارهایی را تولید کند که نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی واقعی نیستند. به‌طور خلاصه، اندازه‌گیری فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی کل همچنان یک چالش است به دلیل قطبیت متفاوت آنتی‌اکسیدان‌ها و این واقعیت است که اکثر آن‌ها به‌طور کووالانسی به یک ماتریس نامحلول متصل هستند (گوکمن و همکاران ۲۰۰۹). آن‌ها نمی‌توانند از طریق تکنیک‌های معمول استخراج شوند که منجر به پیش‌بینی کمتر محتوای کل فنولی از میزان واقعی می‌شود (تای و همکاران ۲۰۱۴). بنابراین جداسازی فراکسیون‌های فنولی آزاد و باند شده و تعیین محتوای فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها تا حدی کمک به پیش‌بینی دقیق‌تر محتوای فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌کند.

زوفبا با نام علمی *Hyssopus officinalis*، به خانواده نعناعیان (*Lamiaceae*) تعلق دارد، گیاهی خشبی، چندساله، به‌صورت درختچه با ساقه‌های چهارگوش کوتاه به ارتفاع ۵۰ تا ۷۰ سانتیمتر است. این گیاه بیشتر به شکل بوته‌ای، قسمت پایه‌ی ساقه‌ها چوبی، ریشه‌ها مستقیم با انشعابات فراوان است. علاوه بر این برگ‌های آن صاف، کوچک، باریک، نوک‌تیز، معطر و زود افت است که از نقاط مختلف ساقه بدون دم برگ به‌طور متقابل خارج می‌شوند (قاسمی و همکاران ۱۳۹۲).

دست آمده به وسیله تبخیرکننده های چرخشی تحت خلأ (IKA ساخت کشور آلمان) در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و ۲۰۰ دور بر دقیقه تغلیظ و در نهایت توسط خشک کن انجمادی در دمای ۵۰- درجه سانتی گراد، خشک و به پودر تبدیل گردید. پودرهای فنولی به دست آمده تا زمان استفاده در ظروف غیرقابل نفوذ به هوا و رطوبت در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری خواهد شد (نصیری فر و همکاران ۱۳۹۲؛ قربانی و همکاران ۱۳۹۶؛ روحانی و همکاران ۱۳۹۴).

اندازه گیری ترکیبات فنولیک عصاره

برای این منظور ابتدا یک میلی گرم از عصاره را در حلال خود تهیه و ۰/۵ میلی لیتر از هر نمونه را با ۲ میلی لیتر محلول سدیم کربنات ۷/۵٪ و ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو ۱۰ بار رقیق شده مخلوط شد و برای انجام واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در پایان جذب نوری نمونه ها توسط اسپکتروفتومتر (PG Instrument, Ltd) در ۷۶۰ nm خوانده و به صورت میلی اکی والان گالیک اسید در گرم عصاره خشک بیان شد (کاپانسی و همکاران ۲۰۰۰).

اندازه گیری محتوای فلاونوئیدی

ابتدا ۰/۵ میلی لیتر از عصاره متانولی تهیه شده با ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪ در اتانول (۱۰ گرم آلومینیوم کلراید در ۱۰۰ میلی لیتر و آب مقطر) ۰/۱ استات پتاسیم یک مولار (۲/۴۱ گرم در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر) ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد. برای تهیه شاهد به جای عصاره متانولی، تنها از متانول خالص استفاده گردید. سپس مخلوط ۰/۵ ساعت در تاریکی قرار گرفت و بلافاصله در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد. به منظور رسم منحنی استاندارد از کوئرتستین استفاده شد و نتایج را برحسب میلی گرم کوئرتستین در هر گرم عصاره بیان شد (مقصودلو و همکاران ۲۰۱۷).

این گیاه به عنوان طعم دهنده و بهبود خواص ارگانولپتیکی در صنایع غذایی و دارای عطری است که در صابون و لوازم آرایشی و عطر استفاده می شود. این گیاه غنی از روغن های فرار، فلاونوئیدها، تاننها، marrubiin می باشد. این گیاه دارای خاصیت ضد میکروبی و ملین و ضد اسپاسم است و فعالیت ضد ویروسی قوی علیه HIV دارد. ضد باکتری، ضد قارچ و دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است؛ و اثرات ضد سرطانی آن نیز گزارش شده است (فتحی آزاد و همکاران ۲۰۱۱).

هدف از این مطالعه تعیین محتوای فنولی کل و مقایسه خصوصیات آنتی اکسیدانی فراکسیون های آزاد و باند شده عصاره گیاه زوفا با روش های مختلف ارزیابی می باشد.

مواد و روش ها

تهیه و آماده سازی نمونه

در این پژوهش از برگ گیاه زوفا به عنوان مواد اولیه استفاده شد. گیاه زوفا از مناطق اطراف استان مازندران در فصل تابستان جمع آوری و پس از تمیز کردن در دمای اتاق و در سایه خشک و سپس آسیاب و در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد در فریزر نگهداری شد (مقصودلو و همکاران ۲۰۱۷).

استخراج به وسیله اولتراسوند پروپ

در این فرآیند استخراج، از پروپ فراصوت (KS-250F) با قطر ۱/۴ اینچ) و نسبت حلال به نمونه ۱ به ۱۰ استفاده شد. ابتدا پودر خشک شده به حلال اتانول_ آب با نسبت های (۵۰:۵۰) و (۸۰:۲۰) اضافه شد. به طور جداگانه تحت امواج فراصوت با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز و شدت های ۱۰۰ درصد و ۶۰ درصد برای زمان های مختلف (۲۰:۱۰) دقیقه قرار گرفت. در نهایت عصاره های استخراج شده با ۷۸۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ (centrifuge 5810 R eppendorf) و سپس قسمت شفاف بالای مخلوط جدا گردید و عصاره به

استخراج ترکیبات فنولی آزاد

۰/۵ گرم از نمونه را دو بار با ۸ میلی‌لیتر متانول آبی ۸۰٪ مخلوط کرده در حمام صوتی ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفت، سپس مواد شناور را مخلوط کرده و pH آن‌ها را با استفاده از ۶ M HCl در ۵/۵ - ۴/۵ تنظیم می‌کنیم سپس سانتریفیوژ در ۴۳۲۱g، به مدت ۲۵ دقیقه، مایع رویی فنول آزاد محسوب می‌شود (کوتاسکوا و همکاران ۲۰۱۶).

استخراج ترکیبات فنولی باند شده

برای استخراج فنول‌های باند شده، باقیمانده‌های حاصل‌شده در بالا، با استفاده از ۲۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر شده شسته و پس از حذف آب، نمونه‌ها دو بار با ۲۰ میلی‌لیتر ۴ M NaOH مخلوط شده و برای ۲ ساعت در حمام اولتراسونیک قرار گرفت. pH را در محدوده ۵/۵ - ۴/۵ با استفاده از ۶ M HCl تنظیم کرده و سپس سانتریفیوژ در ۴۳۲۱g به مدت ۲۵ دقیقه گردید، مایع رویی به‌عنوان عصاره فنولی باند شده مورد استفاده قرار گرفت (کوتاسکوا و همکاران ۲۰۱۶).

فعالیت مهار رادیکال DPPH

برای این منظور ۰/۳ میلی‌لیتر از عصاره با غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ ppm) را با ۲/۷ میلی‌لیتر از محلول رادیکال DPPH قرار داده شد و کاهش رادیکال DPPH نمونه‌ها از طریق پایش جذب در ۵۱۷nm با استفاده از اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. در این آزمون TBHQ (۱۰۰ ppm) به جهت اهمیت و کاربرد گسترده‌ای که در صنایع غذایی دارد به‌عنوان استاندارد برای مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی با عصاره‌ها استفاده شد و اثر مهارکنندگی به‌صورت درصد بیان شده و از معادله زیر محاسبه گردید: (گویمارائز و همکاران ۲۰۱۰)

$$\text{Scavenging Effect\%} = A_{\text{DPPH}} - A_s / A_{\text{DPPH}} \times 100$$

آزمون بی‌رنگ بتاکاروتن - لینولئیک اسید

برای انجام آزمایش ابتدا یک محلول پایه از بتا کاروتن - لینولئیک اسید (سیگما-آلد ریچ) به‌صورت زیر تهیه شد:

۵ میلی‌گرم بتاکاروتن در ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم حل گردید و ۶۰۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده به فلاسک ته‌گردی که حاوی ۴۰mg لینولئیک اسید و ۴۰g تویین ۲۰ است، اضافه شد. پس از خارج شدن گاز ازت، ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اشباع از اکسیژن به فلاسک اضافه می‌کنیم و فلاسک برای تشکیل امولسیون به‌شدت هم زده شد، ۳ میلی‌لیتر از امولسیون تهیه شده را، به لوله‌های آزمایش که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (۲۰۰-۱۵۰-۱۰۰-۵۰ ppm) و ۱۰۰ ppm TBHQ، اضافه کرده و بلافاصله در زمان صفر جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. سپس درب لوله‌های آزمایش بسته و به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$AA\% = (A_{S(60)} - A_{C(60)}) / (A_{C(0)} - A_{C(60)})$$

$$A_{S(60)} = \text{میزان جذب نمونه بعد از ۶۰ دقیقه.}$$

$$A_{C(60)} = \text{میزان جذب شاهد بعد از ۶۰ دقیقه.}$$

$$A_{C(0)} = \text{میزان جذب شاهد در زمان شروع.}$$

$$AA\% = \text{درصد بازدارندگی.}$$

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، از مقایسه جذب نوری نمونه‌ها با زمان صفر و از روی میزان پایداری رنگ زرد بتاکاروتن به درصد مورد سنجش قرار می‌گیرد (آمروویچ و همکاران ۲۰۰۴).

شاخص پایداری اکسایشی (OSI)

برای تعیین پایداری اکسایشی از دستگاه رنسیت (Metrohm, 743, Switzerland) استفاده می‌شود. برای

این منظور، نمونه با غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰) روغن تهیه شد. برای هر آزمون ۳ گرم از هر نمونه روغنی برداشته دما و سرعت جریان هوا در این دستگاه به ترتیب ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۵ لیتر بر ساعت تنظیم شد (فرهوش ۲۰۰۷).

آنالیز آماری

در این تحقیق کلیه آزمایشات در سه تکرار در طرح کاملاً تصادفی انجام خواهد گرفت و داده‌های به دست با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) یک‌طرفه و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفت آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ صورت گرفت و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel ۲۰۱۳ استفاده شد (بوور ۲۰۰۹).

نتایج و بحث

تأثیر اولتراسوند پروپ بر ترکیبات فلاونوئیدی و ترکیبات فنولی عصاره و فراکسیون‌های فنولی آزاد و باند شده

شکل ۱ میزان ترکیبات فنولی استخراج شده از برگ گیاه زوفا را با استفاده از روش اولتراسوند پروپ تحت شرایط زمانی (۱۰-۲۰) دقیقه و شدت (۶۰-۱۰۰) وات و حلال اتانول - آب با نسبت‌های (۵۰:۵۰) و (۲۰:۸۰) نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد، تأثیر تیمارهای مختلف استخراج بر مقدار ترکیبات فنولی نسبت به یکدیگر دارای اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$) که میزان ترکیبات فنولی بین محدوده $5/72 \pm 0/66$ تا $223/73 \pm 8/21$ میلی گرم گالیک اسید/گرم عصاره است. بیشترین میزان ترکیبات فنولی مربوط به تیمار ۸۰٪ اتانولی، ۱۰۰ وات و به مدت ۲۰ دقیقه (۸۰-۱۰۰-۲۰) و کمترین میزان مربوط به تیمار (۵۰-۶۰-۱۰) بود. ($P < 0.05$)

و در مورد ترکیبات فلاونوئیدی (شکل ۲) نیز تأثیر تیمارهای مختلف نسبت به یکدیگر دارای اختلاف معنی‌دار است. ($P < 0.05$) و محدوده ترکیبات فلاونوئیدی بین

شکل ۳ میزان ترکیبات فنول آزاد حاصل از عصاره برگ گیاه زوفا که با استفاده از روش اولتراسوند پروپ استخراج گردید را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد، تأثیر تیمارهای مختلف استخراج بر مقدار ترکیبات فنولی نسبت به یکدیگر دارای اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$) که میزان ترکیبات فنولی بین رنج $5/72 \pm 0/66$ تا $223/73 \pm 8/21$ میلی گرم گالیک اسید/گرم عصاره است. بیشترین میزان ترکیبات فنولی مربوط به تیمار ۸۰٪ اتانولی، ۱۰۰ وات و به مدت ۲۰ دقیقه (۸۰-۱۰۰-۲۰) و کمترین میزان مربوط به تیمار (۵۰-۶۰-۱۰) بود. ($P < 0.05$)

شکل ۴ میزان ترکیبات فنول‌های باندشده حاصل از عصاره برگ گیاه را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد، تأثیر تیمارهای مختلف استخراج بر مقدار ترکیبات فنولی نسبت به یکدیگر دارای اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$) که میزان ترکیبات فنولی بین محدوده $5/72 \pm 0/66$ تا $223/73 \pm 8/21$ میلی گرم گالیک اسید/گرم عصاره است. بیشترین میزان ترکیبات فنولی مربوط به تیمار ۸۰٪ اتانولی، ۱۰۰ وات و به مدت ۲۰ دقیقه (۸۰-۱۰۰-۲۰) و کمترین میزان مربوط به تیمار (۵۰-۶۰-۱۰) بود. ($P < 0.05$)

و همچنین نتایج نشان می‌دهد که محتوای فنولی آزاد از محتوای فنولی ترکیبات باندشده بیشتر است.

فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان به ترکیبات فنولی آن‌ها بستگی دارد (فلاح و همکاران ۲۰۱۲). ترکیبات فنولی در تمام بخش‌های گیاهان وجود دارد و با از دست دادن هیدروژن و به دام انداختن رادیکال آزاد دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند (خلیلی و ابراهیم‌زاده ۱۳۹۳). ترکیبات فنولی آزاد در دستگاه گوارش می‌تواند پس از جذب در همان محل و یا در محل‌های در برابر بروز

سرطان کولون و سایر بیماری‌های مزمن عمل کنند (مین و همکاران ۲۰۱۲). برخی مطالعات نشان داده‌اند که فنول‌های باند شده و غیرمحلول ممکن است در شرایط متغیر قلیایی و اسیدی معده و روده و تخمیر کلون آزاد شوند و ممکن است حتی در اپیتلیوم روده و پس از جذب، دارای فواید و مزایایی برای سلامتی هستند (آندریسن و همکاران ۲۰۰۱).

فلاونوئیدها نیز با بیش از ۳۰۰۰ ساختار از مهم‌ترین ترکیبات ثانویه گیاهان هستند که در گیاهان دارویی با مقادیر مختلف یافت می‌شوند (مورلو و همکاران ۲۰۰۵).

هیدرولیز با کمک اولتراسوند برای هیدرولیز کردن ترکیبات فنولی سریع‌تر از روش‌های سنتی توسعه داده شده است، زیرا سطح تماس بین فاز جامد و مایع با اختلال ذرات افزایش می‌یابد (هررا و لوکه ۲۰۰۴). به‌طور کلی، چندین سازوکار در اولتراسوند شناسایی شده است. یکی از این مکانیسم‌ها، شکست و تکه‌تکه شدن است که به برخورد بین ذرات و امواج اولتراسونیک مربوط می‌شود که موجب کاهش اندازه ذرات می‌شود و در نتیجه، انتقال جرم را تسهیل می‌کند. انفجار حباب، منجر به تغییر نفوذپذیری غشاهای سلولی و افزایش آن می‌شود. در نهایت، به دلیل پدیده نوسان مکانیزم تنش برشی باعث فروپاشی حباب کاویتاسیون به مایع می‌شود (چمت و همکاران ۲۰۱۷).

باین‌حال، مهم است که اشاره شود که افزایش تولید استخراج نمی‌تواند به طور انحصاری به اثرات ساینده یا آشفستگی ناشی از امواج التراسونیک باشد (مویولمیستر و همکاران ۲۰۱۶). بلکه به طور مشابه، تعامل حلال با سیستم استخراج باید مورد توجه قرار گیرد. خصوصیات فیزیکی حلال به طور کامل بر کاویتاسیون تأثیر می‌گذارد، زیرا حفره‌ها به راحتی وقتی که یک حلال با فشار بالا با ویسکوزیته کم و کشش سطح پایین استفاده می‌شود شکل می‌گیرند (کوربین و همکاران ۲۰۱۵). به‌طور کلی، استخراج هر مؤلفه بستگی به درجه

قطبیت و نسبت حلال و حل‌شونده دارد. این بدان معناست که ترکیب عناصر به قطبش حلال استفاده شده بستگی دارد (کالیتراکا و همکاران ۱۹۹۵). حلال‌ها مانند متانول یا اتانول در مقایسه با آب قطبیت قابل‌ملاحظه کمتری دارند و این باعث می‌شود که حلالیت و انتشار ترکیبات فنولی با کاهش ثابت دی‌الکتریک حلال افزایش یابد باین‌حال مطالعات قبلی نشان داده که با استفاده از حلال‌های آلی بسیار خالص می‌تواند منجر به دهیدراته شدن و فروپاشی سلول‌های گیاهی شود و همچنین دناتوراسیون پروتئین دیواره سلولی در نتیجه استخراج ترکیبات فنولی دشوار می‌شود (گارسینو کاستلا و همکاران ۲۰۱۵). به همین دلیل، مخلوط آبی الکلی، به‌ویژه اتانول، سیستم حلال مناسب برای استخراج به علت قطبیت مختلف از ترکیبات فنولی و قابل‌قبول برای مصرف انسان هستند (مونیز مارکوئز و همکاران ۲۰۱۳). به همین دلیل است که حلال استخراج باید بر اساس حلالیت ترکیباتی موردنظر انتخاب شود.

در این زمینه، سامین و ساهلی (۲۰۱۳) گزارش دادند که بهترین عملکرد استخراج ترکیبات فنولی با استفاده از مخلوط ۵۰-۵۰٪ اتانول-آب به دست آمد. این نویسندگان به یک اثر سینرژیک در میان حلال‌ها اشاره می‌کنند، زیرا آب به‌عنوان یک عامل تورم ماتریس گیاهی عمل می‌کند و سطح تماس را افزایش می‌دهد، درحالی‌که اتانول باعث پارگی پیوند بین حل‌شونده و ماتریس می‌شود.

مونیز مارکوئز و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که در ۷۰ درصد غلظت اتانول در حلال، به دلیل قطبیت ترکیبات موجود در نمونه‌ها، باعث افزایش بازده استخراج می‌شود. این نتایج همسو با نتایج حاصل از این تحقیق بود. دامنه نقش مهمی در تشدید استخراج بازی می‌کند، در نتیجه، منجر به آزادسازی بیشتر ترکیبات می‌شود (کاررا و همکاران ۲۰۱۲). تفاوت‌های آماری معنی‌داری را در مقایسه با نتایج استخراج آنتوسایانین و تانین با استفاده از دامنه امواج نشان داد که منجر به افزایش ۲۰

کردند که افزایش غلظت اتانول به بیش از ۷۰٪ منجر به افزایش استخراج ترکیبات فلاونوئیدی می‌گردد که این نتیجه همسو با نتایج ما است، تأثیری که غلظت اتانول بر روی استخراج داشت ممکن است به دلیل قطبیت اتانول و ترکیبات فلاونوئیدی و حل شدن آن‌ها مربوط باشد. استخراج ترکیبات فلاونوئیدی از میوه سنجد با نام علمی (*Elaeagnus angustifolia* L.) توسط اولتراسوند انجام گرفت و میزان ترکیبات فلاونوئیدی را ۳۲/۹۸ میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش شد (سررودیان و همکاران ۲۰۱۶).

لانز و هاوآ (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای که بر روی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی سیب‌زمینی قرمز (*Solanum tuberosum* L.) انجام دادند، بیان کردند با افزایش زمان استخراج، بازده افزایش می‌یابد که همسو با نتایج ما است اما با افزایش دامنه سونیکاسیون از ۳۰ به ۷۰٪ میزان بازده استخراج کاهش یافت؛ که برخلاف نتایج حاصل‌شده در این تحقیق است. مقصودلو و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای که بر روی انگور انجام دادند بیان کردند که دامنه سونیکاسیون (۲۰-۵۰ و ۱۰۰٪) بر استخراج ترکیبات فنولی مؤثر است چراکه با افزایش دامنه سونیکاسیون بازده استخراج ۱۵٪ افزایش می‌یابد؛ که هم‌راستا با نتایج حاصل این پژوهش است. موریز مارکوئز (۲۰۱۳) گزارش کردند افزایش غلظت اتانول از ۷۰-۰٪ منجر به افزایش بازده استخراج ترکیبات فنولی از برگ‌بو (*Laurus nobilis* L.) می‌شود که در این پژوهش نیز با افزایش بازده استخراج محتوای فنولی تام منجر به افزایش بازده در محتوای فنولی فراکسیون‌های آزاد و باند شده حاصل از عصاره نیز گردید و تیمار (۸۰-۱۰۰-۲۰) محتوای فنولی آزاد و باند شده بالاتری را نشان داد.

فنول‌های آزاد اجزای محلول و قابل‌استخراج در متانول می‌باشند و پس از پراکندگی در لایه‌های حلال باقی می‌مانند. فنول‌های باند شده توسط هیدرولیز قلیایی آزاد می‌شوند (چن و همکاران ۲۰۱۵). اولتراسوند نیز

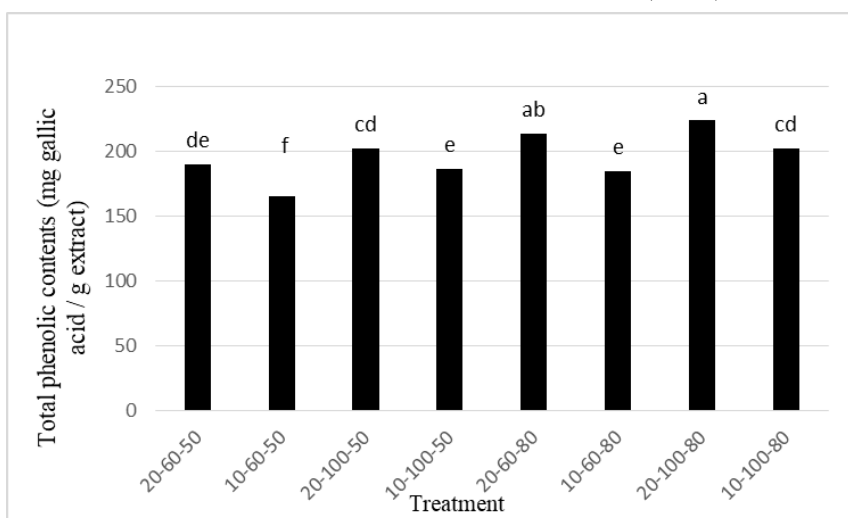
و ۵۰ درصد بازده استخراج می‌شود که نشان می‌دهد که دامنه اولتراسونیک بیشتر موجب افزایش تعداد حفره‌ها و در نتیجه بهبود فرآیند استخراج می‌گردد. نتایج این محققین نیز هم‌راستا با نتایج ما بود. در طی فرایند اولتراسوند، حل‌شونده در تماس با حلال هستند، بنابراین بازده استخراج تا حد زیادی تحت تأثیر زمان تعامل بین دو فاز است (حسین و همکاران ۲۰۱۲). به همین دلیل با افزایش زمان استخراج از ۱۰ به ۲۰ دقیقه منجر به افزایش بازده استخراج گردید؛ زیرا افزایش زمان استخراج اجازه می‌دهد که ماده حل‌شونده موردنظر در تماس با حلال برای مدت طولانی‌تری قرار گیرد (غفور و همکاران ۲۰۰۹). تومسیک و همکاران (۲۰۱۶) در مورد سیر وحشی (*Allium ursinum*) نیز به همین نتیجه رسیدند که همسو با نتایج حاصل از این تحقیق است همچنین بیان کردند با افزایش زمان استخراج (۴۰-۸۰ دقیقه) بازده استخراج ترکیبات فعال زیستی افزایش می‌یابد که در این تحقیق همین روند افزایشی مشاهده شد. زمان استخراج طولانی‌تر می‌تواند کارایی استخراج را افزایش دهد، اما همچنین ممکن است اکسیداسیون ترکیبات فنولی را افزایش دهد (پریادهارشین و بختاواتسلام ۲۰۱۶).

در همین راستا حسین و همکاران (۲۰۱۲) برای انتخاب بهینه‌ترین شرایط استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی با استفاده از اولتراسوند پروپ از گیاه مرزنگوش (*marjoram*) بیان کردند که بهترین نتیجه با افزایش زمان، دامنه سونیکاسیون حاصل گردید؛ که هم‌راستا با نتایج این تحقیق است.

خان و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه‌ای برای استخراج پلی‌فنول به‌ویژه فلاونون‌ها از پوست پرتقال (*Citrus sinensis* L.) و با استفاده از اولتراسوند پروپ و اتانول که اولتراسوند یک روش مناسب برای تولید عصاره‌های گیاهی با غلظت بالا آنتی‌اکسیدان است (هوآنگ و لیاو ۲۰۱۷) در مطالعه‌ای که بر روی استخراج فلاونوئید از گل راعی (*Hypericum formosanum*) انجام دادند بیان

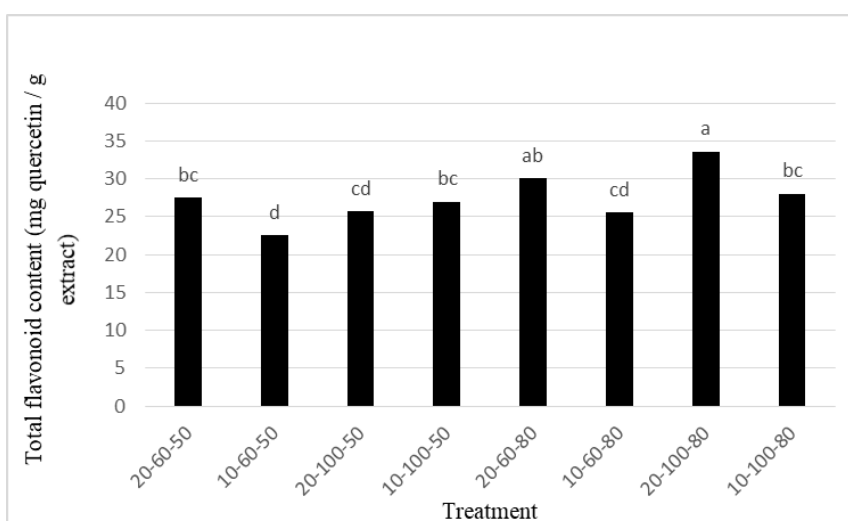
محتوای فنولی فراکسیون‌های آزاد بیشتر از باند شده در ارزن پنج‌انگشتی و گندم‌سیاه است؛ که همسو با نتایج حاصل از مطالعه ما بود، در همین راستا سوبا و مورالیکریشنا (۲۰۰۲) فعالیت مهارکنندگی بالاتری را در عصاره‌های فنولی آزاد حاصل از ارزن نسبت به فراکسیون‌های باند شده آن‌ها مشاهده کردند.

برای انتشار و آزادسازی فنول‌های باندشده و آزاد از عصاره‌های آزاد مواد گیاهی استفاده می‌شوند (پریسین و همکاران ۲۰۰۹). کوتاسکوا و همکاران (۲۰۱۶) نیز از همین روش جداسازی فنول‌آزاد و باندشده استفاده کردند و گزارش کردند که محتوای فنولی آزاد و باندشده تابعی از محتوای فنولی کل است. در ارتباط با بیشتر بودن محتوای فنولی آزاد از فراکسیون‌های باندشده زلینسکی و کوزلاوسکا (۲۰۰۰) گزارش کردند



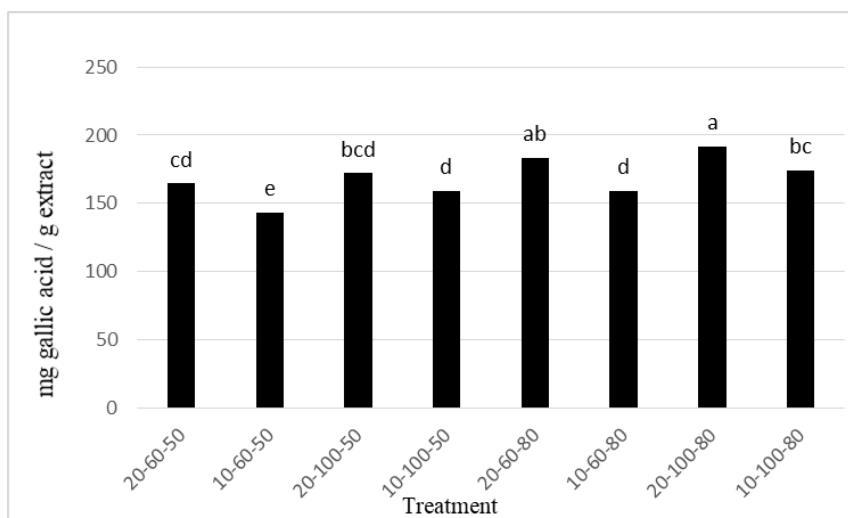
شکل ۱- میزان ترکیبات فنولی عصاره‌ی برگ زوفا حاصل از اولتراسوند پروب

Figure 1- The amount of phenolic compounds of probe ultrasound extract of *Hyssopus officinalis* leaf similar letters indicate no significant difference.



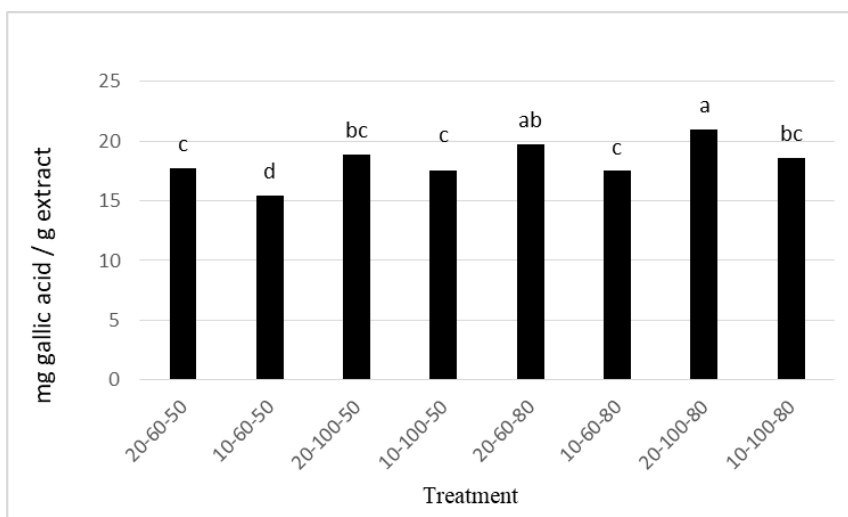
شکل ۲- میزان ترکیبات فلاونوئیدی عصاره برگ زوفا حاصل از اولتراسوند پروب

Figure 2- The amount of Flavonoid compounds of probe ultrasound extract of *Hyssopus officinalis* leaf similar letters indicate no significant difference.



شکل ۳- میزان فنول آزاد عصاره برگ زوفا حاصل از اولتراسوند پروب

Figure 3- The amount of free phenolic compounds of probe ultrasound extract of *Hyssopus officinalis* leaf similar letters indicate no significant difference.



شکل ۴- میزان فنول باند شده عصاره برگ زوفا حاصل از اولتراسوند پروب

Figure 4- The amount of bond phenolic compounds of probe ultrasound extract of *Hyssopus officinalis* leaf similar letters indicate no significant difference.

مهارکنندگی نیز افزایش می یابد و بالاترین درصد مهار مربوط به تیمار (۲۰-۱۰۰-۸۰) در غلظت ۲۰۰ ppm است که در این غلظت با بالاترین قدرت آنتی اکسیدانی نسبت به سایر تیمارها دارای اثر معنی دار است؛ که کمترین میزان مهار مربوط به تیمار (۱۰-۶۰-۵۰) در غلظت ۵۰ ppm، $31/31 \pm 3/2$ درصد است و بیشترین قدرت مهارکنندگی مربوط به تیمار (۲۰-۱۰۰-۸۰) با

میزان توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH

توانایی عصاره های حاصل از تیمارهای مختلف استخراج به کمک اولتراسوند پروب در مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت های مختلف در شکل ۵ نشان داده شده است. نتایج آنالیز واریانس اثر غلظت عصاره ها را بر روی مهار رادیکال آزاد نشان داد، در تمامی غلظت ها دارای اختلاف معنی دار است که با افزایش غلظت میزان

شکل ۸ مقدار IC_{50} برای عصاره‌های استخراج شده از تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد؛ که در این بین عصاره حاصل از تیمار (۸۰-۶۰-۲۰) با غلظت $98/3 \pm 48/97$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بهترین تیمار برای مهار رادیکال آزاد DPPH است و پس از آن عصاره تیمار (۸۰-۱۰۰-۲۰) با تفاوت معنی‌دار در مرتبه دوم و کمترین قدرت مهارکنندگی در غلظت ppm $124/4 \pm 1/49$ مربوط به تیمار (۱۰-۶۰-۵۰) می‌باشد. ($P < 0/05$)

شکل ۹ مقدار IC_{50} برای فنول آزاد عصاره‌های استخراج شده از تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد؛ که نشان‌دهنده‌ی غلظتی است که عصاره قادر به مهار ۵۰٪ رادیکال آزاد DPPH می‌باشد؛ که در این بین عصاره حاصل از تیمار (۸۰-۱۰۰-۲۰) با غلظت $1/96792 \pm 46/2289$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بهترین تیمار برای مهار رادیکال آزاد DPPH است و کمترین قدرت مهارکنندگی در غلظت ppm $9/78109 \pm 10/729$ مربوط به تیمار (۱۰-۶۰-۵۰) می‌باشد. ($P < 0/05$)

شکل ۱۰ مقدار IC_{50} برای فنول باندشده عصاره‌های استخراج شده از تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد که در این بین عصاره حاصل از تیمار (۸۰-۱۰۰-۲۰) با غلظت $14/6846 \pm 9/2284$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بهترین تیمار برای مهار رادیکال آزاد DPPH است و کمترین قدرت مهارکنندگی در غلظت ppm $12/07604$ مربوط به تیمار (۱۰-۶۰-۵۰) می‌باشد. ($P < 0/05$)

ترکیبات فنولیک متعلق به گروه بسیار مهم آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی هستند. ترکیبات فنولی یک تا سه گروه هیدروکسیل را در حلقه آروماتیک در موقعیت‌های مختلف جایگزین می‌کنند. یک گروه اسیدکربوکسیلیک همچنین ممکن است به‌عنوان جایگزین اصلی موجود باشد یا به حلقه آروماتیک دیگری متصل شود. اثر آنتی‌اکسیدانی به طور عمده بستگی به تعداد و موقعیت گروه هیدروکسیل و هویت اسیدهای اصلی

مهار $3/14 \pm 92/6$ درصد در غلظت ۲۰۰ ppm است. ($P < 0/05$)

توانایی فنول‌های آزاد عصاره‌های حاصل از تیمارهای مختلف استخراج به کمک اولتراسوند پروپ در مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت‌های مختلف در شکل ۶ نشان داده شده است. نتایج آنالیز واریانس اثر غلظت عصاره‌ها را بر روی مهار رادیکال آزاد نشان داد، در تمامی غلظت‌ها دارای اختلاف معنی‌دار است ($P < 0/05$) که با افزایش غلظت میزان مهارکنندگی نیز افزایش می‌یابد و بالاترین درصد مهار مربوط به تیمار (۸۰-۶۰-۲۰) در غلظت ۲۰۰ ppm است که در این غلظت با بالاترین قدرت آنتی‌اکسیدانی با مهارکنندگی $3/74913 \pm 92/9549$ درصد است و در غلظت ۱۵۰ ppm بالاترین درصد مهار مربوط به تیمار (۸۰-۶۰-۲۰) و در ۱۰۰ ppm و ۵۰ ppm مربوط به تیمار (۸۰-۱۰۰-۲۰) است و کمترین میزان مهار مربوط به تیمار (۱۰-۶۰-۵۰) در غلظت ۵۰ ppm $38/141 \pm 2/77338$ درصد است. ($P < 0/05$)

توانایی فنول‌های باندشده عصاره‌های حاصل از تیمارهای مختلف استخراج به کمک اولتراسوند پروپ در مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت‌های مختلف در شکل ۷ نشان داده شده است. نتایج آنالیز واریانس اثر غلظت فنول‌های باندشده عصاره‌ها را بر روی مهار رادیکال آزاد نشان داد، در تمامی غلظت‌ها به‌جز ppm ۱۵۰ دارای اختلاف معنی‌دار است ($P < 0/05$) که با افزایش غلظت میزان مهارکنندگی نیز افزایش می‌یابد و بالاترین درصد مهار مربوط به تیمار (۸۰-۶۰-۲۰) در غلظت ۲۰۰ ppm است که در این غلظت با بالاترین قدرت آنتی‌اکسیدانی با مهارکنندگی $3/03679 \pm 75/2934$ درصد است و در غلظت ۱۵۰ ppm بالاترین درصد مهار مربوط به تیمار (۸۰-۶۰-۲۰) و در ۱۰۰ ppm و ۵۰ ppm مربوط به تیمار (۸۰-۱۰۰-۲۰) است و کمترین میزان مهار مربوط به تیمار (۱۰-۶۰-۵۰) در غلظت ۵۰ ppm $30/8942 \pm 2/24644$ درصد است. ($P < 0/05$)

دارد، اما همچنین در بسیاری از عوامل دیگر بر آن‌ها مؤثر هستند. ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نه تنها به محتوا و ترکیب فنول‌ها، بلکه همچنین با محتوای آنتی اکسیدان‌های دیگر مواد گیاهی بستگی دارد، به عنوان مثال اسید اسکوربیک. علاوه بر اینکه می‌تواند اثر سینرژیتی یا آنتاگونیسمی بین ترکیبات فعال داشته باشد (یانیشلیوا و همکاران ۲۰۰۶). علاوه بر این ترکیبات دیگر مانند کربوهیدرات‌های ساده و یا اسید آمینه ممکن است در عصاره‌های خالص وجود داشته باشد و می‌تواند با تعیین نتایج TPC با آزمون فولین-سیوکالتیو مواجه شود و منجر به اختلاف نتایج حاصل از کار شود (زیلنسکی و کوزلوسکا ۲۰۰۰). بنابراین برآورد فعالیت آنتی اکسیدانی در مواد واقعی بسیار دشوار است و اثر آنتی اکسیدانی کل باید به صورت آزمایشگاهی تعیین شود. (یانیشلیوا و همکاران ۲۰۰۶) با توجه به اینکه بالاترین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH در فنول تام مربوط به تیمار (۸۰-۱۰۰) اما در فراکسیون‌های آزاد و باند شده مربوط به تیمار (۸۰-۶۰-۱۰) بود. این نشان دهنده این است که برخی ترکیبات فنولی فعالیت آنتی اکسیدانی ندارند یا اینکه روش استخراج فنول‌های باند شده و آزاد به طور کامل منجر به آزادسازی آن‌ها نمی‌شود. همچنین فرآیند استخراج فنول‌های آزاد و باند شده نیز می‌تواند با تغییر ترکیبات آنتی اکسیدانی و ایجاد محصولات اکسیداسیون منجر به کاهش حلالیت گردد (اینگلت و همکاران ۲۰۱۱). بر اساس نتایج که در مطالعه‌ای که بر روی ارزیابی انجام شد می‌توان حدس زد که علاوه بر محتوای ترکیب فنول عوامل دیگر نیز ممکن است در فعالیت آنتی اکسیدانی فنول‌های ارزیابی در این سیستم نقش داشته باشد چراکه همیشه بالاتر بودن مقادیر ترکیبات فنولی به منزله بالاتر بودن قدرت آنتی اکسیدانی نیست بلکه به نوع ترکیبات فنولی تشکیل دهنده و آزاد و باند شده بودن آن بستگی دارد (چاندرا سکارا و شهیدی ۲۰۱۰). فعالیت آنتی اکسیدانی و پایداری آن‌ها بستگی به تعداد و موقعیت

گروه‌های هیدروکسیل آزاد متصل به ساختار و نوع آسیلاسیون بستگی دارد (پاتراس و همکاران ۲۰۱۰). از آنجا که DPPH تنها در حلال‌های آلی حل می‌شوند و در آب حل نمی‌شوند، تست DPPH معمولاً در یک سیستم واکنش متانول یا اتانول انجام می‌شود که در آن آنتی اکسیدان‌های لیپوفیلی می‌توانند به آسانی با رادیکال DPPH واکنش نشان دهند (لوکاتلی و همکاران ۲۰۰۹).

در مطالعه‌ای گزارش شد که ترکیبات فنولی ذرت شامل برخی از آنتی اکسیدان‌ها چربی دوست مانند لوتئین و زیگزانتین که ممکن است تا حدودی توسط یک محلول آبی استون استخراج شوند محتوای کاروتنوئید در این روش مشخص نیست و ممکن است تداخل در فعالیت آنتی اکسیدانی در بخش فنولیک انواع مختلف ذرت شیرین نشان دهد. تداخل این آنتی اکسیدان‌ها غیر فنولی ممکن است حداقل تا حدی توجیه تناقض در فعالیت آنتی اکسیدانی است (پری و همکاران ۲۰۰۹).

سامشنسکی و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند فراکسیون فنول آزاد، فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری را نشان داد که با محتوای فنولیک بالاتر در عصاره فنول‌های آزاد مطابقت داشت. در مطالعه‌ای بیان شد که ترکیبات فنولیک آزاد می‌تواند به عنوان یکی از مهم‌ترین ظرفیت‌های آنتی اکسیدانی در مقایسه با فنول‌های باند شده درتف (*Eragrostis tef*) باشد (کوتاسکوا و همکاران ۲۰۱۶). کایسون و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای که بر روی ۱۲ نوع گل خوراکی انجام دادند وجود ترکیبات فعال در برگ و گل گزارش کردند؛ و بیان کردند فعالیت بازدارندگی عصاره بستگی به محتوای فنولی و فلاونوئیدی دارد. فنول‌های باند شده تمام گل‌های خوراکی ظرفیت مهار رادیکال DPPH کمتری را از هم‌تایان آزاد خود به نمایش گذاشتند.

مین و همکاران (۲۰۱۲) فعالیت آنتی اکسیدانی که با استفاده از روش مهار رادیکال DPPH تعیین کردند و

است. آشوکومار و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند که رادیکال‌های هیدروکسیل تولیدشده توسط کاویتاسیون صوتی و مواد شیمیایی مواد غذایی مانند ترکیبات فنولی می‌توانند از نظر سونوشیمیایی هیدروکسیله گردند، بنابراین روند افزایش محتوای فنول‌ها در بعضی دامنه‌ها و زمان‌ها احتمالاً به دلیل اضافه شدن رادیکال‌های هیدروکسیل به حلقه آروماتیک ترکیبات فنولی باشد (بهات و همکاران ۲۰۱۱).

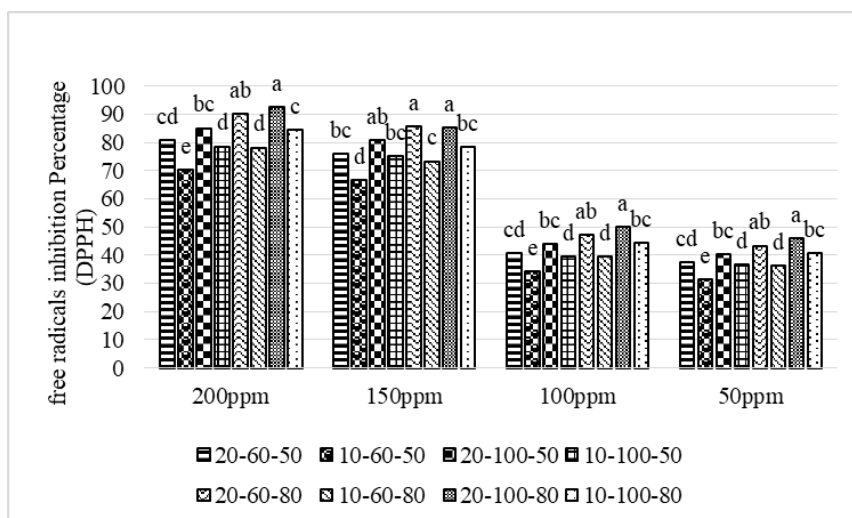
لیو و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که حلال مورد استفاده در استخراج همچنین در فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره، بسته به محتوای فنولی، مهم است. محمدی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ کورگز (*Tamarix aphylla*) در عصاره ۷۰٪ اتانولی بیشتر از عصاره آبی است. لی و همکاران (۲۰۱۳) نیز گزارش کردند در چای سبز محتوای فنولی با افزایش غلظت افزایش یافت و بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت ۷۰٪ اتانولی است؛ که می‌توان گفت نتایج آن‌ها همسو با نتایج این تحقیق است.

توجه به ارتباط و همبستگی بین محتوای فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در این تحقیق به‌خوبی مشخص کرد که کاهش در خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها معمولاً با کاهش محتوای فنولی عصاره همراه است و ارتباط مستقیمی بین محتوای فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره زوفا برقرار است که نشان‌دهنده‌ی این است که شرایط و عواملی که در میزان تغییرات مهار رادیکال آزاد نقش دارد، بر میزان ترکیبات و تغییرات فنول کل نیز اثرگذار بوده‌اند (آمروویچ و همکاران ۲۰۰۴). با این حال مقایسه نتایج حاصل از فعالیت آنتی‌اکسیدان در بسیاری از مقالات، دشوار است، زیرا داده‌ها به طور معنی‌داری تحت تأثیر روش استخراج و روش تحلیلی مورد استفاده قرار می‌گیرند (درمن و همکاران ۲۰۰۳).

گزارش کردند در فراکسیون‌های فنولی آزاد بیشتر از فراکسیون‌های باندشده است که با نتایج ما سازگار بود بالاتر بودن درصد DPPH در یک غلظت خاص ربطی به IC_{50} حاصل از غلظت‌های مختلف ندارد؛ که این نتیجه هم‌راستا با نتیجه حاصل از این مطالعه است.

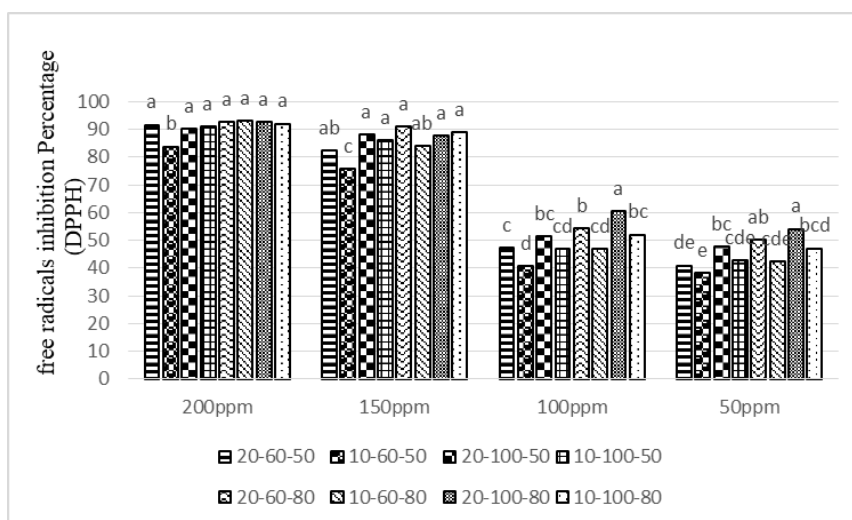
علت بالاتر بودن قدرت آنتی‌اکسیدانی فنول آزاد نسبت به فنول باند شده و فنول تام و کمتر بودن IC_{50} فنول آزاد نسبت به فنول تام و فنول باند شده که در مطالعه فوق به چشم می‌خورد به کوتاه بودن زنجیره آلیفاتیک بین حلقه‌های فنول‌های آزاد می‌باشد که این امکان را می‌دهد که در مهار رادیکال‌های آزاد مؤثرتر عمل نماید (گوکمن و همکاران ۲۰۰۹).

مطالعه‌ای که بر روی گیاه سوسنبر (*Thymus serpyllum*) صورت گرفت نشان داد با افزایش زمان استخراج ظرفیت آنتی‌اکسیدان در آزمون DPPH کاهش و IC_{50} آن افزایش یافت (جوانوویک و همکاران ۲۰۱۶)؛ که با نتایج پژوهش ما هم‌راستا نبود چراکه فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها با زمان استخراج طولانی کاهش یافت و این می‌تواند به دلیل حساسیت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی به گرما آزادشده توسط پروب اولتراسوند و در معرض هوا قرار گرفتن باشد، همچنین اولتراسوند منجر به تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود که می‌توانند آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی را تخریب کنند و باعث کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شوند (پوترات ۱۹۹۷). به طور مشابه، در مورد عصاره اتانولی چای زرد، مدت‌زمان استخراج طولانی باعث کاهش اندک ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شد (هوریزیک و همکاران ۲۰۱۲). که برخلاف نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی ما بود. علی‌قورچی و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای که بر روی تأثیر اولتراسوند بر روی خواص فیزیکوشیمیایی آب انار انجام دادند، گزارش کردند با افزایش زمان (۰-۹ دقیقه) و قدرت اولتراسوند (۵۰-۱۰۰٪)، درصد مهار رادیکال DPPH افزایش می‌یابد که نتایج آن‌ها همسو با نتایج این تحقیق



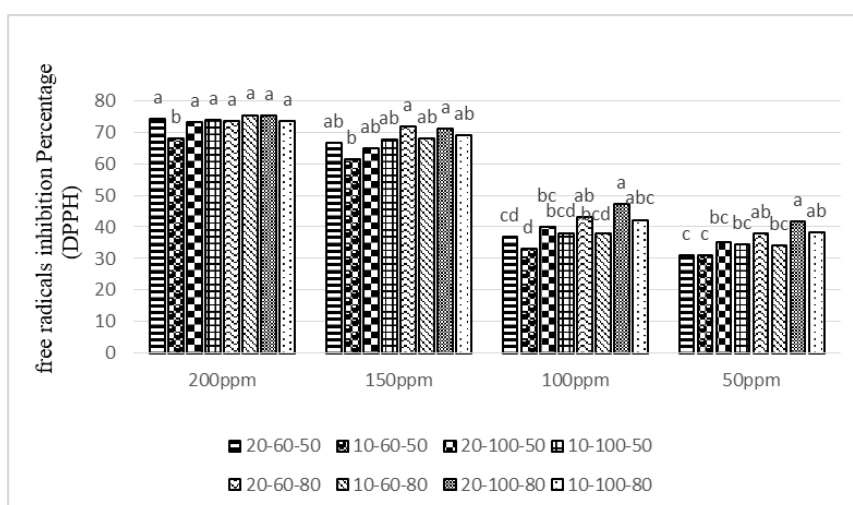
شکل ۵- درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره‌های برگ زوفا در غلظت‌های

Figure 5- The percentage of inhibition of DPPH free radicals in *Hyssopus officinalis* leaf extracts at different concentrations in probe ultrasound method
similar letters indicate no significant difference



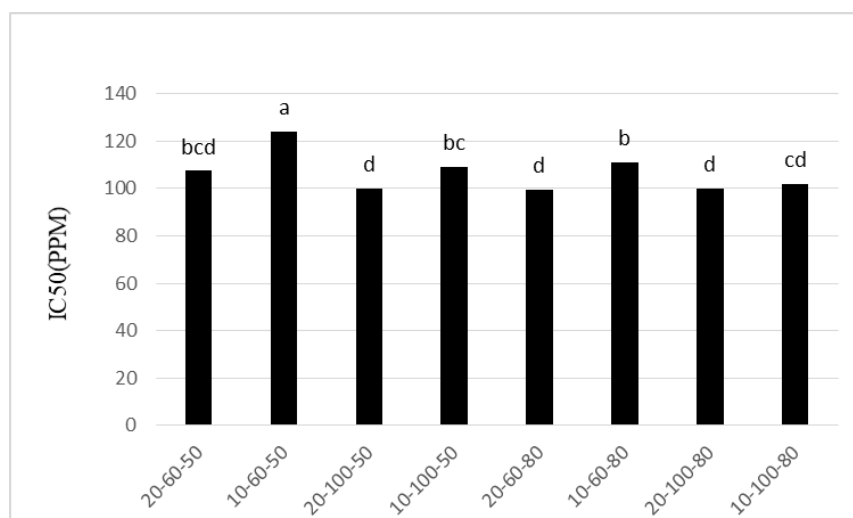
شکل ۶- درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH فنول آزاد عصاره‌های برگ زوفا در غلظت‌های مختلف در روش اولتراسوند پروپ

Figure 6- The Percentage of inhibition of DPPH free radicals in free phenol of *Hyssopus officinalis* leaf extracts at different concentrations in probe ultrasound method
similar letters indicate no significant difference.



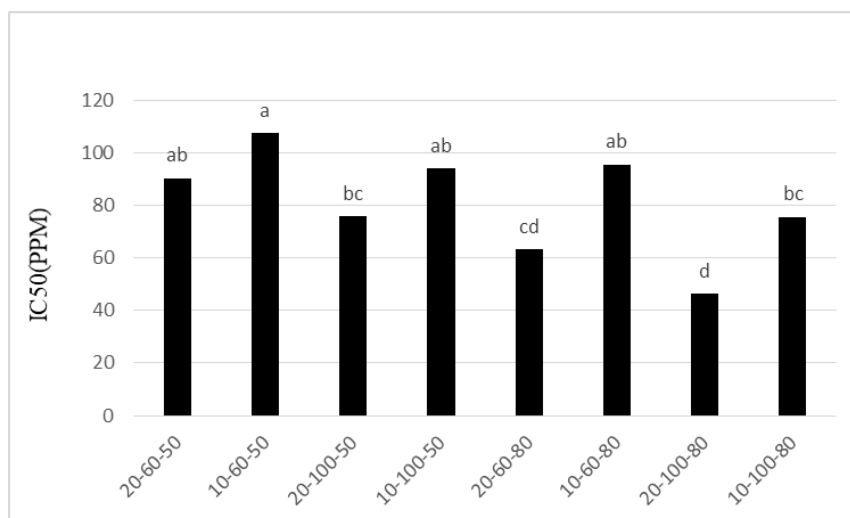
شکل ۷- درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH فنول باند شده عصاره‌های برگ زوفا در غلظت‌های مختلف در روش اولتراسوند پروب

Figure 7- The Percentage of inhibition of DPPH free radicals in bond phenol of *Hyssopus officinalis* leaf extracts at different concentrations in probe ultrasound method
similar letters indicate no significant difference.



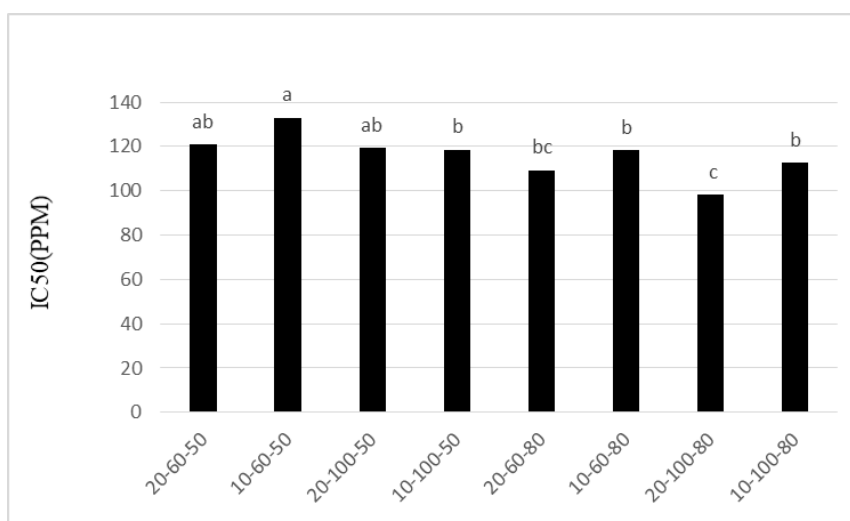
شکل ۸- IC₅₀ عصاره‌های تیمارهای مختلف برگ زوفا در آزمون مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

Figure 8- IC₅₀ Extracts of different treatments of *Hyssopus officinalis* leaf in the DPPH free radical inhibitory test
similar letters indicate no significant difference.



شکل ۹- IC₅₀ فنول‌های آزاد عصاره‌های تیمارهای مختلف زوفا در روش اولتراسوند پروب در آزمون مهارکنندگی رادیکال DPPH آزاد

extracts of different treatments of *Hyssopus officinalis* leaf in the DPPH free radical inhibitory test
similar letters indicate no significant difference.



شکل ۱۰- IC₅₀ فنول‌های باندشده عصاره‌های تیمارهای مختلف زوفا در اولتراسوند پروب در آزمون مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

Figure 10- IC₅₀ Bond phenolics extracts of different treatments of *Hyssopus officinalis* leaf in the DPPH free radical inhibitory test

similar letters indicate no significant difference.

نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تأثیر غلظت در مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید و فعالیت آنتی اکسیدانی آن‌ها معنی دار است ($P < 0.05$) با افزایش غلظت، میزان مهار اکسیداسیون عصاره‌ها نیز افزایش یافت، کمترین درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید

بررسی قدرت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها در سیستم مدل بتاکاروتن - لینولئیک اسید

شکل ۱۱ توانایی عصاره‌های حاصل از تیمارهای مختلف در مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید در سیستم مدل بتاکاروتن-لینولئیک اسید در غلظت‌های مختلف را

بر اساس نتایج فوق مشخص شد که فنول آزاد توانایی بالاتری در مهار اکسیداسیون اسید لینولئیک نسبت به فنول‌باندشده و فنول کل نشان می‌دهد. از این روش می‌توان برای اندازه‌گیری توانایی آنتی‌اکسیدان در مهار پر اکسیداسیون لیپید استفاده کرد. در این روش از سیستم β -کاروتن و اسیدلینولئیک مدلی ساخته شده که در صورت عدم وجود آنتی‌اکسیدان، تغییر رنگ می‌یابد. رادیکال آزاد اسیدلینولئیک به مولکول‌های β -کاروتن حمله کرده که باعث از دست دادن دو پیوند و بنابراین رنگ نارنجی مشخصی می‌شود (جانتاچت و همکاران ۲۰۰۵).

قدرت بالاتر فنول‌های آزاد در مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید را می‌توان به طول زنجیره آلیفاتیک و وجود ساختار فضایی سیس در اطراف پیوند دوگانه نسبت به ساختار فضایی ترانس و وجود گروه عاملی فعال هیدروکسی دانست. (چاندراسکارا و شهیدی ۲۰۱۰). همچنین حضور آنتی‌اکسیدان‌های مختلف می‌تواند میزان سفید شدن بتاکاروتن را با خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد لینولئات و دیگر رادیکال‌های آزاد تشکیل‌شده در سیستم مانع شود (سیرامون و اوتانی، ۲۰۰۷).

چاندراسکارا و شهیدی (۲۰۱۰) بیان کردند تفاوت در بلانچ کردن بتاکاروتن، بین عصاره فنولیک آزاد و باندشده وجود دارد. در تحقیقی که بر روی ارزن‌انگشتی صورت گرفت، گزارش کردند فراکسیون‌های فنولیک آزاد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری در مهار اکسیداسیون لینولئیک‌اسید نسبت به فنول‌های باندشده دارند. این امر می‌تواند به مقدار کل ترکیبات فنولیک و همچنین فلاونوئیدها در ترکیبات فنولی ارزن‌انگشتی نسبت داده شود.

عصاره متانولی پانزده گونه سرخس مورد آزمایش قرار گرفت. مشاهده شد که درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک‌اسید با افزایش غلظت عصاره مورد استفاده افزایش می‌یابد و قابلیت آنتی‌اکسیدانی به ترکیبات فنولی

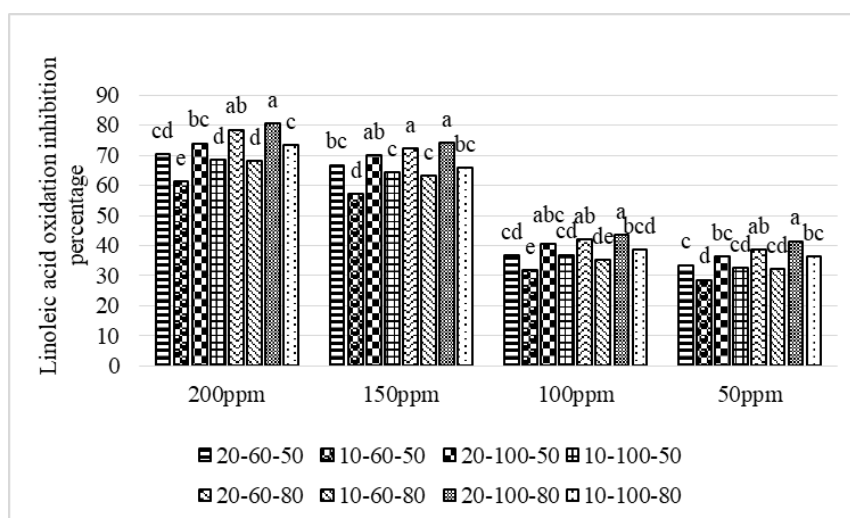
در غلظت ppm ۵۰ مربوط به تیمار (۵۰-۶۰-۱۰۰) و بیشترین درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید در غلظت ppm ۲۰۰ با مهار $2/73 \pm 80/56$ درصد مربوط به تیمار (۸۰-۱۰۰-۲۰۰) است ($P < 0/05$).

شکل ۱۲ توانایی فنول‌آزاد عصاره‌های حاصل از تیمارهای مختلف در مهار اکسیداسیون لینولئیک‌اسید در سیستم مدل بتاکاروتن-لینولئیک اسید در غلظت‌های مختلف را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تأثیر غلظت در مهار اکسیداسیون لینولئیک‌اسید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها معنی‌دار است ($P < 0/05$) با افزایش غلظت، میزان مهار اکسیداسیون عصاره‌ها نیز افزایش یافت، کمترین درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک‌اسید در غلظت ppm ۵۰ مربوط به تیمار (۵۰-۶۰-۱۰۰) با مهارکنندگی $17/52977 \pm 23/2652$ و بیشترین درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک‌اسید در غلظت ppm ۲۰۰ با مهار $4/59669 \pm 94/9488$ درصد مربوط به تیمار (۸۰-۱۰۰-۲۰۰) است ($P < 0/05$).

شکل ۱۳ توانایی فنول باند شده عصاره‌های حاصل از تیمارهای مختلف در مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید در سیستم مدل بتاکاروتن-لینولئیک اسید در غلظت‌های مختلف را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تأثیر غلظت در مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید و فعالیت آنتی اکسیدانی آن‌ها معنی دار است ($P < 0/05$). با افزایش غلظت، میزان مهار اکسیداسیون فنول باند شده عصاره‌ها نیز افزایش یافت، کمترین درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک‌اسید در غلظت ppm ۵۰ مربوط به تیمار (۵۰-۶۰-۱۰۰) با مهارکنندگی $3/02138 \pm 25/6421$ و بیشترین درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک‌اسید در تمامی غلظت‌ها به جز ppm ۱۵۰، مربوط به تیمار (۸۰-۲۰-۱۰۰) است که در غلظت ppm ۲۰۰ بالاترین مهار با $3/72322 \pm 76/9085$ درصد است ($P < 0/05$) و در غلظت ppm ۱۵۰ بالاترین درصد مهار را تیمار (۸۰-۶۰-۲۰) از خود نشان داد.

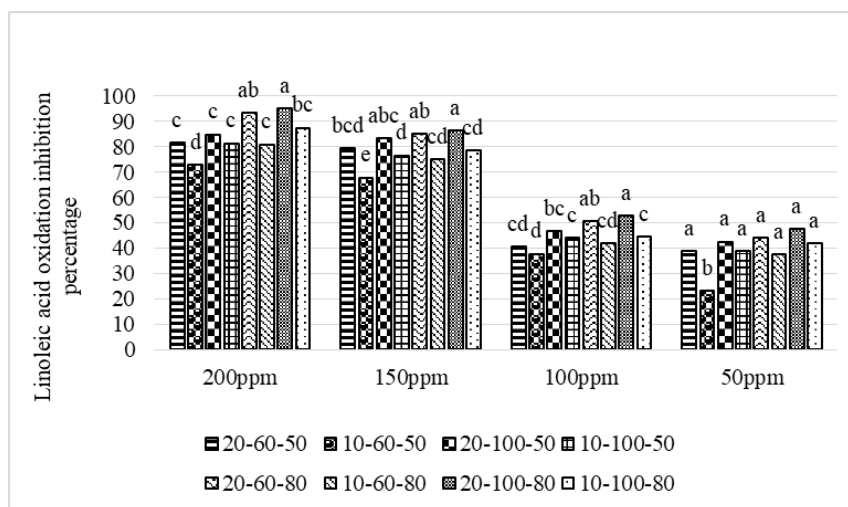
آب انار انجام دادند، بیان کردند با افزایش زمان (۹-۰ دقیقه) و قدرت اولتراسوند (۵۰-۱۰۰٪)، درصد مهارکنندگی اکسیداسیون لینولئیک اسید افزایش می‌یابد که نتایج آن‌ها همسو با نتایج این پژوهش است. در سیستم لینولئیک اسید به‌طور کلی همه عصاره‌ها مانع اکسیداسیون لینولئیک اسید می‌شوند که در رابطه با فرآوری مواد غذایی و نگهداری آن مسئله مهمی می‌باشد. آنتی اکسیدان‌ها اکسیداسیون ترکیبات لیپیدی غشاهای سلولی را به حداقل رسانده و یا مانع تشکیل ترکیبات فرار آلی و هیدروپراکسیدهای کونژوگه‌دی‌ان ناشی از اکسیداسیون لینولئیک اسید که کارسینوژن هستند، می‌شوند (تپه و همکاران ۲۰۰۷).

سرخس‌ها نسبت داده شد. (لیا و لیم ۲۰۱۱) در مطالعه‌ای که بر روی پنج عصاره مختلف از برنجاسف وحشی (*Artemisia biennis*) صورت گرفت، عصاره در معرض آب و درصدهای مختلف قرار گرفت که در این بین، فراکسیون حاوی متانول ۸۰٪ بهترین عملکرد مهارکننده را داشت (حاتمی و همکاران ۲۰۱۴)، نشان‌دهنده این است که با افزایش غلظت حلال درصد مهارکنندگی افزایش یافت که هم‌راستا با نتایج حاصل‌شده در این تحقیق است زیرا با افزایش غلظت اتانول مهارکنندگی اکسیداسیون لینولئیک اسید افزایش یافت. علی‌قورچی و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای که بر روی تأثیر اولتراسوند بر روی خواص فیزیکی‌شیمیایی



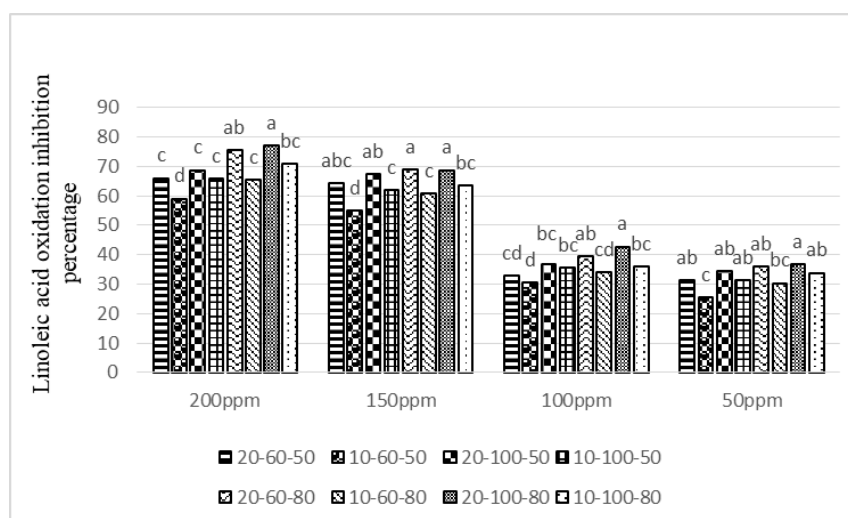
شکل ۱۱- درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید تیمارهای مختلف عصاره برگ زوفا در غلظت‌های مختلف در سیستم مدل بتاکاروتن-لینولئیک اسید

Figure 11- The inhibitory effect of linoleic acid oxidation on various treatments of *Hyssopus officinalis* extract at different concentrations in the system of beta-carotene-linoleic acid model
similar letters indicate no significant difference.



شکل ۱۲- درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید تیمارهای مختلف فنول آزاد عصاره برگ زوفا در غلظت‌های مختلف در سیستم مدل بتاکاروتن-لینولئیک اسید در روش اولتراسوند پروب

Figure 12- The inhibitory effect of linoleic acid oxidation on various treatments free phenolic of *Hyssopus officinalis* extract at different concentrations in the system of beta-carotene-linoleic acid model similar letters indicate no significant difference.



شکل ۱۳- درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید تیمارهای مختلف فنول باندشده عصاره برگ زوفا در غلظت‌های مختلف در سیستم مدل بتاکاروتن-لینولئیک اسید در روش اولتراسوند پروب

Figure 13- The inhibitory effect of linoleic acid oxidation on various treatments free phenolic of *Hyssopus officinalis* extract at different concentrations in the system of beta-carotene-linoleic acid model similar letters indicate no significant difference

مشاهده شد که تأثیر تیمارهای مختلف استخراج بر پایداری اکسایشی عصاره‌ی برگ زوفا در تمامی غلظت‌ها و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها در سطح ۵ درصد معنی‌دار است. کمترین پایداری اکسایشی

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با آزمون شاخص پایداری اکسایشی (OSI)

شکل ۱۴ شاخص پایداری اکسایشی نمونه‌های مختلف کانولا را نشان می‌دهد. در بررسی آنالیز واریانس

روش رنسیمت اغلب برای ارزیابی یا پیش‌بینی پایداری اکسایشی در شرایط حرارتی بوده و به‌عنوان زمان مقاومت استفاده می‌شود با توجه به اینکه رنسیمت ابزار مهمی برای مقایسه روغن‌های گیاهی مختلف است لذا از آن در تحقیقات استفاده می‌شود (کاسال و همکاران ۲۰۱۰).

در ارتباط با توانایی بهتر فنول‌های آزاد در کاهش سرعت اکسیداسیون، لیانگ و همکاران (۲۰۰۶) گزارش دادند که توانایی آنتی‌اکسیدانی فنول‌ها به تعداد گروه‌های OH- بستگی دارد ۱، ۲ یا ۴ موقعیت در حلقه آروماتیک و همچنین ظرفیت و ویژگی‌های الکترونیکی جایگزین حلقه موجود. آن‌ها توضیح دادند که گروه‌های فعال -OH پروتون‌هایی را ایجاد می‌کنند که از ایجاد رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند یا باعث تداخل با انتشار رادیکال آزاد می‌شود و از این‌رو سرعت اکسیداسیون را کاهش می‌دهد.

در همین راستا در مطالعه‌ای که بر روی توانایی آنتی‌اکسیدانی پروپیل گالات (PRG) بوتیل‌هیدروکسی آنیزول (BHA) و پیروگالول (PYR) انجام گرفت، BHA فعالیت آنتی‌اکسیدان پایین‌تری نسبت به PYR و PRG نشان داد که می‌توان توضیح داد که BHA تنها یک گروه OH دارد که به طور مستقیم به حلقه آروماتیک متصل شده درحالی‌که PYR و PRG دارای سه گروه -OH هستند. حضور بیشتر OH- که به طور مستقیم به حلقه معطر در PYG و PRG متصل است موقعیت‌های بیشتری برای واکنش با رادیکال‌آزاد برای ایجاد مولکول‌های پایدار و از این‌رو جلوگیری از اکسیداسیون فراهم می‌کند (سنزیکین و همکاران ۲۰۰۵؛ دگازمن و همکاران ۲۰۰۹).

اوساوا و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند افزایش غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها موجب بهبود پایداری اکسیداسیون شده است؛ که همسو با نتایج حاصل ما بود. ریچهمیر و همکاران (۱۹۹۶) در مطالعه‌ای که بر روی عصاره‌های رزماری (*Rosmarinus officinalis* L) و فعالیت

مربوط به تیمار (۵۰-۶۰-۱۰۰) در غلظت ۵۰ ppm و زمان $0.26 \pm 3/1$ ساعت است ($P < 0.05$)؛ و بالاترین توانایی در پایداری اکسیداسیون نمونه‌ی روغن مربوط به تیمار (۲۰-۱۰۰-۸۰) در غلظت ۲۰۰ ppm با زمان $0.28 \pm 8/96$ ساعت است ($P < 0.05$).

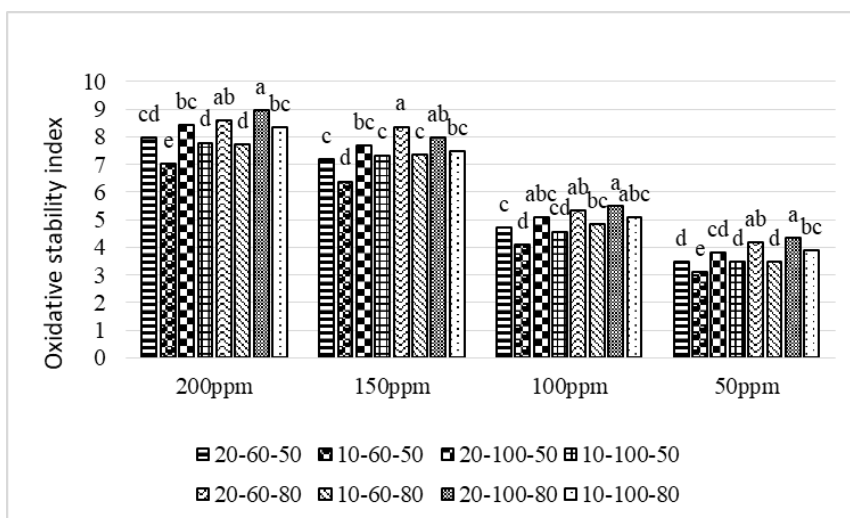
در بررسی آنالیز واریانس مشاهده شد (شکل ۱۵) که تأثیر تیمارهای مختلف استخراج بر پایداری اکسایشی فنول آزاد عصاره‌ی برگ زوفا در تمامی غلظت‌ها و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها در سطح ۵ درصد معنی‌دار است. کمترین پایداری اکسایشی مربوط به تیمار (۵۰-۶۰-۱۰۰) در غلظت ۵۰ ppm و زمان $0.24 \pm 3/564$ ساعت است ($P < 0.05$)؛ و بالاترین توانایی در پایداری اکسیداسیون نمونه‌ی روغن در تمامی غلظت‌ها به‌غیر از ۱۵۰ ppm مربوط به تیمار (۸۰-۲۰-۱۰۰) که در غلظت ۲۰۰ ppm با زمان $0.46 \pm 10/3992$ ساعت است. در غلظت ۱۵۰ ppm بیشترین پایداری اکسایشی تیمار (۸۰-۶۰-۲۰) نشان داد ($P < 0.05$).

در بررسی آنالیز واریانس مشاهده شد که تأثیر تیمارهای مختلف استخراج بر پایداری اکسایشی فنول باندشده عصاره‌ی برگ زوفا در تمامی غلظت‌ها و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها در سطح ۵ درصد معنی‌دار است. (شکل ۱۶) کمترین پایداری اکسایشی مربوط به تیمار (۵۰-۶۰-۱۰۰) در غلظت ۵۰ ppm و زمان $0.19 \pm 2/8868$ ساعت است ($P < 0.05$)؛ و بالاترین توانایی در پایداری اکسیداسیون نمونه‌ی روغن در تمامی غلظت‌ها به‌غیر از ۱۵۰ ppm مربوط به تیمار (۲۰-۱۰۰-۸۰) که در غلظت ۲۰۰ ppm با زمان $0.37 \pm 8/4234$ ساعت است. در غلظت ۱۵۰ ppm بیشترین پایداری اکسایشی تیمار (۸۰-۶۰-۲۰) نشان داد ($P < 0.05$).

بر اساس نتایج فوق می‌توان مشاهده کرد فنول‌آزاد نسبت به فنول باندشده و عصاره، پایداری اکسایشی بهتری دارد.

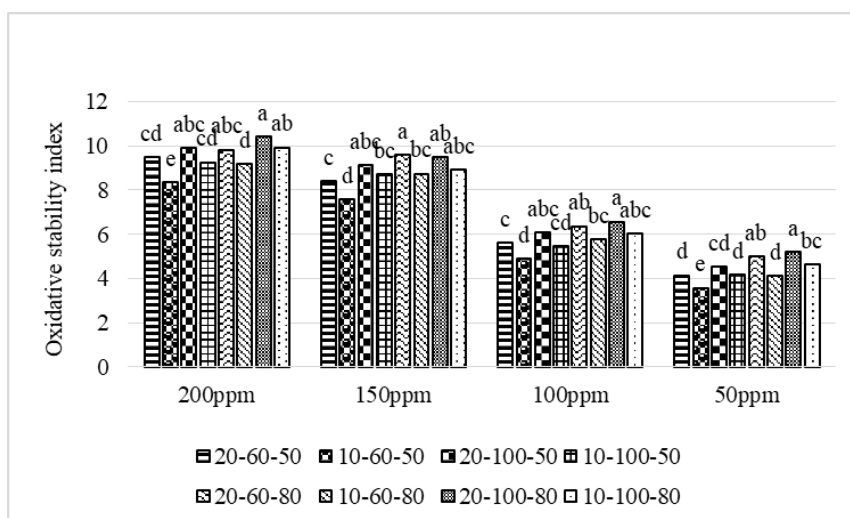
آنتی‌اکسیدانی نسبی آن‌ها در روغن سویا با استفاده از رنسیمت انجام دادند نشان دادند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسیدکارنوسیک خالص با بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن (BHT)، بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول (BHA)، تری‌بوتیل‌هیدروکینون (TBHQ) مقایسه شد و چندین بار بیشتر و بهتر از BHT و BHA و کمتر از TBHQ بود، (ماریاسوا ۲۰۰۶) کنسانتره آنتی‌اکسیدانی از گل همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L)، ریحان (*Ocimum basilicum* L)، نعناع چمنی (*Prunella vulgaris* L) و گل ماهور (*Verbascum densiflorum* L) به روغن آفتابگردان و روغن کلزا به ترتیب اضافه کردند و پایداری اکسایشی آن‌ها را توسط، رنسیمت اندازه‌گیری کردند و بیان کردند آنتی‌اکسیدان مؤثر در هر دو روغن آفتابگردان و روغن کلزا، کنسانتره گل همیشه‌بهار بود همچنین کنسانتره ریحان دارای اثر آنتی‌اکسیدانی است که با اثر آنتی‌اکسیدانی کنسانتره گل همیشه‌بهار قابل مقایسه است. فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گندم‌سیاه (*Fagopyrum esculentum* Möhench) توسط، سان و هو (۲۰۰۵) مورد بررسی قرار گرفت و با حلال‌هایی با قطبیت مختلف استخراج گردید و بیان کردند که عصاره متانولی طولانی‌ترین زمان القا شدن 0.7 ± 7 ساعت با روش Rancimat نشان داد. سالتا و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که وقتی عصاره برگ زیتون حاوی پلی‌فنول‌ها به روغن‌های تجاری اضافه می‌گردد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و پایداری اکسیداتیو به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد که با نتایج حاصل از

این تحقیق نیز مطابقت می‌کند. آن‌ها همچنین نشان دادند که غلظت ۲۰۰ ppm ترکیبات فنولی استخراج شده از برگه‌ای زیتون نسبت به بوتیل‌هیدروکس‌تولوئن (BHT) فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد و قادر به تأخیر انداختن رنسدیتی اکسیداتیو روغن آفتابگردان دارد. قره‌خانی و همکاران (۱۳۸۷) نتیجه گرفتند که عصاره گزنه به علت دارا بودن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی قادر هستند با رادیکال‌های آزاد حاصل از اکسایش لیپیدها واکنش داده و موجب قطع واکنش‌های زنجیری و افزایش زمان اکسایش گردند؛ بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش و سایرین می‌توان دست یافت که عصاره‌های حاصل آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی قادر به پایداری اکسایشی روغن گردند گزارش شده است که اگر پایداری روغن حرارت بیشتر از ۲/۳ ساعت باشد، این روغن هنوز ایمن بوده از لحاظ خصوصیات طعمی قابل‌قبول در نظر گرفته می‌شود (فروش و موسوی ۲۰۰۷). بنابراین عصاره‌های این تحقیق در تمامی غلظت‌ها در پایداری اکسایشی روغن مؤثر هستند. در تحقیق انجام‌شده توسط کمالی روستا و همکاران (۲۰۱۱) مشخص شد که افزایش غلظت عصاره دارچین، پایداری اکسیداتیو روغن آفتابگردان را افزایش می‌دهد. این نشان می‌دهد که اثرات فنولیک ترکیبات آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره‌ها در غلظت‌های بالاتر این ترکیبات در نمونه‌های روغنی افزایش می‌یابد. ما همچنین این روند را در نتایج این تحقیق مشاهده کردیم.



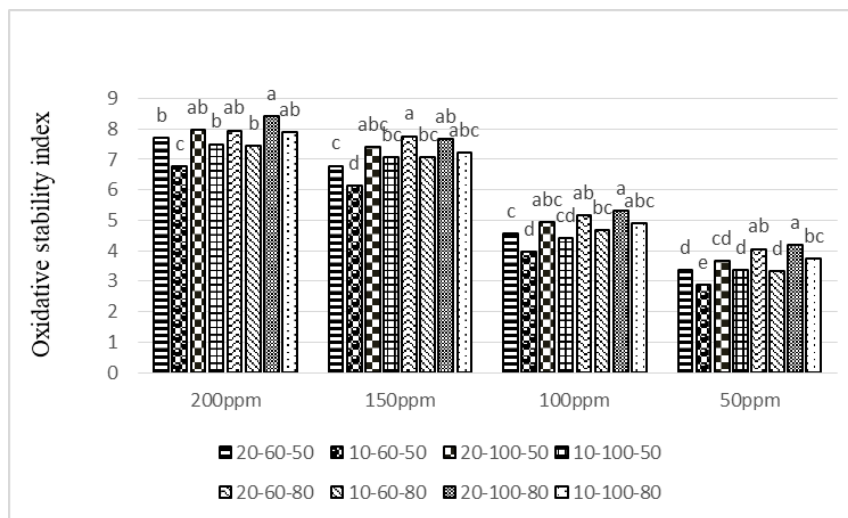
شکل ۱۴- مقایسه شاخص پایداری اکسایشی روغن حاوی تیمارهای مختلف عصاره برگ زوفا در غلظت‌های مختلف در روش اولتراسوند پروپ

Figure 14- Comparison of oxidative stability index of oil containing different treatments of *Hyssopus officinalis* leaf extract in different concentrations in probe ultrasound method similar letters indicate no significant difference.



شکل ۱۵- مقایسه شاخص پایداری اکسایشی روغن حاوی تیمارهای مختلف فنول آزاد عصاره برگ زوفا در غلظت‌های مختلف در روش اولتراسوند پروپ

Figure 15 - Comparison of oxidative stability index of oil containing different free phenol treatments of *Hyssopus officinalis* leaf extract in different concentrations in probe ultrasound method similar letters indicate no significant difference.



شکل ۱۶- مقایسه شاخص پایداری اکسایشی روغن حاوی تیمارهای مختلف فنول‌باندشده عصاره برگ زوفا در غلظت‌های مختلف در روش اولتراسوند پروب

Figure 16 - Comparison of oxidative stability index of oil containing different bond phenol treatments of *Hyssopus officinalis* leaf extract in different concentrations in probe ultrasound method similar letters indicate no significant difference.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره حاصل از برگ زوفا که به روش اولتراسوند پروب استخراج گردید، حاوی مقادیر قابل‌توجهی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی است که بین این ترکیبات و فعالیت آنتی‌اکسیدانی رابطه مستقیم وجود دارد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که عصاره برگ زوفا دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی است؛ و بیشترین مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی مربوط به عصاره و ترکیبات فنولی آزاد و باند شده حاصل از تیمار (۸۰-۱۰۰-۲۰) است؛ و در ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسط آزمون DPPH بیشترین درصد مهار مربوط به عصاره حاصل از تیمار (۸۰-۲۰-۱۰۰) و بیشترین درصد مهار برای فنول‌های آزاد و باندشده مربوط به تیمار (۸۰-۶۰-۲۰) است و کمترین IC_{50} عصاره حاصل از تیمار (۸۰-۶۰-۲۰) می‌باشد؛ و در ارتباط با فنول‌های آزاد و باند شده تیمار (۸۰-۱۰۰-۲۰) کمترین IC_{50} را نشان داد و در آزمون‌های بتاکاروتن و OSI بهترین تیمار عصاره و فراکسیون‌های فنولی آزاد و باندشده را، تیمار (۸۰-۲۰-۱۰۰) و

(۲۰-۱۰۰) نشان داد؛ و مشخص شد که رابطه مستقیم بین محتوای فنولی، فنول‌های آزاد و باندشده در آزمون‌های بتاکاروتن و OSI وجود دارد، تنها در مهار رادیکال DPPH همبستگی بین محتوای فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود نداشت که می‌تواند مربوط به عوامل مؤثر دیگر (اثر سینرژیتی یا آنتاگونیسمی بین ترکیبات فعال، تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل، وجود ناخالصی در عصاره، روش استخراج و غیره) باشد و همچنین نتایج نشان دادند که فراکسیون‌های فنولی آزاد محتوای فنولی بیشتری نسبت به فنول‌باندشده دارند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری را نشان دادند.

فنول‌های باند شده و آزاد شود دارای مزایایی برای سلامتی هستند، ترکیبات فنولی آزادشده در ماتریکس مواد غذایی به‌عنوان مواد نگه‌دارنده غذا استفاده می‌شوند. برای استفاده از ترکیبات فنولی باندشده در صنایع غذایی، صنایع دارویی و لوازم آرایشی، روش‌هایی برای آزادسازی و استخراج آن‌ها از محصولات جانبی زراعی و رسوبات حاصل از عصاره‌گیری که بخش

زیادی از فنول‌های باندشده را در برمی‌گیرد باید طراحی شود. همچنین جداسازی فنول‌های آزاد می‌تواند به تولید ترکیبات زیستی با خواص آنتی اکسیدانی بالا گردد و به طور مؤثرتری در صنعت غذا و دارو و آرایشی استفاده شود.

به طور کل می‌توان گفت نسبت حلال‌ها، شدت اولتراسوند و مدت زمان استخراج بر روی قدرت آنتی اکسیدانی عصاره زوفا تأثیرگذار است. نکات فوق نشان‌دهنده کارایی اولتراسوند برای بازیابی ترکیبات فنولی که عمدتاً به دلیل پدیده کاویتاسیون صوتی است. این به دلیل انتشار امواج التراسونیک از طریق یک محیط مایع است که موجب آسیب به دیواره گیاهی می‌شود و موجب بهبود نفوذ حلال و متعاقباً آزادسازی ترکیبات

فنولی می‌شود. علاوه بر این جایگزینی حلال‌های آلی با حلال‌هایی است که اثرات سمی نشان نمی‌دهند و در طول فرایند، در مقایسه با روش‌های معمول، انرژی کمتری مصرف می‌کند. همچنین باعث کاهش زمان و درجه حرارت فرآیند می‌شود که برای استخراج ترکیبات حساس به حرارت، مانند ترکیبات فنولی مفید است. همه این خصوصیات نشان می‌دهد که اولتراسوند می‌تواند به عنوان یک فرایند جدید و جایگزین برای استفاده از بقایای کشاورزی و صنعتی و استخراج کارآمد ترکیبات فنولی باشد؛ و منجر به تولید محصولات با ارزش افزوده بالا است که سود زیادی در صنعت دارد و در نهایت، اینکه نسبت به روش‌های متعارف استخراج این روش، آلودگی محیط زیستی کمتری دارد.

منابع مورد استفاده

- خلیلی م، ابراهیم‌زاده م، ۱۳۹۳. آنتی اکسیدان‌ها و برخی از روش‌های متداول اندازه گیری آن‌ها، مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۲۴(۱۲۰)، ۱۸۸-۲۰۸.
- روحانی ر، عین افشار س و احمدزاد ر. ۱۳۹۴، استخراج ترکیبات آنتوسیانینی و آنتی اکسیدانی پرچم گل زعفران به کمک فناوری امواج فراصوت، نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۱(۲)، ۱۷۰-۱۶۱.
- قاسمی ع، حمیدی ح، آروس ج، معصومی ع. ۱۳۹۲، بررسی اثر شوری و دما بر جوانه‌زنی بذر گیاه دارویی زوفا (*Hyssopus officinalis*)، مجله دانشگاه تهران. به زراعی کشاورزی، ۱۵(۳)، ۱۶۹-۱۵۵.
- قربانی م، ابونجمی م، قربانی جاوید م، عرب حسینی ا. ۱۳۹۶، تأثیر امواج فراصوت بر میزان استخراج آسکوربیک اسید از دانه رازیانه و توانایی عصاره آن در بهبود ویژگی‌های آنتی اکسیدانی، نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی ایران، ۲۷(۱)، ۷۱-۵۹.
- قره خانی م، صادقی ماهونک ع، قربانی م. ۱۳۸۷، آنتی اکسیدان های طبیعی: ترکیبات عملگر جدید، دومین کنفرانس ملی غذای فراسودمند (عملگر)، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، ۴۵۲ - ۴۴۳.
- نصیری‌فر ز، صادقی‌ماهونک ع و کمالی ف. ۱۳۹۲، تاثیر شرایط عصاره‌گیری به کمک فراصوت بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از (*Celtis australis*) میوه داغداغان، نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی، ۵(۲)، ۱۳۰-۱۱۵.
- Acosta-Estrada BA, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO, 2014. Bound phenolics in foods, a review. Food Chemistry 152: 46-55.
- Alighourchi HR, Barzegar M, Sahari MA, Abbasi S, 2013. Effect of sonication on anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant capacity of pomegranate juices. International Food Research Journal 20: 1703-1709.
- Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA, 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. Food Chemistry 84: 551-562.
- Andreasen MF, Kroon PA, Williamson G, Garcia-Conesa MT, 2001. Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. Free Radical Biology and Medicine 31: 304-314.

- Ashokkumar M, Sunartio D, Kentish S, Mawson R, Simons L, Vilku K, Versteeg C (Kees), 2008. Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9: 155–160.
- Bhat R, Kamaruddin NSBC, Min-Tze L, & Karim AA, 2011. Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrasonics Sonochemistry* 18(6): 1295–1300.
- Bower JA, 2009. *Statistical Methods for Food Science: Introductory procedures for the food practitioner*. Wiley-Blackwell.
- Capannesi C, Palchetti I, Mascini M, Parenti A, 2000. Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chemistry* 71: 553–562.
- Carrera C, Ruiz-Rodríguez A, Palma M, Barroso CG, 2012. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta* 732: 100–104.
- Casal S, Malheiro R, Sendas A, Oliveira BPP, Pereira JA, 2010. Olive oil stability under deep-frying conditions. *Food and Chemical Toxicology* 48: 2972–2979.
- Chandrasekara A, Shahidi F, 2010. Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 6706–6714. doi:10.1021/jf100868b
- Chen PX, Tang Y, Marccone MF, Pauls PK, Zhang B, Liu R, Tsao R, 2015. Characterization of free, conjugated and bound phenolics and lipophilic antioxidants in regular- and non-darkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* 185: 298–308.
- Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M, 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*. 34: 540–560
- Corbin C, Fidel T, Leclerc EA, Barakzoy E, Sagot N, Falguières A, Renouard S, Blondeau JP, Ferroud C, Doussot J, Lainé E, Hano C, 2015. Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry* 26: 176–185.
- Dayana Priyadharshini S, Bakthavatsalam AK, 2016. Optimization of phenol degradation by the microalga *Chlorella pyrenoidosa* using Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology. *Bioresource Technology* 207: 150–156.
- Dorman HJD, Peltoketo A, Hiltunen R, Tikkanen MJ, 2003. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry* 83: 255–262.
- De Guzman R, Tang H, Salley S, Ng KYS, 2009. Synergistic effects of antioxidants on the oxidative stability of soybean oil- and poultry fat-based biodiesel. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* 86: 459–467.
- Falleh H, Ksouri R, Lucchessi ME, Abdelly C, Magné C, 2012. Ultrasound-assisted extraction: Effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 11: 243–249.
- Farhoosh R, 2007. The effect of operational parameters of the Rancimat method on the determination of the oxidative stability measures and shelf-life prediction of soybean oil. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* 84: 205–209.
- Farhoosh R, Moosavi SMR, 2007. Rancimat test for the assessment of used frying oils quality. *Journal of Food Lipids* 14: 263–271
- Fathiazad F, Hamedeyazdan S. (2011) A review on *Hyssopus officinalis* L.: Composition and biological activities. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 5(17):1959-1966
- Ghafoor K, Choi YH, Jeon JY, & Jo IH, (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(11): 4988–4994.
- Galvan D'Alessandro L, Kriaa K, Nikov I, Dimitrov K, 2012. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology* 93: 42–47.

- Garcia-Castello EM, Rodriguez-Lopez AD, Mayor L, Ballesteros R, Conidi C, Cassano A, 2015. Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes. *LWT - Food Science and Technology* 64: 1114–1122.
- Gökmen V, Serpen A, Fogliano V, 2009. Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. *Trends in Food Science & Technology* 20: 278–288.
- Guimarães R, Barros L, Barreira JCM, Sousa MJ, Carvalho AM, Ferreira ICFR, 2010. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food and Chemical Toxicology* 48: 99–106.
- Hatami T, Emami SA, Miraghaee SS, Mojarreb M, 2014. Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Different Extracts and Fractions from the Aerial Parts of *Artemisia biennis* Willd. *Iranian journal of pharmaceutical research* 13: 551–9.
- Herrera MC, Luque De Castro MD, 2004. Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 37: 1106–1112.
- Horžić D, Jambrak AR, Belščak-Cvitanović A, Komes D, Lelas V, 2012. Comparison of Conventional and Ultrasound Assisted Extraction Techniques of Yellow Tea and Bioactive Composition of Obtained Extracts. *Food and Bioprocess Technology* 5: 2858–2870.
- Hossain MB, Brunton NP, Patras A, Tiwari B, O'Donnell CP, Martin-Diana AB, Barry-Ryan C, 2012. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry* 19: 582–590.
- Huang HS, & Liaw ET, 2017. Extraction optimization of flavonoids from *hypericum formosanum* and matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity. *Molecules*: 22(12).
- Inglett GE, Chen D, Berhow M, Lee S, 2011. Antioxidant activity of commercial buckwheat flours and their free and bound phenolic compositions. *Food Chemistry* 125: 923–929.
- Jovanovic A, Djordjevic V, Zdunic G, Savikin K, Pljevljakusic D, & Bugarski B, 2016. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Thymus serpyllum* and its antioxidant activity. *Hemijska Industrija*, 70(4): 391–398.
- Juntachote T, & Berghofer E, 2005. Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. *Food Chemistry* 92(2): 193–202.
- Kallithraka S, Garcia-Viguera C, Bridle P, Bakker J, 1995. Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochemical Analysis* 6: 265–267.
- Kamali Roosta L, Ghavami M, Gharachoorloo M, Azizinezhad R, 2011(. Extracting cinnamon extracts and studying their effects on the stability of sunflower oil, *The Journal of the Nutritional Sciences and Food Industry of Iran*. 6(1): 13 – 22.
- Kaisoon O, Siriamornpun S, Weerapreeyakul N, Meeso N, 2011. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. *Journal of Functional Foods* 3: 88–99.
- Kawabata K, Mukai R, Ishisaka A, 2015. Quercetin and related polyphenols: New insights and implications for their bioactivity and bioavailability. *Food and Function* 6: 1399–1417.
- Keshavarz M, Mostafaie A, Mansouri K, Bidmeshkipour A, Motlagh HRM, Parvaneh S, 2010. In vitro and ex vivo antiangiogenic activity of *Salvia officinalis*. *Phytotherapy research* 24: 1526–1531.
- Khan MK, Abert-Vian M, Fabiano-Tixier AS, Dangles O, Chemat F, 2010. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry* 119: 851–858.
- Kotásková E, Sumczynski D, Mllček J, Valášek P, 2016. Determination of free and bound phenolics using HPLC-DAD, antioxidant activity and in vitro digestibility of *Eragrostis tef*. *Journal of Food Composition and Analysis* 46: 15–21.
- Lai H, Lim Y, 2011. Evaluation of Antioxidant Activities of the Methanolic Extracts of Selected Ferns in Malaysia. *International Journal of Environmental Science and Development* 2: 442–447.
- Lanez T, Haoua KB, 2017. The effect of soxhlet and ultrasonic-assisted extraction on antioxidant components and antioxidant properties of selected south Algerian red potatoes cultivars. *Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 18 (4): 435 – 448

- Liang YC, May CY, Foon CS, Ngan MA, Hock CC, Basiron Y, 2006. The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of palm diesel. *Fuel* 85: 867–870.
- Locatelli M, Gindro R, Travaglia F, Coisson JD, Rinaldi M, Arlorio M, 2009. Study of the DPPH {radical dot}-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry* 114: 889–897.
- Lee SH, Kang MC, Moon SH, Jeon BT, Jeon YJ, 2013. Potential use of ultrasound in antioxidant extraction from *Ecklonia cava*. *Algae* 28: 371–378.
- Liu X, Dong M, Chen X, Jiang M, Lv X, Yan G, 2007. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chemistry* 105: 548–554.
- Maghsoudlou E, Esmaeilzadeh Kenari R, Raftani Amiri Z, 2017. Evaluation of Antioxidant Activity of Fig (*Ficus carica*) Pulp and Skin Extract and Its Application in Enhancing Oxidative Stability of Canola Oil. *Journal of Food Processing and Preservation* 41(4).
- Mahan L, Escott-Stump S, Raymond J, Krause M, 2012. Krause's food & the nutrition care process, US Patent 1,503,006: 36–40.
- Máriássyová M, 2006. Antioxidant activity of some herbal extracts in rapeseed and sunflower oils. *Journal of Food and Nutrition Research* 45: 104–109.
- Meullemiestre A, Petitcolas E, Maache-Rezzoug Z, Chemat F, Rezzoug SA, 2016. Impact of ultrasound on solid-liquid extraction of phenolic compounds from maritime pine sawdust waste. Kinetics, optimization and large scale experiments. *Ultrasonics Sonochemistry* 28: 230–239.
- Min B, Gu L, McClung AM, Bergman CJ, Chen MH, 2012. Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bran colours. *Food Chemistry* 133: 715–722.
- Mohammedi Z, & Atik F, 2011. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(1): 609–615.
- Morelló JR, Romero MP, Ramo T, Motilva MJ, 2005. Evaluation of l-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. *Plant Science* 168: 65–72.
- Muñiz-Márquez B, Martínez-Ávila GC, Wong-Paz JE, Belmares-Cerda R, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN, 2013. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry* 20: 1149–1154.
- Osawa WO, Sahoo PK, Onyari JM, Mulaa FJ, 2016. Effects of antioxidants on oxidation and storage stability of *Croton megalocarpus* biodiesel. *International Journal of Energy and Environmental Engineering* 7: 85–91.
- Patras A, Brunton NP, O'Donnell C, Tiwari BK, 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science and Technology*. 21: 3–11
- Peričin D, Krimer V, Trivić S, Radulović L, 2009. The distribution of phenolic acids in pumpkin's hull-less seed, skin, oil cake meal, dehulled kernel and hull. *Food Chemistry* 113: 450–456.
- Perry A, Rasmussen H, Johnson EJ, 2009. Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 9–15.
- Potterat O, 1997. Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. *Current Organic Chemistry* 1(4):415–440.
- Richheimer SL, Bernart MW, King GA, Kent MC, Bailey DT, 1996. Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society* 73: 507–514.
- Renger A, Steinhart H, 2000. Ferulic acid dehydrodimers as structural elements in cereal dietary fibre. *European Food Research and Technology* 211: 422–428.
- Roleira FMF, Tavares-Da-Silva EJ, Varela CL, Costa SC, Silva T, Garrido J, Borges F, 2015. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry* 183: 235–258.
- Şahin S, Şamli R, 2013. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry* 20: 595–602.

- Salta FN, Mylona A, Chiou A, Boskou G, Andrikopoulos NK, 2009. Oxidative stability of edible vegetable oils endriched in polyphenols with olive leaf extract. *Food Science and Technology* 13: 413-421
- Sardarodiyani M, Mehraban Sang Atash M, Arianfar A, 2016. 'The optimization and comparison of different extraction approaches (ultrasound and maceration) on chemical composition of *Elaeagnus angustifolia* L. extract', *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants* 4(3): 74-94.
- Siramon P, Ohtani Y, 2007. Antioxidative and antiradical activities of *Eucalyptus camaldulensis* leaf oils from Thailand. *Journal of Wood Science* 53: 498-504.
- Sendzikiene E, Makareviciene V, Janulis P, 2005. Oxidation stability of biodiesel fuel produced from fatty wastes. *Polish Journal of Environmental Studies* 14: 335-339.
- Subba Rao MVSST, Muralikrishna G, 2002. Evaluation of the antioxidant properties of free and bound phenolic acids from native and malted finger millet (*ragi*, *Eleusine coracana* Indaf-15). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 889-892.
- Sun T, Ho CT, 2005. Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry* 90: 743-749.
- Sumczynski D, Kotásková E, Družbíková H, Mlček J, 2016. Determination of contents and antioxidant activity of free and bound phenolics compounds and in vitro digestibility of commercial black and red rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Food Chemistry* 211: 339-346.
- Ti H, Zhang R, Zhang M, Li Q, Wei Z, Zhang Y, Tang X, Deng Y, Liu L, Ma Y, 2014. Dynamic changes in the free and bound phenolic compounds and antioxidant activity of brown rice at different germination stages. *Food Chemistry* 161: 337-344.
- Tepe B, Daferera D, Tepe AS, Polissiou M, Sokmen A, 2007. Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavida* Hub-Mor. from Turkey. *Food Chemistry* 103: 1358-1364.
- Tomšik A, Pavlič B, Vladić J, Ramić M, Brindza J, Vidović S, 2016. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrasonics Sonochemistry* 29: 502-511.
- Yanishlieva NV, Marinova E, Pokorný J, 2006. Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108: 776-793
- Zieliński H, Kozłowska H, 2000. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2008-2016.

The effect of extraction of probe ultrasound on antioxidant properties of bounded and free phenols of Hyssop (*Hyssopus officinalis*) extract

H Aziminezhad¹, R Esmailzadeh Kenari^{2*} and Z Raftani Amiri³

Received: December 8, 2018 Accepted: January 2, 2019

¹MSC student of food science and technology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources.,Sari ,Iran

²Associate Professor of food science and technology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources.,Sari ,Iran

*Corresponding author: reza_kenari@yahoo.com

Introduction: Excessive oxidative stress can cause multiple chronic diseases such as diabetes, cardiovascular disease, and cancer and aging-related diseases (Kawabata et al 2015). Phytochemicals reduce cardiovascular disease by decreasing the oxidation of LDL, the absorption and synthesis of cholesterol, blood pressure and increasing the blood clotting time. Also, the potential chemical prevention property of these compounds against cancer is caused by their ability to moderate the epigenetic changes of cancer cells (Mahan et al. 2012). Polyphenols have antioxidant activity, plant polyphenols have different functions and can act as a reducing agent, Phenolic acids and their derivatives form a large group of polyphenols that play an important role in the structure of plants, including the cell wall. (Keshavarz et al 2010). The phenolic acids can be classified as either free or bonded phenolic acids (Renger and Steinhart 2000). Free phenolic compounds in the gastrointestinal system can act against the incidence of colon cancer and other chronic diseases, free phenolic acids can be extracted with solvents such as water, methanol, ethanol and acetone. (Min et al 2012). Bonded phenolic acids are compounds that are insoluble, and are bonded to structural components of cellular wall such as cellulose, hemicellulose (for example arabinoxylans), lignin, pectin and structural proteins (Acosta et al 2014). They cannot be extracted by common techniques which lead to less prediction of total phenolic content from the real extent (Ti and al 2014). Hyssop, scientifically known as *Hyssopus officinalis*, that belongs to the *Lamiaceae* family (Ghasemi et al 1392). This plant is used as a flavoring and improving organoleptic properties in the food industry and has aromatic compounds that is used in soaps, cosmetics and perfumes. This plant is rich in volatile oils, flavonoids, tannins, marrubiin. This plant has antimicrobial, laxative and antispasmodic properties and has strong antiviral activity against HIV. It is antibacterial, antifungal and has antioxidant properties. Thus, the study aimed at the separation of the free and bonded phenolic factions and the determination of the phenolic content and antioxidant activity of hyssop plant leaf (*Hyssopus officinalis*) which partly contributes to the better prediction of the phenolic content and antioxidant activity.

Material and methods: Extraction of the hyssop plant leaf was carried out by using ultrasound probe under 10 and 20 minutes and the intensity of 60 - 100 W and the use of ethanol: water with ratios (80:20) and (50:50) and separating free phenolic fractions from the extractions using methanol and ultrasound for one hour (adjust the pH in the range of 4.5-5.5 by using 6M HCl), Then centrifuged at 4321 g, for 25 min, the supernatant is free phenolic. And then separating the bonded phenolic factions from residues resulting from the extraction of free phenolic by using caustic soda and ultrasound for two hours (adjust the pH in the range of 4.5-5.5 by using 6M HCl) and then centrifuged at 4321 g for 25 min, the supernatant was used as bonded phenolic extract

(Kotásková et al 2016). The antioxidant activity was measured by free radical inhibition tests (DPPH) and the evaluation of colorlessness of beta carotene - linoleic acid, and oxidative stability test (OSI).

Results and discussion: The results of this study show that hyssop leaf extract which was extracted by ultrasound probe method contains significant amounts of phenolic and flavonoid compounds and there is a direct relationship between these compounds. Therefore, it can be concluded that hyssop leaf extract has antioxidant activity, and the highest amount of phenolic and flavonoid compounds of the extract, free and bonded phenolic compounds are (20-100-80) respectively. According to the determination of antioxidant activity by DPPH test, the maximum inhibition percentage for the obtained extract from treatment is (20-100-80) and the maximum inhibition amount for free and bonded phenols of the treatment is (20-60-80) and the least IC_{50} of the obtained extract from the treatment is (20-60-80); and is (20-100-80) for free and bonded phenols and the best treatment of free and bonded fractions was shown by the treatment (20-100-80) in the beta - carotene and OSI tests. Thus, there is a direct relationship between phenolic content, free and bonded phenols in beta - carotene and OSI tests. In DPPH radical inhibition, there was no correlation between phenolic content and antioxidant activity, which could be related to other factors (synergistic or antagonistic effect between active compounds, number and location of hydroxyl groups, presence of impurity in the extract, extraction method, etc.). The results also showed that free phenolic fractions had higher phenolic content and better antioxidant activity than bonded phenols. Free and bonded phenols have benefits for health. The released phenolic compounds in food matrix are used as food preservative. In order to use bonded phenolic compounds in food, pharmaceutical and cosmetic industry, some methods should be designed to release and extract them from the field crops and obtained sediments from extraction, which includes a large part of bonded phenols. Also, separation of free phenols can produce bioactive compounds with high antioxidant properties and can be used more efficiently in food and pharmaceutical industry.

Conclusion: Generally, the ratio of solvents, ultrasound intensity and extraction time affect the antioxidant power of hyssop extract. These points indicate the efficiency of ultrasound for recovery of phenolic compounds is mainly due to the cavitation phenomenon. This is due to the emission of ultrasonic waves through a liquid medium which damage the plant wall and improve the solvent penetration and subsequently release the phenolic compounds. In addition, organic solvents are replaced with those which have no toxic effects and consume less energy during the process compared to conventional methods. It also reduces the process time and temperature, which leads it to be useful for extraction of heat - sensitive compounds, such as phenolic compounds. All of these characteristics indicate that ultrasound can be used as a new and alternative process for the use of agricultural and industrial remains and efficient extraction of the phenolic compounds; and it leads to the production of products with high value which have a lot of profit in the industry and finally, it pollutes the environment less than conventional methods.

Keywords: Ultrasound Probe, Antioxidant Activity, *Hyssopus officinalis*, Phenolic Compounds, Free Phenolic Compounds, bound Phenolic Compounds