

Comparing the Effect of Different Extraction Methods and the Role of Solvent Polarity on Total Phenolic and Flavonoid Contents and Antioxidant Activities of *Ferula persica*

Elham Majidaee¹,
Seyyede Raheleh Hosseini Talei²,
Sepideh Gholamnezhad³,
Mohammad Ali Ebrahimzadeh⁴

¹ Pharmacy Student, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² MSc in Biochemistry, Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ MSc in Organic Chemistry, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received September 17, 2020 ; Accepted August 2, 2020)

Abstract

Background and purpose: *Ferula persica* is traditionally used in treatment of diabetes and rheumatism. There is no report on antioxidant activity of this plant. This investigation was designed to study the impact of extraction methods and solvent polarity on phenolic contents and antioxidant activities of *F. persica* root and aerial parts.

Materials and methods: In this experimental research, the plant was extracted by three methods. Also, it was extracted successively with solvents of different polarities. Antioxidative capacities of the extracts were assessed by three methods. Total phenolic and flavonoid contents were also determined.

Results: The highest yield of extraction was achieved by soxhlet assisted extraction. In DPPH radical scavenging activity, the soxhlet extract of aerial parts showed a higher activity which was significantly different from other extracts ($IC_{50} = 279.3 \pm 9.0 \mu g\ ml^{-1}$, $P < 0.0001$). Methanol extract of aerial parts exhibited the highest antioxidant capacity ($P < 0.0012$). In reducing power assay, compared to other extracts, root ultrasonic and soxhlet assisted extractions showed the highest antioxidative activities ($P < 0.0044$). Methanolic aerial parts showed the highest activity. The extracts did not show high activities in nitric oxide radical scavenging activity. IC_{50} for aerial parts ultrasonic extract was $159.7 \mu g/ml$ and the IC_{50} for ethyl acetate extract of aerial parts was $441.2 \mu g/ml$ which showed significantly higher activity compared to other extracts ($P < 0.0001$).

Conclusion: In this study, the extraction methods significantly influenced antioxidant capacities and total phenolic content. Ethyl acetate and n-butanol were found to be more suitable for extraction of phenolics. Maceration is believed to be a more efficient method for extraction of phenolics.

Keywords: *Ferula persica*, extraction methods, antioxidant, total phenolics, total flavonoids

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (188): 26-39 (Persian).

* Corresponding Author: Mohammad Ali Ebrahimzadeh - Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: zadeh20@yahoo.com)

مقایسه اهمیت روش های مختلف استخراج و نقش افزایش قطبیت حلال در محتوای تام فنل و فلاونوئیدی و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه کما *Ferula persica*

الهام مجیدی¹
سیده راحله حسینی طالعی²
سپیده غلام نژاد³
محمد علی ابراهیم زاده⁴

چکیده

سابقه و هدف: گیاه فرولا پرسیکا (*Ferula persica*) به طور سنتی در درمان دیابت و روماتیسم به کار می رود. گزارشی از فعالیت آنتی اکسیدانی این گیاه در دست نیست. این مطالعه به منظور بررسی تاثیر روش استخراج و قطبیت حلالیت بر محتوای فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی ریشه و اندام هوایی این گیاه طراحی شده است.

مواد و روش ها: این مطالعه به شکل تجربی انجام شد. گیاه به سه روش، عصاره گیری شد. همچنین بطور متوالی با 4 حلال با قطبیت های متفاوت استخراج شد. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با سه روش مورد ارزیابی قرار گرفت. محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی نیز اندازه گیری شد.

یافته ها: بالاترین راندمان عصاره گیری مربوط به سوکسله بود. در بدام اندازه ی رادیکال DPPH عصاره سوکسله اندام هوایی ($IC_{50}=279.3 \pm 9.0 \mu g/ml$) اختلاف معنی داری با سایر عصاره ها داشت ($P < 0/0001$). عصاره متانولی اندام هوایی در این تست بالاترین اثر را داشت ($P < 0/0012$). در تست قدرت احیا کنندگی، عصاره التراسونیک و سوکسله ریشه بالاترین فعالیت را نسبت به سایر عصاره ها نشان دادند ($P < 0/0044$). عصاره متانولی اندام هوایی بالاترین فعالیت را در این تست داشت. عصاره ها فعالیت بالایی در تست بدام اندازه ی نیتریک اکساید نشان ندادند. برای IC_{50} عصاره اولتراسونیک اندام هوایی $159/7 \mu g/ml$ بود ($P < 0/0001$). برای عصاره اتیل استات اندام هوایی $441/2 \mu g/ml$ بود که از تمامی عصاره ها فعالیت بالاتری داشت ($P < 0/0001$).

استنتاج: نتایج به وضوح نشان داد که استفاده روش استخراج تاثیر زیادی بر فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای تام فنلی دارد. اتیل استات و n- بوتانول برای استخراج ترکیبات فنلی مناسب تر هستند. ماسیراسیون بعنوان موثرترین روش برای استخراج ترکیبات فنلی برگزیده شد.

واژه های کلیدی: کما، فرولا پرسیکا، روش استخراج، آنتی اکسیدان، فنل، فلاونوئید

مقدمه

اکسیداتیو استرس ناشی از عدم تعادل بین سیستم دفاعی و تشکیل ذرات فعال اکسیژن می تواند موجب صدمه به چربی ها، پروتئین ها، DNA و کربوهیدرات ها شود. این آسیب می تواند منجر به جراحت و اختلالات

مؤلف مسئول: محمد علی ابراهیم زاده: ساری، کیلومتر 18 جاده دریا، دانشکده داروسازی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
Email: zadeh20@yahoo.com

1. دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 2. کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 3. کارشناس ارشد شیمی آلی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 2. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران.
- تاریخ دریافت: 1398/6/26 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/7/3 تاریخ تصویب: 1399/5/12

دژنراتیو از قبیل بیماری های قلبی عروقی، پیری دیابت، الزایمر و سرطان گردد (1). موجودات زنده سیستم های آنتی اکسیدانی پیچیده ای برای خنثی نمودن ذرات فعال اکسیژن برای کاهش خسارات دارند. این سیستم های آنتی اکسیدانی شامل آنزیم هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، ماکرومولکول هایی مانند آلبومین، سرولولوپلاسمین و فریتین و گروهی از مولکول های کوچک مانند ویتامین ث، آلفا توکوفرول، کاروتنوئیدها، پلی فنل ها، گلو تاتیون، اسید اوریک و بیلی روبین هستند (2). در سال های اخیر تلاش های زیادی بر روی ترکیبات طبیعی و اجزای غذایی شده که می توانند بدن را در مقابل استرس اکسیداتیو محافظت کنند. آنتی اکسیدان های طبیعی محدوده وسیعی از عملکرد بیوشیمیایی دارند که شامل مهار تولید ذرات فعال اکسیژن، بدام اندازی مستقیم یا غیرمستقیم رادیکال های آزاد و تغییر در پتانسیل اکسیداسیون احیا داخل سلولی می شود (3). افزایش توان آنتی اکسیدانی و کاهش سطح پراکسیداسیون چربی ها در بدن می تواند از بروز بسیاری از بیماری های مزمن مانند سرطان، نارسایی قلبی و سمیت کبدی جلوگیری کند (4). نظر به این که گیاهان منبع آنتی اکسیدان های طبیعی می باشد تحقیقات در این زمینه رو به افزایش است (5).

جنس *Ferula* (Apiaceae) از خانواده چتریان دارای بیش از 150 گونه بوده که 52 گونه آن به شکل خودرو در ایران می روید. از گونه های بومی ایران می توان به آنگوزه *Ferula asafetida*، باریجه (قاسنی) *Ferula persica* و *Ferula gummosa* Boiss اشاره نمود (6، 7). کما یا سکینه *F. persica* به خصوص در منطقه شهرمیرزاد سمنان به صورت گسترده رویش داشته و به نام محلی متکا معروف بوده و کاربرد غذایی و طب سنتی فراوانی دارد (8). فرولا پرسیکا یک گونه شناخته شده بوده که به طور سنتی به عنوان ملین، ضدنفخ، ضدهیجان و در درمان دیابت، روماتیسم و کمر درد استفاده می شود (9). ترکیبات شیمیایی فرولا پرسیکا شامل ترکیبات فرار (9)، کومارین های سزکوئی ترین (10)،

ترکیبات حاوی گوگرد (10-12)، کومارین های گلیکوزیده سزکوئی ترین (13) هستند. فرولا پرسیکا در طب سنتی به عنوان پایین آورنده فشارخون استفاده می شود (14). اثر آنتی اکسیدانی خوبی از گونه های مختلف فرولا به چاپ رسیده است. فعالیت آنتی اکسیدانی *F. Foetida* و *F. gummosa* و *F. assafoetida* گزارش شده است (15-18). بررسی های مختلف روی گونه های فرولا اثرات ضد دردی، ضد التهابی، ضد تب، ضد تشنج و شل کننده عضلات صاف را نشان داده است (19). اثر ضد پسودوموناس از عصاره صمغ فرولا پرسیکا به چاپ رسیده است (20). از عصاره و بخش های تازه گیاه *F. persica* اثر ضد لشماتیا و مهارکنندگی لیپواکسیژناز گزارش شده است (19). ترکیب سزکوئی ترین کومارین گلیکوزید نیز اخیرا از این گیاه جداسازی شده است (19). جنس فرولا غنی از کومارین ها و به خصوص کومارین های سزکوئی ترین است. ترکیبات بیواکتیو شامل auraptene (اثر ضد فشار خون و ضد التهاب و ضد سرطان) و Galbanic acid (دارای اثرات ضدتومور و ضدآنژیوزن) نیز از گونه های مختلف *Ferula* گزارش شده است (19). این ترکیبات بیش تر در ریشه گیاه ذخیره می شوند بنابراین ریشه های گیاه نسبت به اندام های هوایی منبع بهتری برای جداسازی این ترکیبات هستند. ترکیبات حاوی سولفور در گیاه نقش اصلی را در ایجاد بو و طعم گیاه دارند (6). در سال 2010 فعالیت های سایتوتوکسیک و ضد تشنج از عصاره متانولی گونه های مختلف فرولا مورد ارزیابی قرار گرفته است (21). در سال 2005 فعالیت های ضد میکروبی عصاره های آبی و کلروفرم ریشه گیاه مورد ارزیابی قرار گرفت (22). Umbelliprenin یکی از جالب ترین اجزا جدا شده از جنس فرولا می باشد. از خواص این ترکیب می توان به اثر ضد التهابی آن اشاره نمود (19).

امروزه تحقیقات وسیعی بر روی عصاره های گیاهی صورت می گیرد تا این که به نمونه هایی با فعالیت آنتی اکسیدانی بالا دست یابند. از آنجایی که چندین

روش برای تهیه عصاره گیاهی وجود دارد و این که هر روش در مقایسه با دیگر روش‌ها از محدودیت‌ها و مزایای منحصر به فرد برخوردار می‌باشند. در سال‌های اخیر به ارائه متدهای جدید استخراج، توجه فراوانی شده است به گونه‌ای که بیش‌ترین اجزای اصلی در کوتاه‌ترین زمان ممکن با کم‌ترین قیمت به‌دست آید (23).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی، دلیل بسیاری از فعالیت‌های بیولوژیک مختلف مشاهده شده از گیاهان است. اثراتی چون ضد دردی، ضد التهابی، ضد افسردگی، ایسکمی، تثبیت‌کننده عشاء سلولی، شلاته‌کنندگی آهن و حتی بیماری‌هایی چون الزایمر با اکسیدان و آنتی‌اکسیدان‌ها در ارتباط هستند. امروزه اکسیدان و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با بسیاری از بیماری‌ها در ارتباط است. علی‌رغم اثرات بیولوژیک متعددی که از فرولا پرسیکا گزارش شده، هیچ مقاله‌ای در خصوص بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه یافت نشده است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام هوایی و ریشه گیاه فرولا پرسیکا و سپس بررسی تاثیر روش استخراج بر قدرت آنتی‌اکسیدانی این گیاه می‌باشد. از سویی تاثیر افزایش قطبیت حلال بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای تام فنل و فلاونوئید تمامی عصاره‌ها بررسی شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به شکل تجربی انجام شد.

نمونه گیاهی

اندام هوایی و غده فرولا پرسیکا توسط دکترای سیستماتیک گیاهی (دکتر بهمن اسلامی) از فیرزوکوه جمع‌آوری و تایید شد. نمونه هرباریومی در دانشکده بیولوژی دانشگاه آزاد قائم شهر (به شماره هرباریومی 1475) نگهداری می‌شود. اندام هوایی و غده‌ها در سایه خشک شده، به قطعات ریز تبدیل شد.

تهیه عصاره به روش خیساندن

در این روش 30 گرم از پودر اندام هوایی گیاه با حدود 70 میلی‌لیتر متانول مخلوط شد. مجموعه به مدت 24 ساعت رها گردید. روز بعد فاز آلی جدا و مجدداً متانول جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار شد. در روز سوم، مجموعه حلال‌ها توسط دستگاه روتاری (تبخیرکننده چرخان) حذف گردید. کل این روند با پودر ریشه گیاه نیز تکرار شد.

تهیه عصاره به روش اولتراسونیک

در این روش از امواج غیر مستقیم اولترا سونیک با فرکانس 60 کیلو هرتز در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت استفاده شد. 25 گرم پودر اندام هوایی گیاه به همراه حدود 70 میلی‌لیتر حلال متانول در بشر قرار داده شد. مجموعه به مدت یک ساعت در حمام اولتراسونیک قرار گرفت. سپس محلول صاف گردید و متانول به‌دست آمده توسط دستگاه روتاری (تبخیر کننده چرخان) حذف شد. کل این روند با پودر ریشه گیاه نیز تکرار شد (5).

تهیه عصاره به روش سوکسله

در این روش 10 گرم پودر اندام هوایی گیاه در کاغذ صافی قرار داده شد و سپس در دستگاه قرار گرفت. عمل استخراج با حلال متانول به مدت 6 ساعت ادامه پیدا کرد، سپس متانول حاوی مواد استخراج شده توسط دستگاه روتاری (تبخیرکننده چرخان) حذف گردید. کل این روند با پودر ریشه گیاه نیز تکرار شد (24).

تعیین محتوای کلی فنولی و فلاونوئید

محتوای ترکیبات فنولی از طریق متد فولین سیو کالتیو انجام شد. غلظت 1 mg/ml از هر عصاره تهیه شد. 0/5 میلی‌لیتر از هر عصاره با 2/5 میلی‌لیتر واکشنر 0/2 نرمال فولین سیو کالتیو مخلوط شد و سپس 2 میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم با غلظت 75 گرم در لیتر

تعیین قدرت احیاء کنندگی

غلظت های مختلف از هر عصاره تهیه شد و با 2/5 میلی لیتر بافر فسفات 0/2 مولار با pH 6/5 و 2/5 میلی لیتر محلول 1 درصد پتاسیم فری سیانید $[K_3Fe(CN_6)]$ مخلوط شد. در دمای 50 درجه سانتی گراد به مدت 20 دقیقه نگهداری شد، سپس 2/5 میلی لیتر از محلول تری کلرواستیک اسید به نمونه ها اضافه شد تا واکنش متوقف شود. سپس نمونه ها به مدت 10 دقیقه در دستگاه سانتریفوژ 3000 دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از اتمام این مرحله 2/5 میلی لیتر از قسمت بالای محلول با 2/5 میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و 0/5 میلی لیتر محلول 0/1 درصد فریک کلراید به آن اضافه شد. سپس جذب محلول در طول موج 700 نانومتر قرائت شد. در این آزمایش آسکوریک اسید با غلظت های 25، 50، 100، 200، 400، 800 میکروگرم در میلی لیتر به عنوان استاندارد استفاده شد. آزمایش برای هر نمونه و استاندارد سه بار تکرار شد (26،25).

ارزیابی میزان بدام اندازی نیتریک اکساید

این روش بر این مبنا استوار بوده که سدیم نیترو پروساید (Sodium nitroprusside) در محلول های آبی در pH فیزیولوژیک به آهستگی نیتریک اکساید تولید نموده که با اکسیژن محیط وارد عمل شده و یون نیتريت تولید می نماید. یون نیتريت تولید شده در حضور واکنشگر گریس مورد سنجش قرار می گیرد. بدام اندازی نیتریک اکساید در رقابت با اکسیژن موجب کاهش تولید یون نیتريت خواهد شد. به این منظور سدیم نیترو پروساید (10 میلی مولار) در بافر سالین فسفات با غلظت های مختلفی از عصاره مجاور شد. مجموعه به مدت 150 دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. همان مخلوط واکنش بدون عصاره (اما مقادیر هم حجم آب مقطر) به عنوان بلانک به کار گرفته شد. بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون، 0/5 میلی لیتر واکنشگر گریس (شامل: سولفانیل آمید 1 درصد، نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدرو کلرید

اضافه شد. جذب نمونه ها پس از 2 ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراءبنفش در 760 نانومتر اندازه گیری شد. نتایج به صورت مقادیر هم ارز با استاندارد اسید گالیک بیان شد. آزمایشات برای هر عصاره و استاندارد 2 بار تکرار شد (26،25). میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره از طریق روش های رنگ سنجی ارزیابی شد. غلظت 1 mg/ml از هر عصاره تهیه شد. 0/5 میلی لیتر از نمونه در 1/5 میلی لیتر متانول حل شد. سپس 0/1 میلی لیتر آلومینیوم کلراید 10 درصد به آن اضافه شد، سپس 0/1 میلی لیتر از محلول پتاسیم استات 1 مولار و در نهایت 2/8 میلی لیتر آب مقطر هم به آن اضافه شد و به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج 415 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی - ماوراءبنفش اندازه گیری شد. کوثرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید به صورت میلی گرم معادل کوثرستین در گرم عصاره گزارش گردید. آزمایشات 2 بار تکرار شد و میانگین آن ها گزارش شد (26،25).

ارزیابی میزان توانایی به دام اندازی رادیکال DPPH

برای انجام این آزمایش از رادیکال های پایدار DPPH استفاده شد. به 1 میلی لیتر از عصاره 1 میلی لیتر محلول 0/1 میلی مولار DPPH اضافه شد و مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و به مدت 15 دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد. سپس جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV در 517 نانومتر با بلانک متانول قرائت شد. ویتامین ث و BHA به عنوان استاندارد استفاده شدند و میزان IC₅₀ برای عصاره ها تعیین شد. در نهایت درصد بدام اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$\left(\frac{A_B - A_S}{A_B} \right) \times 100$$

A_B = جذب بلانک، A_S = جذب نمونه یا استاندارد (26،25).

یافته ها

بازده عصاره ها

پس از انجام فرآیند عصاره گیری وزن عصاره ها محاسبه شد. در مجموع با افزایش قطبیت حلال، راندمان عصاره گیری افزایش یافت. راندمان عصاره گیری با کمک سوکسله به طور معنی داری از سایر روش ها بالاتر بود.

سنجش محتوای تام فنل و فلاونوئیدی

جدول شماره 1، محتوای تام فنولی و تام فلاونوئیدی موجود در عصاره های اندام هوایی و ریشه فرولا پرسیکا را که با روش ماسیراسیون با حلال های مختلف (بر اساس افزایش قطبیت) به شکل متوالی استخراج شده اند، نشان می دهد.

جدول شماره 1: محتوای تام فنولی و تام فلاونوئیدی موجود در عصاره های اندام هوایی و ریشه فرولا پرسیکا در روش ماسیراسیون با حلال ها به شکل متوالی

نوع حلال	ریشه		اندام هوایی	
	محتوای فنل a	محتوای فلاونوئیدی b	محتوای فنل a	محتوای فلاونوئیدی b
n-هگزان	1236	425	1283	2000****
اتیل استات	2256****	517****	1948****	2608****
n-پروپانول	1456****	508****	4105****	3246****
متانول	1390****	406	1525****	1404

a: میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره، b: میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره $P < 0/0001$ و **** ns: not significant

حلال های اتیل استات و n-پروپانول حلال های خوبی برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از این گیاه بودند. در مجموع از ریشه و اندام هوایی گیاه، 633/6 و 877/1 میلی گرم ترکیبات فنلی معادل گالیک اسید در گرم عصاره جدا شد. ترکیبات فلاونوئیدی در ریشه و اندام هوایی 185/6 و 925/8 میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره به دست آمد. در مجموع محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی در اندام هوایی به مراتب بیش تر از ریشه گیاه بود. جدول شماره 2 محتوای تام فنولی و تام فلاونوئیدی موجود در عصاره های اندام هوایی و ریشه فرولا را که با کمک روش های مختلف استخراج با حلال متانول خالص استخراج شده اند، نشان می دهد.

0/1 درصد در اسید فسفریک 2درصد) اضافه شد. جذب مخلوط در 546 نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. آزمایشات 3 بار تکرار شده و میانگین آن ها گزارش شد. کوئرستین به عنوان استاندارد برای مقایسه بکار گرفته شد. میانگین درصد بدام اندازی هم طبق فرمول زیر محاسبه و بر اساس آن IC_{50} برای تمامی عصاره ها بیان شد.

$$\left(\frac{A_B - A_S}{A_B} \right) \times 100$$

A_B = جذب بلانک، A_S = جذب نمونه یا استاندارد (26، 25).

تهیه عصاره به روش ماسیراسیون (خیساندن) با حلال ها به شکل متوالی

در این روش 100 گرم از پودر اندام هوایی گیاه با 150 میلی لیتر n-هگزان مخلوط شد. مجموعه به مدت 24 ساعت رها گردید. روز بعد فاز آلی جدا و مجدداً n-هگزان جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار شد. هر بار n-هگزان خارج شده و به همراه حلال های قبلی حذف شدند. به باقیمانده استخراج از این مرحله، 150 میلی لیتر اتیل استات اضافه شد. مراحل کار با این حلال نیز تکرار شد. پس از خارج کردن اتیل استات به باقیمانده، 150 میلی لیتر n-پروپانول افزوده شد. مراحل کار با این حلال نیز تکرار شد. پس از خارج کردن n-پروپانول، 150 میلی لیتر متانول افزوده شد. مراحل کار با این حلال نیز تکرار شد. کل این روند با پودر ریشه گیاه نیز تکرار شد (28، 27).

آنالیز آماری

تمامی اندازه گیری ها 2 تا 3 بار تکرار شده و کلیه اطلاعات به صورت $Mean \pm SD$ گزارش شد. آنالیز واریانس یک سویه (ANOVA) و متعاقب آن post test توکی برای مقایسه میانگین ها به کار رفت. نتایج با احتمال $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

جدول شماره 2: محتوای تام فنولی و تام فلاونوئیدی موجود در عصاره های اندام هوایی و ریشه فرولا در روش های مختلف استخراج با حلال متانول

روش استخراج	ریشه	اندام هوایی	
		محتوای فنولی a	محتوای فلاونوئیدی b
روش سوکسله	500	231/5****	53/5
روش اولتراسونیک	48/5	212/5*	89/9****
روش ماسیراسیون	590****	210/5	87/5****

a: میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره، b: میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره ****P < 0/0001 و ns: not significant

روش خیساندن روش مناسب تر برای استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از ریشه گیاه بود. اما در خصوص اندام هوایی برای استخراج ترکیبات فنولی روش سوکسله و برای استخراج فلاونوئیدها روش التراسونیک مناسب تر هستند.

ارزیابی توانایی بدام اندازی رادیکال آزاد DPPH

جدول شماره 3، تاثیر روش استخراج را بر درصد بدام اندازی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره های مختلف فرولا پرسیکا را در غلظت های مختلف با حلال متانول را نشان می دهد.

در جدول شماره 4 تاثیر نوع حلال (بر اساس افزایش قطبیت) بر درصد بدام اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره های مختلف فرولا پرسیکا آورده شده است. در سنجش فعالیت بدام اندازی رادیکال آزاد DPPH، از ماده BHA بعنوان کنترل مثبت استفاده شد. با توجه به نتایج، IC₅₀ برای BHA 53/9 میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد.

جدول شماره 3: تاثیر روش استخراج بر میزان بدام اندازی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره های فرولا (حلال متانول)

(µg/ml) IC ₅₀	غلظت (µg/ml)					بخش گیاه	روش استخراج
	800	400	200	100	50		
439/6 ± 13 *	69/3	57/6	40/3	22/4	15/2	ریشه	روش سوکسله
279/3 ± 9/0 ****	78/3	74/7	57/8	33/9	15/5	اندام هوایی	روش اولتراسونیک
424/6 ± 17***	77/9	73/1	28/9	16/9	2/0	ریشه	روش اولتراسونیک
411/2 ± 16****	74/4	49/8	25/9	14/8	9/4	اندام هوایی	روش اولتراسونیک
366/9 ± 8/0****	77/5	72/4	36/9	21/4	16/2	ریشه	روش ماسیراسیون
466/0 ± 21	73/6	60/3	23/5	14/4	5/8	اندام هوایی	روش ماسیراسیون

تمامی نتایج به شکل درصد مهار بیان شده اند. ****P < 0/0001، ***P < 0/0009 و *P = 0/026

ارزیابی قدرت احیا کنندگی

جدول شماره 5، تاثیر روش استخراج را بر قدرت احیا کنندگی توسط عصاره های مختلف فرولا پرسیکا در غلظت های مختلف با حلال متانول را نشان می دهد.

در جدول شماره 6، تاثیر نوع حلال (بر اساس افزایش قطبیت) بر میزان قدرت احیا کنندگی توسط عصاره های مختلف فرولا پرسیکا آورده شده است.

در مجموع عصاره ها قدرت احیا کنندگی خوبی از خود نشان ندادند. عصاره متانولی اندام هوایی فرولا بهترین فعالیت را از خود نشان داد.

ارزیابی توانایی بدام اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید نمودار شماره 1 تاثیر روش استخراج را بر قدرت بدام اندازی نیتریک اکساید توسط عصاره های مختلف فرولا پرسیکا در غلظت های مختلف با حلال متانول را نشان می دهد. عصاره ها فعالیت بالایی از خود نشان ندادند. میزان IC₅₀ در تست بدام اندازی رادیکال نیتریک اکساید برای عصاره گیری به روش اولتراسونیک اندام هوایی 159/7 و برای عصاره به روش سوکسله برای اندام هوایی 388/9 میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد (P < 0/0001).

در جدول شماره 7 تاثیر نوع حلال (بر اساس افزایش قطبیت) بر میزان بدام اندازی رادیکال نیتریک اکساید توسط عصاره های مختلف فرولا پرسیکا آورده شده است.

جدول شماره 4: تاثیر نوع حلال بر درصد بدام اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره های فرولا پرسیکا

نوع حلال	بخش گیاه	غلظت (µg/ml)				
		800	400	200	100	50
n-هگزان	ریشه	25/7	21/6	16/4	15/8	13/8
	اندام هوایی	54/0	47/9	38/7	18/2	6/1
اتیل استات	ریشه ^a	73/9	62/0	38/2	30/7	17/7
	اندام هوایی	50/2	46/9	40/3	33/8	30/1
n-پروپانول	ریشه	58/8	46/4	39/7	25/5	19/4
	اندام هوایی	60/5	33/9	28/0	18/8	16/2
متانول	ریشه	59/8	41/9	40/6	16/2	14/9
	اندام هوایی ^{b**}	86/9	53/6	40/5	37/9	24/0

تمامی نتایج به شکل درصد مهار بیان شده اند.

$^{b**} IC_{50} = 352/5 \pm 7/5$ و $^{a} IC_{50} = 385/9 \pm 14$ و $^{**} p = 0/0012$

جدول شماره 5: تاثیر روش استخراج بر میزان قدرت احیا کنندگی عصاره های ریشه و اندام هوایی فرولا

روش استخراج	بخش گیاه	غلظت (µg/ml)				
		800	400	200	100	50
روش سوکسل	ریشه	1/002**	0/796*	0/481	0/232	0/604
	اندام هوایی	0/884*	0/657*	0/397	0/284	0/169
روش اولتراسونیک	ریشه	1/083**	0/746**	0/475	0/365	0/646
	اندام هوایی	0/603	0/483	0/311	0/230	0/184
روش ماسیراسیون	ریشه	0/727**	0/580**	0/432	0/352	0/264
	اندام هوایی	0/723**	0/488**	0/350	0/288	0/172

تمامی نتایج به شکل میزان جذب بیان شده اند.

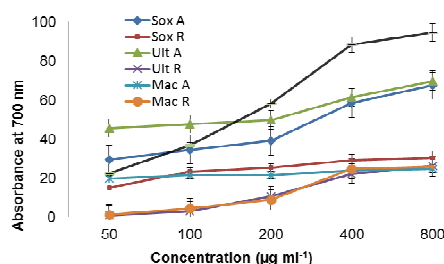
$^{**} p = 0/0044$ و $^{*} p < 0/0490$ و ns: not significant

جدول شماره 6: میزان قدرت احیا کنندگی عصاره های ریشه و اندام هوایی فرولا پرسیکا در روش ماسیراسیون با حلال های مختلف به شکل متوالی

نوع حلال	بخش گیاه	غلظت (µg/ml)				
		800	400	200	100	50
n-هگزان	ریشه	0/383**	0/172**	0/077	0/043	0/042
	اندام هوایی	0/447*	0/393**	0/300	0/269	0/250
اتیل استات	ریشه	0/147	0/122	0/081	0/058	0/044
	اندام هوایی	0/553**	0/466*	0/454	0/390	0/286
n-پروپانول	ریشه	0/687**	0/325**	0/159	0/073	0/044
	اندام هوایی	0/563**	0/445*	0/346	0/261	0/247
متانول	ریشه	0/225**	0/164**	0/114	0/073	0/064
	اندام هوایی	0/698****	0/660****	0/456	0/427	0/395

تمامی نتایج به شکل میزان جذب بیان شده اند.

$^{****} p < 0/0001$ و $^{**} p = 0/001$ و $^{*} p < 0/05$ و ns: not significant



نمودار شماره 1: تاثیر روش استخراج بر میزان بدام اندازی نیتریک اکساید (درصد) عصاره های ریشه و اندام هوایی فرولا پرسیکا

جدول شماره 7: میزان بدام اندازی رادیکال نیتریک اکساید (درصد) توسط عصاره های ریشه و اندام هوایی فرولا پرسیکا در روش استخراج با حلال ها به شکل متوالی

نوع حلال	بخش گیاه	غلظت (µg/ml)				
		800	400	200	100	50
n-هگزان	ریشه	42/8***	34/3	30/5	25/3	19/8
	اندام هوایی	35/9**	30/0	2	0	0
اتیل استات	ریشه	41/4****	31/4	25/3	17/6	0
	اندام هوایی	69/5****	0	30/1	26/2	23/8
n-پروپانول	ریشه	42/0****	39/4	26/5	14/9	0
	اندام هوایی	32/9	24/0	21/8	18/7	14/1
متانول	ریشه	23/5**	23/4	23/5	19/4	2/0
	اندام هوایی	53/9****	44/4	42/8	24/1	23/5

عصاره ها فعالیت بالایی از خود نشان ندادند. میزان IC_{50} در تست بدام اندازی رادیکال نیتریک اکساید برای عصاره اتیل استات اندام هوایی 441/2 میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد که به طور معنی داری از تمامی عصاره ها قوی تر بود ($P < 0/0001$). در سنجش قدرت مهار کنندگی رادیکال نیتریک اکساید، از کوئرستین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. میزان IC_{50} برای استاندارد کوئرستین 194 میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد.

بحث

بالا ترین راندمان عصاره گیری در روش ماسیراسیون با حلال ها به شکل متوالی به متانول تعلق داشت. این نشان می دهد که بخش قابل توجهی از ترکیبات موجود در این گیاه قطبی می باشند. استخراج با روش های مختلف نیز راندمان های متفاوتی بدست داد. عصاره سوکسله اندام هوایی با 34/5 درصد و عصاره التراسونیک ریشه با 4/1 درصد به ترتیب بالاترین و پایین ترین راندمان استخراج را به خود اختصاص دادند. نظر به تکرار مجدد عمل استخراج (هر بار با حلال تازه) در روش سوکسله، بدست آمدن راندمان بالاتر استخراج منطقی به نظر می رسد. در مقایسه روش های مختلف استخراج، در بخش ریشه، استخراج به روش خیساندن با 59 و با کمک التراسونیک با 49/5 میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره به ترتیب بالاترین و پایین ترین مقدار ترکیبات پلی فنولی را دارا بودند. در

اندام هوایی روش سوکسله با 231/5 و روش خیساندن با 210/5 میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره به ترتیب بالاترین و پایین ترین مقدار ترکیبات پلی فنولی را دارا بودند. در استخراج به روش ماسیراسیون با حلال ها به شکل متوالی در ریشه اتیل استات و n-بوتانول و در اندام هوایی n-بوتانول و اتیل استات بالاترین میزان ترکیبات پلی فنولی را داشتند. محتوای فلاونوئیدی در ریشه و اندام هوایی نیز به همان ترتیب بالا بود. در مجموع محتوای فنلی در روش متوالی در ریشه 633/6 میلی گرم و در اندام هوایی 877/1 معادل گالیک اسید در گرم عصاره به دست آمد. در مجموع اتیل استات و n-بوتانول حلال های مناسبی برای جداسازی ترکیبات پلی فنولی هستند. در مقایسه روش های مختلف استخراج در ریشه، عصاره حاصل از روش خیساندن با 66 و روش سوکسله با 51/4 میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره به ترتیب بالاترین و پایین ترین مقدار فلاونوئید تام را دارا بودند. در اندام هوایی روش التراسونیک با 88/9 و روش سوکسله با 53/5 میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره به ترتیب بالاترین و پایین ترین مقدار فلاونوئید تام را دارا بودند. در واقع استخراج با کمک سوکسله کم ترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی را از گیاه استخراج نمود.

گیاهان در درمان و پیشگیری اختلالات گوناگون بکار می روند. فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان را می توان عمدتاً به حضور ترکیبات فنولی در آن نسبت داد. این ترکیبات تقریباً در تمام بخش های گیاه وجود دارند و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک مانند رشد سلولی و رسیدن میوه نقش دارند. خاصیت آنتی اکسیدانی به آن ها امکان بدام انداختن رادیکال آزاد را می دهد (29). روند استخراج ترکیبات فنولی یک فاکتور مهم در تعیین خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره است. دما، حلال، زمان عصاره گیری، قدرت استخراج و روش استخراج تاثیر بارزی در محتویات عصاره خواهد گذاشت. استخراج ترکیبات از گیاه، بوسیله روش های استخراج

قدیمی مانند ماسیراسیون در واقع هدر دادن حلال و زمان است. تکنیک های پیشرفته استخراج مانند عصاره گیری به کمک اولتراسوند از طریق افزایش کارایی و انتخابیت، موجب غلبه بر دشواری های روش قدیمی شده است (27). استخراج به کمک اولتراسوند یک روش ساده بوده و جایگزین مناسبی برای روش های سنتی استخراج است. فواید اصلی استفاده از اولتراسوند در استخراج شامل افزایش بازده استخراج و سرعت استخراج است. اولتراسوند امکان استخراج ترکیبات حساس به حرارت را فراهم سازد (30).

در یک مطالعه، به منظور عصاره گیری از گیاه *Mesembryanthemum edule*، از روش استخراج اولتراسونیک استفاده شد. نتایج نشان داد که نوع حلال نسبت به زمان عصاره گیری تاثیر بارزتری روی محتوای فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی دارد. عصاره متانولی حاوی مقدار بیش تری ترکیبات پلی فنولی نسبت به عصاره اتانولی بود اما عصاره اتانولی فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به عصاره متانولی داشت (29). نتایج یک مقاله پژوهشی نشان داد که عصاره گل آذین گیاه زولنگ دارای محتوای تام فنولی 58/8، 60/1 و 105/5 میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره به ترتیب برای سه روش استخراجی التراسونیک، خیساندن و سوکسله بود. مواد فنولی در عصاره حاصل از روش سوکسله نسبت به دو روش دیگر بیش تر بود (31).

فلاونوئید ها بطور گسترده در گیاهان وجود دارند. این ترکیبات مسئول ایجاد رنگ در گل ها و میوه ها هستند و به عنوان محصولات متابولیسم ثانویه، به علت فعالیت آنتی اکسیدانی در صنایع دارویی و غذایی مورد توجه هستند (27). مکانسیم عمل فلاونوئیدها بدام اندازی رادیکال آزاد و شلاته کردن یون ها می باشد (27). فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی به عنوان پیشگیری کننده در پیشرفت سرطان و بیماری های قلبی شناخته شدند.

عرضه روش های جدید استخراج ترکیبات فعال بیولوژیکی از گیاهان، بخصوص در صنایع دارویی

افزایش یافته است. دلیل این موضوع نیاز به روش ایده‌آل استخراج بوده که بتواند بیش‌ترین مقدار ترکیبات فعال بیولوژیک را در کوتاه‌ترین زمان ممکن با پایین‌ترین قیمت به‌دست آورد (30). گزارشات متعددی از بکارگیری روش استخراج با کمک التراسونیک در استخراج مواد مختلف از قبیل هسپریدین از پوست مرکبات، ایزوفلاون‌ها از ریشه *Radix puerariae*، پلی‌ساکاریدها از پوست میوه longan و ترکیبات فنولی از غلات در دست است (32). روش التراسونیک به‌طور قابل ملاحظه‌ای موجب افزایش کارایی استخراج، کاهش زمان و کاهش حجم حلال مصرفی شده است. در مطالعه‌ای اثرات روش‌های مختلف عصاره‌گیری روی محتوای تام فنولی و فلاونویدی گیاه *Lythrum salicaria* مورد بررسی قرار گرفت. عصاره‌های گیاه فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی نشان دادند. محتوای تام فنولی در عصاره اولتراسونیک بیش‌تر از عصاره ماسیراسیون بود اما محتوای تام فلاونویدی در عصاره ماسیراسیون بیش‌تر از عصاره اولتراسونیک بوده است. عصاره اولتراسونیک در تست‌های بدام اندازه‌ی رادیکال آزاد DPPH، نیتریک اکساید و H_2O_2 بهتر از عصاره ماسیراسیون بود (24).

در مطالعه‌ای دیگر، اثرات دو روش عصاره‌گیری بر روی محتوای تام فنولی و فلاونویدی گیاه *Crataegus pentagyna* مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی فراکسیون پلی‌فنولی و اولتراسونیک با چهار تست آنتی‌اکسیدانی مختلف به‌صورت برون‌تنی ارزیابی شدند. عصاره حاصل از روش اولتراسونیک در تست‌های DPPH، بدام اندازه‌ی هیدروژن پراکسید و شلات کردن Fe^{2+} بهتر از عصاره‌ی پلی‌فنل بود (5). مطالعه‌ای دیگر با هدف بررسی تاثیر روش‌های مختلف استخراج در فعالیت آنتی‌اکسیدانی، بر روی اندام‌های هوایی گیاه *Crocus caspius* انجام شد. روش‌های استخراج شامل اولتراسونیک، پرکولاسیون و فراکسیون پلی‌فنولی بود. عصاره اولتراسونیک دارای بیش‌ترین میزان فنول و فلاونوید بود، در تست DPPH و بدام

اندازه‌ی H_2O_2 هم قوی‌ترین عصاره گزارش شده است. عصاره خیساندن در تست قدرت احیاکنندگی قوی‌ترین عصاره بود (33).

در مطالعه دیگر از سه روش سوکسله، ماسیراسیون و اولتراسونیک برای عصاره‌گیری از گیاه *Laurus nobilis* استفاده شد. عصاره حاصل از سوکسله با بیش‌ترین محتوای فنولی و فلاونویدی، فعالیت بدام اندازه‌ی DPPH و نیتریک اکساید بهتری نسبت به عصاره‌های دیگر نشان داد. عصاره تهیه شده به روش ماسیراسیون فعالیت بدام اندازه‌ی H_2O_2 بهتری نشان داد. تفاوت قابل توجهی بین روش‌های مختلف استخراج در تست قدرت احیاکنندگی این گیاه وجود نداشت. نتایج اندازه‌گیری محتوای تام فنولی نشان داد که عصاره ناشی از سوکسله بالاتر از اولتراسونیک و ماسیراسیون می‌باشد (34). در مطالعه‌ای جهت عصاره‌گیری از برگ گیاه *Cucumis melo* از روش‌های سوکسله، اولتراسونیک و ماسیراسیون استفاده شد. عصاره سوکسله، ترکیبات فنولی بیش‌تری نسبت به عصاره‌های دیگر (به‌ترتیب التراسونیک و ماسیراسیون) داشت (35). در بدام اندازه‌ی رادیکال آزاد DPPH، عصاره ماسیراسیون، در بدام اندازه‌ی رادیکال آزاد نیتریک اکساید عصاره التراسونیک و در شلاته‌کنندگی آهن عصاره ناشی از سوکسله بهترین فعالیت را دارا بودند. این مقاله نشان داد که هر سه روش در استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان موثر بودند اما تفاوتی بین آن‌ها وجود نداشت (35).

در یک مطالعه گل آذین گیاه زولنگ با سه روش عصاره شده و سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها با یکدیگر مقایسه شده است (32). در عمده تست‌ها عصاره حاصل از روش سوکسله قوی‌ترین فعالیت را از خود نشان داد. گرچه اختلاف زیادی بین این عصاره و عصاره حاصل از روش التراسونیک وجود نداشت. این تحقیق نشان داد که روش‌های سوکسله و اولتراسوند در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوید موثرتر از روش کلاسیک خیساندن عمل می‌کنند و بنابراین روش ارجح در استخراج این ترکیبات فعال بیولوژیک در این گیاه می‌باشند (30).

مدل بدام اندازی رادیکال DPPH به طور گسترده برای ارزیابی توانایی بدام اندازی رادیکال آزاد در نمونه های مختلف مورد استفاده قرار می گیرد. در مطالعه حاضر، تغییر روش استخراج تاثیر قابل ملاحظه ای بر قدرت بدام اندازی رادیکال DPPH داشت. مقدار IC_{50} در روش سوکسله $11/3 \pm 0/3$ میکرو گرم در میلی لیتر به دست آمد که از نظر آماری با مقادیر دو روش دیگر متفاوت بود ($P < 0/05$). در برخی مطالعات قبلی ارتباط خطی خوبی بین فعالیت آنتی اکسیدانی و فنول تام در بسیاری از گیاهان گزارش شده است (36, 37). در مطالعه ما نیز عصاره با میزان بیش تر فنولی، فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری از خود نشان دادند. هر سه عصاره قوی تر از BHA بودند ($P < 0/001$) اما ویتامین ث از هر سه عصاره قوی تر بود ($P < 0/001$).

قدرت احیا کنندگی به عنوان شاخصی در تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاهان دارویی به کار می رود (27). سنجش احیا کنندگی نمونه، ناشی از احیا آهن III به آهن II با اهداء الکترون می باشد. روش استخراج تاثیر زیادی بر فعالیت احیا کنندگی عصاره های گیاه مورد داشت. عصاره حاصل از خیساندن بالاترین فعالیت را از خود نشان داد (27, 28). عصاره های حاصل از سوکسله، ماسیراسیون و اولتراسوند در خصوص زولنگ، در غلظت 25 تا 800 میکرو گرم در میلی لیتر قدرت احیا کنندگی ضعیفی از خود نشان دادند. در این تست عصاره های حاوی مقادیر بالاتر از ترکیبات فنولی دارای فعالیت احیا کنندگی بالاتری بودند. گرچه این اختلاف از نظر آماری قابل ملاحظه نبود ($P > 0/05$) (31). در مطالعه ما، در مجموع عصاره ها قدرت احیا کنندگی خوبی از خود نشان ندادند. عصاره های التراسونیک و سوکسله بخش ریشه به طور معنی داری قوی تر از سایر عصاره ها بودند. در بخش عصاره گیری با حلال های مختلف، بالاترین فعالیت مربوط به عصاره متانولی اندام هوایی بود که به مراتب قوی تر از سایر عصاره ها بود ($P < 0/0001$).

نیتریک اکساید در بسیاری از اعمال فیزیولوژیک از جمله تنظیم فشارخون، گشاد شدن عضلات صاف عروق و سیستم ایمنی نقش دارد. تولید بیش از حد این ذره می تواند ایجاد استرس اکسیداتیو کند که منجر به تخریب DNA، تغییر عملکرد پروتئین ها و پراکسیداسیون لیپیدها می شود. روش استخراج تاثیر زیادی بر فعالیت بدام اندازی رادیکال نیتریک اکساید حاصل از عصاره های گیاه مورد داشت (27, 28). عصاره حاصل از خیساندن بالاترین فعالیت را از خود نشان داد. در روش ماسیراسیون با حلال ها به شکل متوالی نیز عصاره های حاصل از حلال ها با قطبی نسبتا بالا، شامل متانول و n - بوتانول بالاترین فعالیت را در این تست از خود نشان دادند. میزان IC_{50} حاصل از سه روش سوکسله، ماسیراسیون و اولتراسوند برای بدام اندازی رادیکال نیتریک اکساید در گیاه زولنگ نشان داد که عصاره حاصل از روش ماسیراسیون دارای قدرت مهار کنندگی بیش تری نسبت به دو روش دیگر بود (32). در مطالعه ما، قدرت بدام اندازی رادیکال نیتریک اکساید عصاره ها ضعیف اما وابسته به دوز بود. میزان IC_{50} برای عصاره گیری به روش اولتراسونیک اندام هوایی 159,7 و برای عصاره به روش سوکسله برای اندام هوایی 388/9 میکرو گرم بر میلی لیتر محاسبه شد که از سایر عصاره ها قوی تر بودند ($p < 0/0001$) در بخش استخراج با حلال، عصاره اتیل استات اندام هوایی به طور معنی داری از تمامی عصاره ها قوی تر بود ($P < 0/0001$).

تاکنون ارتباط بین فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای تام فنل و فلاونوئیدی (37)، توانایی شلاته کنندگی آهن (38)، فعالیت آنتی همولیز (39)، قدرت بدام اندازی رادیکال نیتریک اکساید (40) و فاکتور محافظت از نور آفتاب (41) گزارش شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده روش استخراج تاثیر زیادی بر فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای تام فنولی دارد. حلال های اتیل استات و n - بوتانول حلال های مناسب تر برای استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از این گیاه بودند. در

سیاسگزاری

این مقاله، حاصل پایان نامه دوره دکترای حرفه‌ای خانم الهام مجیدایی در دانشکده داروسازی ساری می‌باشد. بدین وسیله از حمایت مالی حوزه معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر می‌گردد (کد طرح: 1172) (کد اخلاق: IR.MAZUMS..REC.1397.1172).

مجموع محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی در اندام هوایی به مراتب بیش‌تر از ریشه گیاه بود. روش خیساندن روش مناسب‌تر برای استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از ریشه گیاه بود. اما در خصوص اندام هوایی برای استخراج ترکیبات فنولی روش سوکسله و برای استخراج فلاونوئیدها روش التراسونیک مناسب‌تر هستند.

References

1. Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother* 2005; 59(7): 365-373 (Persian).
2. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74(1): 139-162.
3. Abdollahi M, Larijani B, Rahimi R, Salari P. Role of oxidative stress in osteoporosis. *Therapy* 2005; 2(5): 787-796 (Persian).
4. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75(2): 241-251.
5. Rabiei KH, Bekhradnia S, Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity of polyphenol and ultrasonic extracts from fruits of *Crataegus pentagyna* subsp. *elburensis*. *Nat Prod Res* 2012; 26(24): 2353-2357 (Persian).
6. Javidnia K, Miri R, Kamalinejad M, Edraki N. Chemical composition of *Ferula persica* Wild. Essential oil from Iran. *Flavour Fragrance J* 2005; 20(6): 605-606.
7. Iranshahi M, Mojarab M, Sadeghian H, Hanafi Bojd MY, Schneider B. Polar secondary metabolites of *Ferula persica* roots. *Phytochemistry* 2008; 69: 473-478.
8. Jadidi M, Vafaei AA, Miladi Gorgi H, Babaei Saeed Abady A. The effect of *Ferula persica* L extracts, (sakbinag) on symptoms of morphine withdrawal and sleeping time in mice. *Pajouhesh Dar Pezeshki* 2010; 34(4): 225-230 (Persian).
9. Sahebkar A, Iranshahi M. Biological activities of essential oils from the genus *Ferula* (Apiaceae). *Asian Biomed* 2010; 4(6): 835-847 (Persian).
10. Iranshahi M. A review of volatile sulfurcontaining compounds from terrestrial plants: Biosynthesis, distribution and analytical methods. *J Essent Oil Res* 2012; 24(4): 393-434 (Persian).
11. Iranshahi M, Noroozi S, Behravan J, Karimi G, Schneider B. Persicasulphide C, a new sulphurcontaining derivative from *Ferula persica*. *Nat Prod Res* 2009; 23: 1584-1588 (Persian).
12. Iranshahi M, Yazdi MC, Hassanzadeh Khayyat M, Sahebkar A. Sulfur containing compounds in the volatile oil of *Ferula latisecta* Rech. f. & Aell. Leaves. *J Essent Oil-Bearing Pl* 2009; 12(1): 64-68.
13. Iranshahi M, Mojarab M, Sadeghian H, Hanafi Bojd MY, Schneider B. Polar Secondary metabolites of *Ferula persica* roots. *Phytochemistry* 2007; 69(2): 473-478.

14. Ghanbari M, Zahedi Khorasani M, Vakili A, Aali Taherian A, Sameni H. Acute and chronic effects of aqueous *Ferula persica* extract on blood pressure of normotensive rats. *Koomesh* 2012; 14(1): 104-108 (Persian).
15. Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Eslami B, Dehpour AA. Antioxidant and antihaemolytic activities of *Ferula foetida* regel (Umbelliferae). *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011; 15(2): 157-164.
16. Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Eslami B. Antioxidant activity of flower, stem and leaf extracts of *Ferula gummosa* Boiss. *Grasas y Aceites* 2010; 61(3): 244-250 (Persian).
17. Dehpour AA, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM. Antioxidant activity of methanol extract of *Ferula assafoetida* and its Essential oil composition. *Grasas y Aceites* 2009; 60(4): 405-412 (Persian).
18. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Dehpour AA. Antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Ferula gummosa* Boiss roots. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011; 15(6): 658-664 (Persian).
19. Sattar Z, Iranshahi M. Phytochemistry and pharmacology of *Ferula persica* Boiss.: A review. *Iran J Basic Med Sci* 2017; 20(1): 1-8 (Persian).
20. Nasrollahi Nejad B, Bamzadeh Z, Hejazi SH. Antimicrobial Effects of *Ferula persica* Gum Extract and Gold Nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa*. *Avicenna J Clin Microb Infec* 2017; 4(1): e36646 (Persian).
21. Bagheri SM, Sahebkar A, Gohari AR, Saeidnia S, Malmir M, Iranshahi M. Evaluation of cytotoxicity and anticonvulsant activity of some Iranian medicinal *Ferula* species. *Pharm Biol* 2010; 48(3): 242-246 (Persian).
22. Shahverdi AR, Iranshahi M, Mirjani R, Jamalifar H, Amin G, Shafiee A. Bioassay-guided isolation and identification of an antibacterial compound from *Ferula persica* var. *persica* roots. *DARU J Pharm Sci* 2005; 13: 17-19 (Persian).
23. Ma YQ, Ye XQ, Hao YB, Xu GN, Xu GH, Liu DH. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrason Sonochem* 2008; 15(3): 227-232.
24. Jamshidi M, Shabani E, Hashemi Z, Ebrahimzadeh MA. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from leaf and aerial parts of *Lythrum salicaria* L. *Int Food Res J* 2014; 21(2): 783-788 (Persian).
25. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B, Ehsanifar S. Antioxidant activity of *Hyoscyamus squarrosus* fruits. *Pharmacologyonline* 2009; 2: 644-650 (Persian).
26. Khalili M, Ebrahimzadeh MA. A review on antioxidants and some of their common evaluation methods. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 24(120): 188-208 (Persian).
27. Mozdastan Sh, Ebrahimzadeh MA, Khalili M. Comparing the impact of different extraction methods on antioxidant activities of myrtle (*Myrtus communis* L.). *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 25(127): 10-24 (Persian).
28. Mozdastan Sh, Ebrahimzadeh MA, Eslami Sh. Effect of increasing the polarity of solvent on total phenol and flavonoid contents and antioxidant activity of Myrtle (*Myrtus communis* L.) *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 25(126): 68-81 (Persian).
29. Falleh H, Ksouri R, Lucchessi ME, Abdelly C, Magne C. Ultrasound-assisted extraction: effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant

- activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae shoots, *Tro J Pharm Res* 2012; 11(2): 243-249.
30. Wang L, Weller CL. Recent advance in extraction of nutaceuticals from Plants. *Trends Food Sci Technol* 2006; 17: 300-312.
31. Motallebi Riekandeh S, Mazandarani M, Ebrahimzadeh MA, Zargari M. Antioxidant activities of *Eryngium caucasicum* inflorescence. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; 20(5): 946-949 (Persian).
32. He Ch, Ji X, Pan Y, Wang H, Wang K, Liang M, Yang L. Antioxidant activity of alcoholic extract of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Med Chem Res* 2010; 19: 448-461.
33. Khalil M, Fathi H, Ebrahimzadeh M. Antioxidant activity of bulbs and aerial parts of *Crocus caspius*, Impact of extraction methods. *Pak J Pharm Sci* 2015; 29(3): 773-777.
34. Ebrahimzadeh MA, Hashemi Z, Jamshidi M. Evaluation of antioxidant activities of *Laurus nobilis* L.(Lauraceae) fruits, Impact of extraction methods. *world of sciences Journal* 2013; 5(2): 79-87.
35. Ebrahimzadeh MA, Askari M, Forouzani M. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from *Cucumis melo* L. fruit and leaves. *Int J Forest Soil Erosion* 2013; 3(3): 95-99.
36. Cai YZ, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 2004; 74(17): 2157-2184.
37. Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus specis peels and tissues. *Pak J Pharm Sci* 2009; 22(3): 277-281 (Persian).
38. Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Bekhradnia AR. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African J Biotech* 2008; 7(18): 3188-3192.
39. Khalili M, Ebrahimzadeh MA, Safdari Y. Antihaemolytic activity of thirty herbal extracts in mouse red blood cells. *Arh Hig Rada Toksikol* 2014; 65(4): 399-406.
40. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM, Pourmorad F. Nitric oxide radical scavenging potential of some Elburz medicinal plants. *Afr J Biotech*. 2010; 9(32): 5212-5217.
41. Ebrahimzadeh MA, Enayatifard R, Khalili M, Ghaffarloo M, Saeedi M, Charati JY. Correlation between sun protection factor and antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some medicinal plants. *Iranian J Pharm Res* 2014; 13(3): 1041-1047.