فصلنامه علوم محیطی، دوره بیست و یکم، شماره ۳، پائیز ۱۴۰۲

۸۸-۷۳

مقاله پژوهشی

ارزیابی روش‌های مختلف عصاره گیری بر ترکیبات آنتی اکسیدانی میوه های نسترن کوهی، ولیک سرخ و ولیک سیاه مازندران

مجتبی اسمعیل‌زاده، حسین مرادی* و فاطمه دواتگر

گروه علوم باغبانی و پژوهشکده فناوری های زیستی گیاهان دارویی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱/۲۰

اسمعیل‌زاده، م.، ح. مرادی و ف. دواتگر. ۱۴۰۲. ارزیابی روش‌های مختلف عصاره گیری بر ترکیبات آنتی اکسیدانی میوه های نسترن کوهی، ولیک سرخ و ولیک سیاه مازندران. فصلنامه علوم محیطی. ۲۱(۳): ۷۳-۸۸.

سابقه و هدف: رادیکال‌های آزاد با فساد مواد غذایی و آسیب به سلامت انسان، به‌عنوان ترکیباتی مضر و آسیب رسان به سلول های گیاهی و جانوری محسوب می شوند. فنل ها گروه وسیعی از ترکیبات هیدروکسیلی هستند که ترکیباتی نظیر فلاوونوئیدها و آنتوسیانین ها در آن قرار دارند. نسترن کوهی، ولیک سرخ و ولیک سیاه سه میوه دارویی با ترکیبات ارزشمندی نظیر پلی فنول ها، فلاوونوئیدها، ویتامین ها ، در شمال کشور بصورت خودرو دارای رشد رویشی و زایشی بسیار مطلوبی می باشند.

مواد و روش‌ها: جهت بررسی و تعیین بیشترین میزان استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی، روشهای مختلف عصاره گیری در این سه میوه مورد استفاده قرار گرفت. میوه های این گیاهان از منطقه نوا (°۳۵٫۸۵۴شمالی °۵۲٫۲۰۹شرقی، ارتفاع از سطح دریا۲۳۰۰متر) واقع در شهرستان آمل جمع آوری و پس از خشک کردن با چهار حلال آب، اتانول، هیدروالکل(آب و اتانول ۵۰:۵۰) و متانول عصاره گیری صورت گرفت. سپس مقادیر فنل، فلاوونوئید و درصدمهارادیکال آزادDPPH برای هرکدام از میوه ها و روش عصاره گیری اندازه گیری شد.

نتایج و بحث: نتایج این پژوهش نشان داد که روش های مختلف عصاره گیری میوه نسترن اختلاف معنی داری درسطح۱درصد($p<0.01$) برروی فنل و آنتی‌اکسیدان و درسطح پنج درصد ($p<0.05$) برروی فلاوونوئید می‌باشد. همچنین براساس مقایسه میانگین روش‌های عصاره گیری در میوه نسترن، استفاده از حلال هیدروالکل(آب و اتانول) باعث ایجاد اختلاف معنی داری نسبت به دیگر حلال ها بود و توانست بیشترین مقدار فنل کل در این گیاه را نشان دهد. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد روش‌های مختلف عصاره‌گیری در میوه ولیک سرخ (آب، هیدروالکی، اتانولی و متانولی) بر میزان فنل، فلاوونوئید و آنتی‌اکسیدان موثر بوده و در سطح ۱درصد معنی‌دار بودند. براساس جدول مقایسه میانگین روش‌های عصاره‌گیری در میوه ولیک سرخ، عصاره‌های بدست آمده از حلال هیدروالکل بیشترین عدد را در صفات فنل و

* Corresponding Author: *Email Address*. h.moradi@sanru.ac.ir
http://dx.doi.org/10.48308/envs.2023.1235
http://dorl.net/dor/20.1001.1.17351324.1402.21.3.3.3
Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

فلاوونوئید نشان داده و تیمار برتر بودند. روش‌های عصاره‌گیری در صفات فلاوونوئید و آنتی‌اکسیدان در سطح۱ درصد($p<0.01$) و بر فنل درسطح پنج درصد ($p<0.05$) در میوه ولیک سیاه معنی‌دار بود. همچنین براساس نتایج حاصل از جدول مقایسه میانگین روش‌های عصاره گیری در میوه ولیک سیاه حلال هیدروالکل بهترین حلال در استخراج ترکیبات فنلی نسبت به دیگر حلال‌ها بوده است.

نتیجه‌گیری: ترکیبات فنلی از سه میوه دارویی نسترن کوهی، ولیک سرخ و ولیک سیاه توسط حلال هیدروالکل نسبت به دیگر حلال‌ها یعنی آب، اتانول و متانول مطلوب‌تر بود. همچنین بیشترین مقدار فنل در بین سه میوه مورد آزمایش در میوه نسترن کوهی مشاهده گردید. در حالی که در ولیک سرخ هیدروالکل(آب و اتانول) و در ولیک سیاه متانول بیشترین فلاوونوئید اندازه گیری شده را شامل شدند. به طور کل و با توجه به اهمیت ترکیبات فنلی، جهت استخراج این نوع ترکیبات در این گیاهان، استفاده از حلال هیدروالکل پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: اتانولی، اکسایش‌گرهای‌آزاد، روش استخراج، گیاهان دارویی و متانولی.

مقدمه

اکسیداسیون نه تنها منجر به فساد مواد غذایی می‌گردد، بلکه به علت تولید رادیکال‌های آزاد سلامت انسان را به خطر می‌اندازد. این رادیکال‌ها پیش برنده واکنش‌های اکسیداسیونی در بدن است که موجب اکسیداسیون لیپید غشا سلولی می‌شود و ادامه این روند سبب ناپایداری غشا و آسیب به ترکیبات سلولی نظیر لیپیدها، پروتئین و به ویژه DNA آسیب می‌شود. که در نهایت امراضی همچون بیماری‌های قلبی عروقی، تصلب شرایین، سرطان و پیری را به همراه دارد (Kaur and Kapoor, 2001؛ Shukla *et al*. 2009؛Kulshreshtha *et al*. 2011). مواد چرب، با قرار گرفتن در معرض عوامل محیطی شامل هوا، نور و گرما دچار اکسیداسیون شده و به دنبال این تغییر نه‌تنها بو و طعم غذا تغییر می‌کند بلکه بد رنگ شدن ماده غذایی و در پایان فاسد شدن آن را نیز به دنبال دارد (Kamkar, 2009). ترکیبات فنلی گروه وسیعی از مواد طبیعی از جمله فلاونوئیدها، تانن ها و آنتوسیانین و... را تشکیل می‌دهند (Raghavendra *et al*. 2010). این ترکیبات به دلیل دارا بودن گروه هیدروکسیلی، قادر به جاروب کردن رادیکال‌های آزاد، کلات کنندگی فلزات، توانایی در تنظیم بیان ژن و نقش کوآنتی اکسیدانی، می‌باشند (Neergheen *et al*. 2007؛ Gulcin *et al*. 2002). این مواد را در سبزیجات، میوه‌ها، برگ‌ها، دانه‌ها، ریشه و دیگر قسمت‌های گیاهان می‌توان مشاهده کرد. با توجه به مفید بودن این ترکیبات، از آن‌ها در عرصه مواد غذایی، شیمی، داروسازی و پزشکی استفاده می‌شود و تاثیر مثبت زیستی از جمله خواص آنتی اکسیدانی دارند (Raghavendra *et al*. 2010). مواد غذایی طبیعی که سرشار از آنتی اکسیدان (ویتامین‌ها، ترکیبات فنولی) می‌باشند نقش بسزایی در جلوگیری از صدمات اکسیداتیو و همچنین پیشگیری از بیماری‌هایی نظیر سرطان، پارکینسون، آلزایمر دارند (Kim *et al*., 1995؛ Yen *et al*. 2011). متاسفانه پژوهش‌ها نشان می‌دهد که به‌کارگیری آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بر روی حیوانات موجب سرطان‌زایی و بیماری کبدی درآن‌ها می‌شود (Hwang *et al*. 2001). تحقیقات نشان می‌هد که استفاده از ترکیبات فنولی به علت خصوصیات بالای آنتی‌اکسیدانی و نقش مفید آن‌ها باعث شد که به کارگیری این ترکیبات به مقدار زیادی در مواد غذایی افزایش یافته است (Anagnostopoulou *et al*. 2006).

درجهان استفاده از گیاهان دارویی که از منابع طبیعی گران بها محسوب می‌شوند، برای ساخت مواد اولیه به منظور تولید داروهای بی ضرر برای بشر استفاده می‌کنند (Azimzadeh, 2009). ایران یکی از کشورهای جهان است که از نظر وجود گیاهان دارویی غنی و دارای شرایط زیستگاهی متنوعی برای اقسام مختلف گیاهان می‌باشد (Davari *et al*. 2018). بسیاری از این گونه‌های گیاهی خواص آنتی اکسیدانی شبیه به آنتی اکسیدان‌های سنتزی دارند که فاقد عوارض جانبی هستند (Roy *et al*,

2011). گونه نسترن وحشی با نام علمی (*Rosa canina* L.) گیاهی درخچه‌ای و چند ساله ازخانواده گل سرخ (Rosaceae) است (Omid Beigi, 2005).

رویشگاه نسترن وحشی در بخش‌های مختلف ایران از جمله شمال، شمال غرب، غرب، جنوب غرب، مرکز و شمال شرق ایران می‌باشد (khatamsaz, 1992). طول میوه‌های این گیاه ۱ تا ۲ سانتی متر، شامل فندقه‌های متعدد و قرمز رنگ می‌باشد که به وسیله یک تخمدان گوشتی احاطه می‌شود (Omid Beigi, 2005). میوه نسترن شامل ویتامین‌های مختلف (آ،ب و ث) می‌باشد و به دلیل وجود ترکیب‌های با ارزش نظیر پلی فنول‌ها، کارتنوئیدها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای چرب از ارزش دارویی بسیاری بهره مند است (Demir and Ozcan, 2011; Omid Beigi, 2005; Ercisli, 2007). در بیشتر فارماکوپه‌ها از میوه نسترن برای معالجه اختلالات آرتروز، نقرس، سیاتیک، روماتیسم، سرماخوردگی و درمان بیماری‌های عفونی همچون آنفولانزا، جلوگیری از التهاب مخاط معده و زخم معده و مفید برای زخم‌های پوستی ذکر شده است به دلیل ارزشمند بودن میوه نسترن از آن در تولید محصولات دارویی، دمنوش، مارمالارد، شربت و نوشابه استفاده می‌شود (Alizadeh *et al*. 2017).

از جمله گیاهان دارویی ارزشمند می‌توان به گیاه ولیک از خانواده گل سرخیان، که یکی از ارقام زالزالک است اشاره نمود و همچنین گونه‌های مختلف این میوه با توجه به رنگ سیاه ولیک و سرخ ولیک نامیده می‌شوند (Ishaq Lou Gulogahi *et al*. 2013). سیاه ولیک با نام علمی (*Crataegus elbursensis*) گیاهی درخچه‌ایی که از خانواده (Rosaceae) می‌باشد (Ozcan *et al*., 2005). ولیک سیاه از رایج ترین گونه ولیک می‌باشد که در جنگل‌های شمال پیدا می‌شود (Ishaq Lou Gulogahi *et al*., 2013). گیاه ولیک به عنوان یک منبع غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی به ویژه فلاونوئید و آنتوسیانین محسوب می‌شود که به دلیل مفید بودن این ترکیبات زیست فعال از این گیاه به عنوان دارو برای حفاظت قلبی عروقی، بهبود خون رسانی به ماهیچه‌ی قلب، افزایش جریان خون، کاهش دهنده فشارخون و کلسترول، آنتی اکسیدان و مهار کننده رادیکال آزاد، کاهش مشکلات گوارشی، اختلالات عصبی همچنین دارای خواص ضد میکروبی در برابر باکتری‌ها و ضد ویرس می‌باشد (Liu *et al*., 2010; Cui *et al*,. 2011).

ولیک سرخ گیاهی درخچه‌ای با نام علمی (*Crataegus monogyna*) از خانواده (Rosaceae) است. میوه ولیک از عواملی که باعث بروز بیماری‌های قلبی عروقی می‌شود نظیر فشار خون بالا، هیپرکلسترولمی و هیپرلیپیدمی را کاهش می‌دهد (Chang *et al*. 2005؛ Salehi *et al*. 2009). عصاره سرخ ولیک شامل ترکیبات زیست فعالی همچون اپیکاتچین، هایپروسید، کورستین، وایتکسین، کومارین و کلروژنیک می‌باشد که از نظر آنتی‌اکسیدانی بسیار جائز اهمیت است (Bahorun *et al*. 2003؛ Barros *et al*. 1991). از آنجایی که گیاهان دارویی شامل مواد موثره گسترده‌ای می‌باشند که اغلب این ترکیبات نقش مهمی در فعالیت زیستی دارند و به همین علت روش استخراج مواد ثانویه از گیاهان بسیار مهم است و باید مورد ارزیابی قرار گیرد (Castro and Garcıa-Ayuso, 1998). پژوهش‌های زیادی بر روی عصاره‌گیری گیاهان صورت گرفته است تا نمونه‌هایی با خاصیت آنتی اکسیدانی بالا را شناسایی کنند که در این تحقیقات روش‌های متفاوتی جهت استخراج مواد آنتی اکسیدانی گیاهان با استفاده از حلال‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است، که هر کدام از این متدها در ارزیابی با روش‌های دیگر دارای مزایا و معایبی هستند (Ma *et al*. 2008؛ Fazeli Nasab *et al*. 2019) تحقیقات نشان می‌دهد که بالابودن ترکیبات فنلی، دلیل عمده بالابودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی بعضی از عصاره ازجمله عصاره های قطبی می باشد (Bahramikia *et al*. 2008). جهت استخراج مواد موثره از گیاهان دارویی، از حلال‌های مختلفی استفاده می‌شود که هر کدام دارای

محاسن و معایبی هستند و چون ماده موثره تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله نوع گیاه دارویی، شرایط رویش، نوع حلال، روش استخراج، مرحله رشدی گیاه و غیره دارد (Rashedi *et al.*, 2015). نتایج پژوهشی نشان داد که عصاره اتیل استاتی گیاه *Menthe spicata* بیشترین مقدار ترکیبات فنلی و آنتی- اکسیدانی را نسبت به عصاره آبی کلروفرم و هگزانی دارد (Conforti *et al.* 2008). خاصیت ضدباکتری اسانس و عصاره های آبی و متانولی گیاه *Achillea sintenisii* برروی ۱۲ گونه باکتری و۲ مخمر به صورت مقایسه ای مورد بررسی قرار گرفت و به این نتیجه رسیدند که عصاره آبی هیچ گونه فعالیت ضد میکروبی نداشته در حالی‌که عصاره متانولی و اسانس این گیاه فعالیت ضدمیکروبی قابل قبولی داشتند که اهمیت عصاره های مختلف در این تحقیق مشخص می‌شود (Sokmen *et al.* 2004). Alothman *et al.* (2009) تفاوت بسیاری در استخراج ترکیبات فنلی با حلال های مختلف مشاهده کردند. آنها اظهارداشتند که حلال های قطبی توانایی بالاتری نسبت به دیگرحلال ها دارند. پژوهشگران طی پژوهش صورت گرفته نشان دادند جهت استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان های قطبی استفاده از حلال آب – استون نسبت به سایر حلال ها کارآمدتر است (Sun *et al.*, 2002؛ Luximon-Ramma *et al.*, 2003).

با توجه به مطالب فوق هدف از اجرای این پژوهش معرفی بهترین حلال برای استخراج، عصاره گیری و اندازه گیری فعالیت ترکیبات آنتی اکسیدانی در سه گیاه نسترن کوهی، ولیک سیاه و ولیک سرخ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی (میوه‌های رسیده) در سال ۱۳۹۹ از منطقه نوا شهرستان آمل با مشخصات جغرافیایی(°۳۵٫۸۵۴شمالی °۵۲٫۲۰۹شرقی، ارتفاع از سطح دریا۲۳۰۰متر) جمع آوری و به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل شدند. نمونه ها پس از تمیز کردن و شستشو به آون با دمای ۴۰درجه سانتی گراد منتقل شدند تا میزان رطوبت ان ها به حدود۱۰ درصد برسد. سپس نمونه ها با آسیاب پودر شده و جهت عصاره گیری آماده شدند. جهت عصاره گیری میزان ۲گرم از بافت پودر شده را به ۲۰میلی‌لیتراز حلال های مورد آزمایش اضافه کرده و به مدت۷۲ساعت برروی دستگاه شیکر(چرخاننده) قرار دادیم. سپس نمونه ها به مدت۳۰ دقیقه التراسونیک شده و درنهایت به مدت۱۰ دقیقه با۶۰۰۰ دوربردقیقه سانتریفیوژ صورت گرفت. از عصاره بالایی جهت اندازه گیری فنل، فلاوونوئید و آنتی اکسیدان استفاده شد. حلال های مورد استفاده جهت عصاره گیری به شرح زیر می‌باشد:

۱-عصاره آبی(آب مقطر)

۲-عصاره اتانولی(اتانول مطلق)

۳-عصاره هیدروالکلی(آب مقطر و اتانول مطلق ۵۰:۵۰)

۴-عصاره متانولی(متانول خالص)

ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد

جهت اندازه گیری آنتی‌اکسیدان، یک میلی‌لیتر از عصاره با یک میلی لیتر ازمحلول رادیکال DPPH۱۰میکرومولار به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شده و سپس در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت صورت گرفت. درصد مهارراديکال آزاد ازطریق فرمول زیر محاسبه گردید(Ebrahimzadeh *et al.*, 2009).

$$\%IP= (A\ control- A\ sample / A\ control) *100 \quad (1)$$

IP درصد مهار رادیکالهای آزاد (درصد بازداری آنتی اکسیدان در برابر رادیکال های آزاد)

A control: جذب شاهد (که حاوی یک میلی‌لیتر از متانول در یک میلی‌لیتر DPPH است)

A Sample: جذب نمونه (که حاوی حجم های مختلفی از عصاره گیاه(آنتی اکسیدان)، متانول و محلولDPPH است.

استخراج و اندازه گیری فنل کل

طبق روش اسلینکارد و سینگلتون محتوی تام فنولیک با استفاده از معرف فولین -سیوکالتیو اندازه گیری شد. ابتدا به ۲۰ میکرولیتر از عصاره گیاهان ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین

– سیو کالتیو افزوده شد سپس ۱/۶ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده و پنج دقیقه استراحت به مخلوط مورد نظر می-دهیم در ادامه ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم یک مولار اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۴۰ درجه قرار می‌دهیم. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد، و میزان تام فنولیک بر اساس میزان معادل میلی گرم اسید گالیک درگرم عصاره گزارش گردید(Slinkard and singleton, 1977).

استخراج و اندازه گیری فلاونوئید

محتوای تام فلاونوئیدی با استفاده از معرف کلرید آلومینیم اندازه گیری شد . به نیم میلی لیتر از عصاره، ۱/۵ میلی لیترمتانول، ۰/۱میلی لیتر از محلول آلومینیم کلراید۱۰ درصد در اتانول، ۰/۱ میلی لیتر از محلول استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط نیم ساعت بعداز نگهداری در تاریکی، در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل بلانک ثبت شد میزان فلاونوئید بر اساس میزان معادل میلی‌گرم کوئرستین درگرم عصاره گزارش گردید (Chang *et al*. 2002).

این پژوهش با سه تکرار و به صورت طرح کاملا تصادفی ساده اجرا شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS ۹.۴ و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد انجام شد.

جدول۱- تجزیه واریانس روش های مختلف عصاره گیری میوه نسترن

Table 1. Variance analysis of different extraction methods of nasturtium fruit

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	فنل Phenol	فلاونوئید Flavonoid	آنتی اکسیدان Antioxidant
روش عصاره گیری Extraction method	3	1.95**	0.018*	3557.49**
خطا Error	8	0.0342	0.0003	1.3687
ضریب تغییرات Coefficient of variation	-	11.94	14.00	1.61

**،*وns به ترتیب معنی داری درسطح۱و۵درصد و عدم معنی داری

ns **, and *, respectively, nonsignificant and significant at 1 and 5% probability levels.

نتایج و بحث

طبق نتایج حاصل از تجزیه واریانس روش های مختلف عصاره گیری میوه نسترن(جدول۱) اختلاف معنی داری درسطح یک درصد($p<0.01$) برروی فنل و آنتی‌اکسیدان و درسطح پنج درصد($p<0.05$) برروی فلاوونوئید نشان داد. همچنین براساس مقایسه میانگین روش های عصاره گیری در میوه نسترن(جدول۲)، استفاده از حلال هیدروالکل(آب و اتانول) باعث ایجاد اختلاف معنی داری نسبت به دیگر حلال ها بود و توانست بیشترین مقدار فنل کل در این گیاه را نشان دهد. همچنین حلال‌های هیدروالکل، اتانولی و متانولی با هم در صفت فلاوونوئید اختلافی نشان ندادند، اما با حلال آب(آب مقطر خالص) اختلاف داشتند. براین اساس به نظر میرسد که استخراج ترکیبات فلاوونوئیدی به الکل‌ها وابسته بوده و استفاده از الکل‌ها می‌تواند حداکثر ترکیبات فلاوونوئیدی را نسبت به حلال آب استخراج کند. همچنین حلال اتانولی توانست بیشترین میزان درصد رادیکال‌آزادDPPH را نسبت به دیگر حلال ها نمایان کند. میزان مهار رادیکال آزادDPPH در اتانول حدود۴ برابر حلال آب بوده است(به ترتیب ۹۹/۱۶ و ۲۴/۸۲). براساس این نتایج جهت استخراج و بررسی میزان مهار رادیکال آزادDPPH پیشنهاد می‌شود که از حلال اتانول استفاده کرد. همچنین حلال های متانول و هیدروالکل بعد از اتانول بیشترین خاصیت مهار رادیکال آزاد را دارا می‌باشند.

جدول ۲- مقایسه میانگین روش های عصاره گیری در میوه نسترن
Table 2. Comparison of average extracting methods in nestling fruit

آنتی اکسیدان Antioxidant	فلاونوئید Flavonoid	فنل Phenol	تیمار Treatment
			روش عصاره گیری Extraction method
24.82d	0.09b	1.85b	آب Water
70.0c	0.14a	2.48a	هیدرو الکلی Hydroalcoholic
99.16a	0.13a	0.59d	اتانولی Ethanol
96.30b	0.16a	1.25c	متانولی Methanol

حروف غیرمشابه نشان دهنده معنی داری میانگین است

Non-common letters mean a significant difference at the level of one percent

طبق نتایج بدست آمده از جدول تجزیه واریانس اثرروش های مختلف عصاره گیری میوه ولیک سرخ(جدول.۳) تمامی روش های عصاره گیری(آب، هیدروالکی، اتانولی و متانولی) بر میزان فنل، فلاوونوئید و آنتی‌اکسیدان موثر بوده و در سطح یک درصد معنی دار بودند. براساس جدول مقایسه میانگین روش های عصاره گیری در میوه ولیک سرخ(جدول۴)، عصاره های بدست آمده از حلال هیدروالکل بیشترین عدد را در صفات فنل و فلاوونوئید نشان داده و تیمار برتر بودند. با توجه به این نتیجه مشخص میشود ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی از طریق هیدروالکل راحت تر استخراج شده و باعث افزایش میزان این ترکیبات با حلال هیدروالکلی می‌شود. منتهی حلال هیدروالکل در مهارراديکال‌های آزاد DPPH نسبت به دیگر حلال ها اثر کم‌تری داشته‌است.

جدول۳- تجزیه واریانس اثرروش های مختلف عصاره گیری میوه ولیک سرخ
Table 3. Variance analysis of the effects of different methods of extracting the fruit of the red valik

آنتی اکسیدان Antioxidant	فلاونوئید Flavonoid	فنل Phenol	درجه آزادی df	منابع تغییرات S.O.V
536.92**	0.009**	0.60**	3	روش عصاره گیری Extraction method
49.5442	0.0000	0.0038	8	خطا Error
8.76	8.59	6.10	-	ضریب تغییرات Coefficient of variation

**،*و^{ns} به ترتیب معنی داری درسطح۱و۵درصد و عدم معنی داری

ns **, and *, respectively, nonsignificant and significant at 1 and 5% probability levels.

جدول۴- جدول مقایسه میانگین روش های عصاره گیری در میوه ولیک سرخ
Table 4. Comparison table of the average extraction methods in the fruit of red valik

آنتی اکسیدان Antioxidant	فلاونوئید flavonoid	فنل phenol	تیمار Treatment
			روش عصاره گیری Extraction method
81.66a	0.02c	0.88b	آب Water

ادامه جدول۴- جدول مقایسه میانگین روش های عصاره گیری در میوه ولیک سرخ

Table 4. Cont. Comparison table of the average extraction methods in the fruit of red valik

آنتی اکسیدان Antioxidant	فلاونوئید flavonoid	فنل phenol	تیمار Treatment
61.07b	0.14a	1.68a	هیدرو الکلی Hydroalcoholic
87.50a	0.11b	0.80bc	اتانولی Ethanol
90.95a	0.12b	0.70c	متانولی Methanol

حروف غیرمشابه نشان دهنده معنی داری میانگین است

Non-common letters mean a significant difference at the level of one percent

باتوجه به جدول تجزیه واریانس اثرروش‌های مختلف عصاره‌گیری میوه ولیک سیاه(جدول۵)، روش‌های عصاره-گیری در صفات فلاوونوئید و آنتی‌اکسیدان در سطح۱ درصد($p<0.01$) و بر فنل درسطح پنج درصد($p<0.05$) معنی داربود. همچنین براساس نتایج حاصل از جدول مقایسه میانگین روش های عصاره گیری در میوه ولیک سیاه(جدول۶) حلال هیدروالکل بهترین حلال در استخراج ترکیبات فنلی(۱.۳۷) نسبت به دیگر حلال ها بوده است. همچنین میزان فلاوونوئید در نمونه های استفاده شده از حلال متانول، بیشترین عدد را شامل شد. حلال های آب و متانول توانستند میزان درصد مهارراديکال آزادDPPH را نسبت به دیگر حلال ها افزایش دهند. این نتیجه درحالی بدست آمد که حلال هیدروالکلی حدود نصف حلال های آب و متانول قدرت مهارراديکال آزاد DPPH را داشت.

جدول۵- تجزیه واریانس اثرروش های مختلف عصاره گیری میوه ولیک سیاه

Table 5. Variance analysis of the effect of different extraction methods of black valik

آنتی اکسیدان Antioxidant	فلاونوئید Flavonoid	فنل Phenol	درجه آزادی df	منابع تغییرات S.O.V
1354.97**	0.22**	0.99*	3	روش عصاره گیری Extraction method
21.3128	0.0029	0.0043	8	خطا Error
6.37	17.40	8.15	-	ضریب تغییرات Coefficient of variation

**،*وns به ترتیب معنی داری درسطح۱و۵درصد و عدم معنی داری

ns **, and *, respectively, nonsignificant and significant at 1 and 5% probability levels.

جدول۶- جدول مقایسه میانگین روش های عصاره گیری در میوه ولیک سیاه

Table 6. Comparison table of average extraction methods in black Valik

آنتی اکسیدان Antioxidant	فلاونوئید Flavonoid	فنل Phenol	تیمار Treatment
			روش عصاره گیری Extraction method
87.85a	0.04c	0.19d	آب Water
45.00c	0.29b	1.37a	هیدرو الکلی Hydroalcoholic
66.19b	0.22b	0.43c	اتانولی Ethanol
90.47a	0.69a	1.20b	متانولی Methanol

حروف غیرمشابه نشان دهنده معنی داری میانگین است

Non-common letters mean a significant difference at the level of one percent

طی تحقیقات صورت گرفته مشخص شد که آنتی‌اکسیدان ها در غلظت های پائین با مهار اکسیداسیون سوبسترا باعث جلوگیری از اکسید شدن می‌شوند.(Kamkar *et al*. 2010؛ Choe and Min, 2009). فنل‌ها جز متابولیت های ثانویه معطر گیاهی هستند که ترکیبات شیمیایی دگرآسیب برگیاهان و میکروارگانیسم ها بوده و اکولوژی گیاه تاثیر بسیاری بر این ترکیبات دارد(Delnavaz Hashimloyan *et al*. 2014). با توجه به این مطلب و همچنین نتایج حاصل مشخص میشود که علاوه بر اکولوژی نوع حلال و روش استخراج عصاره نیز بر میزان ترکیبات فنلی یک گیاه اثر بسیاری دارد. چراکه هیدروالکل ها در استخراج و افزایش مقدار ترکیبات فنلی نسبت به دیگر حلال ها در سه گیاه مورد آزمایش که از یک منطقه جمع آوری شدند بهترین اثر راداشتند. از آنجائیکه ترکیبات فنلی گروه وسیعی از ترکیبات بوده و دارای قسمت قطبی هستند و ممکن است گروه های عاملی متفاوتی به آن ها متصل باشد و ساختمان غیر قطبی بگیرد، لذا ممکن است در حلال هایی با قطبیت پائین دیده شود (British Pharmacopoeia, 2009). شایان ذکر است که بسته به نوع گیاه و ترکیبات فنلی موجود در آنها، حلال های مختلف ترکیبات مختلفی را استخراج می کنند. به گزارش(2009) Haji *et al.* Mahdipour تاثیر حلال‌های هگزان، دی کلرومتان و یا اتیل استات هر یک به تنهایی، حدود نصف میزان ترکیبات استخراج شده نسبت به استفاده از این حلالها به صورت ترکیبی میباشد. هم چنین استفاده از آب باعث افزایش میزان فنل حاصل از گیاه سرخارگل در این تحقیق شد. در مطالعات انجام شده میزان ترکیبهای فنلی موجود در میوه نسترن کوهی بین ۸۳ تا ۹۸ میلیگرم گالیک اسید بر گرم گزارش شده است که مقدار گزارش شده با نتایج این تحقیق مغایرت دارد. این تفاوت ها نیز به دلیل جمع آوری گیاه از منطقه جمع آوری شده و همچنین روش و حلال مورد استفاده جهت استحصال می‌باشد (Zaringhalami and Khataei, 2017). در بررسی میزان فنل و درصدمهارادیکال آزاد میوه ولیک (monogyna .C) گزارش گردیدکه میزان فنل عصاره اتانولی سه برابر عصاره آبی بوده و میزان مهارادیکال آزاد DPPH عصاره اتانولی دو برابر عصاره آبی می‌باشد(Bernatonienė *et al*. 2008). پژوهش ما افزایش مهارادیکال آزادDPPH در عصاره آبی ولیک را نشان میدهد که عکس این مطلب است. Naczk and Shahidi(2004) بهترین حلال جهت استخراج ترکیبات فنلی را متانول ۸۰ درصد دانسته اند. در حالی که در پژوهش حاضر هیدروالکل(آب و اتانول) بهترین عملکرد در استخراج ترکیبات فنلی را داشت. طی تحقیقی تاثیر حلال های مختلف متانول، اتانول و استون(۵۰، ۹۰ و۱۰۰ درصد) و آب مقطر برروی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، فنل کل، تان‌ها، فلاوونوئیدها و آنتوسیانین میوه عناب (Ziziphus Miller jujube) نشان داد که استون ۵۰درصد بهترین استخراج ترکیبات فنل کل و فلاوونوئیدی را در پی داشت. همچنین آنتوسیانین با متانول ۵۰ درصد و تانن کل هم با متانول ۱۰۰ درصد، بیشترین مقدار رانشان داده و برترین حلال، بین حلال های مختلف بودند (Davarynejad *et al*. 2017).

به گزارش Kabiri and Sayyedalangi (2015) در استخراج ترکیبات فنلی گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) که با دوروش غرقابی و ماکروویو، به همراه حلال های(آب، متانول۸۰درصد و اتانول۵۰ درصد) در زمان های مختلف انجام شد به این نتیجه رسیدند که در هردو روش عصاره اتانولی بیشترین راندمان و عصاره آبی کمترین راندمان را داراست. مقایسه محتوای ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدی و فعالیت آنتی-اکسیدانی اندام هوایی دو جمعیت گیاه بشقابی سنبله‌ای (*Scutellaria pinnatifida*) در شمال ایران بررسی شد. نتایج این تحقیق نشان داد اختلاف میانگین های ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی عصاره ها تحت تاثیر سه عامل جمعیت، روش استخراج و نوع حلال است. بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره متانول و کمترین آن در عصاره آبی مشاهده شد (

Ahmadvand *et al.* (2014) بیان (Saboura *et al.* 2014). داشتند که عصاره آبی گیاه*Artemisia vulgaris* (برنجاسف) دارای کمترین مقدار فنل و فلاوونوئید نسبت به عصاره هیدروالکلی است اما میزان IC50 عصاره آبی بیشتر از عصاره هیدروالکلی است. در تحقیقی بیان شد که عصاره متانولی گیاه نعناکوهی (Mentha asiatica) بیشترین مهارراديکال آزاد را داشته است (Amiri, 2015). استخراج به وسیله حلال های مختلف علاوه بر نوع و ترکیبات دارویی، برروی اثرات آنتی باکتریایی هم موثر است. اثر ضد میکروبی عصاره الکلی، اتیل استات و کلروفرم گیاه *Coriandrum osativum* و گیاه*anisum Pimpinella* برروی میکروارگانیسم های مختلف آزمایش شد و نتایج مختلفی در پی داشت (Fazly Bazzaz and Harirzadeh, 2003) درپژوهش دیگر مشخص گردید که تاثیر عصاره هیدروالکلی برگ و شاخه گیاه مورد بیشتر از عصاره اتانولی آن برروی باکتریهای مختلف می‌باشد (Amensour *et al.* 2010). در تحقیقی برروی اثر حلال های مختلف عصاره زعفران برروی باکتری به این نتیجه رسیدند که عصاره الکلی کاراآمدتر از عصاره آبی گیاه زعفران برروی باکتری می باشد (Baranikarbasaki *et al.* 2016).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که در استخراج ترکیبات فنلی از سه میوه دارویی نسترن کوهی، ولیک سرخ و ولیک سیاه حلال هیدروالکل نسبت به دیگر حلال ها یعنی آب، اتانول و متانول مطلوب تر است. همچنین بیشترین فنل در بین سه میوه مورد آزمایش در میوه نسترن کوهی مشاهده شد. در نسترن کوهی آب نسبت به سه حلال دیگر در استخراج فلاوونوئیدها عملکرد ضعیف تری داشته است. در حالی که در ولیک سرخ هیدروالکل(آب و اتانول) و در ولیک سیاه متانول بیشترین فلاوونوئید اندازه گیری شده را شامل شدند. در نسترن کوهی بهترین حلال جهت فعالیت آنتی اکسیدانی اتانول بود. در ولیک سرخ عصاره هیدروالکلی نسبت به دیگر حلال ها از کارآمدی کمتری برخوردار بود. همچنین آب و متانول در ولیک سیاه بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان دادند. بنظر می رسد در استخراج ترکیبات فنلی سه میوه ، حلال هیدروالکل نسبت به دیگر حلال‌ها مطلوب‌تر است.

سپاسگزاری

از جناب مهندس یوسف قاسمی کارشناس آزمایشگاه گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری بابت کمک‌های بی دریغشان جهت به ثمر رسیدن نتایج این پژوهش کمال تشکر را دارم.

منابع

Ahmadvand, H., Amiri, H., Dalvand, H., and Bagheri, S., 2014. Various antioxidant properties of essential oil and hydroalcoholic extract of Artemisa persica. Journal Birjand University of Medical scicences

Sci. 20, 416-24. (In Persian with English abstract).

Alizadeh, A., Varzian, A.s., Dolatshah, A.S., Momivand, H. and Eini Nargesh, H., 2017. Morphological and phytochemical characteristics of fruit of different populations of Nastaran Kooh (Rosa canina L.) in Lorestan province. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research. 35(3), 512-526. (In Persian with English abstract)

Alothman, M., Bhat, R. and Karim, A.A., 2009. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. Food Chemistry. 115, 785–788.

Amensour, M., Bouhdid, S., Fernandezlopez, J., Idaomar, M., Senhaji, N.S. and Abrini, J., 2010. Antibacterial activity of extracts of Myrtus

communis against food-borne pathogenic and spoilage bacteria. International Journal of Food Properties. 13, 1215-1224.

Amiri, H., 2015. Composition and antioxidant activity of the essential oil and methanolic extract of Ziziphora clinopodioides Lam in preflowering stage. Journal Kerman UniMedical Sciences. 16, 79-86. (In Persian with English abstract)

Anagnostopoulou, M.A., Kefalas, P., Papageorgiou, V.P., Assimepoulou, A.N., and Boskou, D., 2006. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). Food Chemistry. 94, 19–25.

Azimzadeh, M., 2009. Genetic assessment of Iranian Bunium persicum Boiss using ITS. Tehran: University of Tehran. pp.81.

Bahorun, T., Trotin, F., Pommery, J., Vasseur, J. and Pinkas, M., 1994. Antioxidant activities of *Crataegus monogyna* extracts. Planta Medica. 60(04), 323-328.

Bahramikia, S. and Yazdanparast, R., 2008. Antioxidant and free radical scavering activities of different fractions of anethum graveolens leaves using in vitro models, Pharmacol online. 2, 219-233.

Baranikarbasaki, F., Hossenzadeh, H., Fazlibazzaz, B.S., Hoda, V., Ghazvini, K. and Ajami, B.A.M., 2016. Evaluation of antimicrobial effects of aqueous and alcoholic extracts of saffron on oral pathogenic microbes streptococcus mutans lactobacillus, candida albicans. Journal Mashhad Dental School. 40, 203-212. (In Persian with English abstract)

Barros, L., Carvalho, A.M. and Ferreira, I.C., 1991. Comparing the composition and bioactivity of *Crataegus monogyna* flowers and fruits used in folk medicine. Phytochemical Analysis. 22(2), 181-188.

Bernatonienė, J., Masteikova, R., Majienė, D., Savickas, A., Kėvelaitis, E., and Bernatonienė, R., 2008. Free radical- scavenging activities of Crataegus monogyna extracts. Journal Medicina . 44(9), 706-12.

British Pharmacopoeia. 2009. Vol. IV, Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA). London. pp. 6939 - 6942.

Castro, M.L. and Garcıa-Ayuso, L., 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. Analytica Chimica *Acta.* 369, 1-10.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., and Chern, J.C., 2002. Estmation of total flavonoid content in proplis by two complementary colorimetric methods. Food Drug Analysis. 10, 178-182.

Chang, W.T., Dao, J. and Shao, Z.H., 2005. Hawthorn: potential roles in cardiovascular disease. *American Journal* of *Chinese Medicin*. 33(1), 1-10.

Choe, E. and Min, B.D., 2009. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of food. Comprehensive Review in Food Science and Food Safety. 8, 345-358.

Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G.A., Uzunov, D., Tubaro, A., Menichini, F., Della Loggia, R., 2008. In vivo anti inflammatory and invitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal* Ethnopharmacol. 116, 144-51.

Cui, H.Y., Jia, X.Y., Zhang, X., Zhang, J. and Zhang, Z.Q., 2011. Optimization of high-speed counter-current chromatography for separation of polyphenols from the extract of hawthorn (*Crataegus laevigata*) with response surface

methodology. Separation and *Purification Technology*. 77, 269-74.

Davari, A., Solouki, M. and Fazelinasab, B., 2018. Effects of jasmonic acid and titanium dioxide nanoparticles on process of changes of phytochemical and antioxidant in genotypes of Satureja hortensis L. Eco Phytochem Journal Medicin Plant. 5, 1-20.

Davarynejad, G., Taghizadeh, S. and Asili, J., 2017. Effect of different solvents on total phenolic contents and antioxidant activity of Zizyphus jujube Miller fruits. Journal Horticulture Sci. 31, 158-66

Delnavaz Hashimloyan, B., O. Ataei and M. Mojdehi., 2014. The determination and measurement of some secondary metabolites of leaves, stems and roots of Dendrostellera lessertii(Wikstr)Van. Tigeh. and allelopathy effects on barley and mungbean plants, Plant Ecophysiology. 22, 162-177. (In Persian with English abstract)

Demir, F. and Ozcan, M., 2001. Chemical and technological properties of rose (*Rosa canina* L.) fruits grown wild in Turkey. Food Engineering. 47, 333-336.

Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., and Nabavi S.M., 2009. Antioxidant activity of leaves and inflorescence of *Eryngium Caucasicum* Trautv at flowering stage. Pharmacognocy Research. 1(6), 435-439.

Ercisli S., 2007. Chemical composition of fruits in some rose (Rosa spp.) species. Food Chemistry. 104, 1379-1384.

Fazeli Nasab, B., Moshtaghi, N. and Forouzandeh, M., 2019. Investigation of the effect of solvent extraction on the amount of phenol, flavonoids and antioxidant activity of some native Iranian medicinal plants. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences. 27(3), 14-26. (In Persian with English abstract)

Fazly Bazzaz, B.S., and Harirzadeh, G., 2003. Screening of Iranian plants for antimicrobial activity. Pharmaceutical Biology. 41, 573-583.

Gulcin, I., Oktay, M., Kufrevioglu, I.O., and Aslan, A., 2002. Determination of antioxidant activity of Lichen Cetraria islandica (L) Ach. Ethnopharmacol. 79(3), 325-329.

Haji Mahdipour, H., Khanavi, M., Shokrchi, M., Abedi, Z and Pir Ali Hamdani, M., 2009. Investigation of the best method for extracting phenolic compounds in Echinacea. Journal of Medicinal Plants. 8 (4), 145-152. (In Persian with English abstract)

Hwang, J.Y., Shue, Y.S. and Chang, H.M., 2001. Antioxidative activity of roasted and defatted peanut kernels. *Food Research*. 34, 639-647.

Ishaq Lou Gulogahi, Q., Safapour, S., Sadeghi Kiakhani, M. and Seyed Saadati, S.H., 2013. Optimization of ultrasonic extraction process of natural dyes of Velik fruit. Journal of Color Science and Technology. 9, 313-320. (In Persian with English abstract)

Kabiri, S. and Sayyedalangi, S.Z., 2015. Comparison of antioxidant effect of different extracts from Melissa officinalis leaves with immersion and microwave assisted extractions and its oxidative stability on soybean oil. Innovations in food Technology. 2, 23-38.

Kamkar, A., 2009. Study of antioxidant activity of Iranian dill essential oil and extract. Knowledge horizon; Quarterly Journal of Gonabad University of Medical Sciences and Health Services. 15(2), 11-17.

Kamkar, A., Jebelli Javan, A., Asadi, F. and Kamalinejad, M. 2010. The antioxidative effect of Iranian Mentha pulegium extracts and essential oil in sunflower oil. Food and Chemical Toxicology. 48, 1796–1800.

Kaur, C. and Kapoor, H.C., 2001. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. Int Journal Food Sci Technology. 36, 703–25.

Khatamsaz, M., 1992. (Flora of Iran) Rosaceae family. Forest and Rangeland Research Institute, 252 p.

Kim Il-S, Yang M, Lee OH and Kang SN. 2011. The antioxidant activity and the bioactive compound content of Stevia rebaudiana water extracts. Food Science and Technology. 44, 1328-1332.

Kulshreshtha, M., Goswami, M.V., Rao, C., Ashwlayan, V. and Yadav, S., 2011. Estimation of antioxidant potential of aqueous extract of *Ficus bengalensis* leaf on gastric ulcer. International *Journal* of *Pharmaceutical* Sciences Review and *Research.* 9(1), 122-126.

Liu, P., Yang, B. and Kallio, H., 2010. Characterization of phenolic compounds in Chinese hawthorn(*Crataegus pinnatifida* Bge. var. major) fruit by high performance liquid chromatography– electrospray ionization mass spectrometry. Food Chemistry. 121, 1188-97.

Luximon-Ramma, A., Bahorun, T. and Crozier, A., 2003. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. Science of Food and Agriculture. 83, 496–502.

Ma, Y., Ye, X., Hao, Y., Xu, G., Xu, G. and Liu, D., 2008. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (Citrus reticulata) peel. Ultrason Sonochem. 15(3), 227-232.

Naczk M, Shahidi F. 2004. Review Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal* Chromatography A. 1054, 95–111.

Neergheen, S.V., Bahorun, T., Jen, S.L. and Arouma, I.O., 2007.Bioefficacy of Mauritian endemic medicinal plant: Assessment of their phenolic contents and antioxidant potential. Pharmaceutical Biology. 45, 9-17.

Omid Beigi, R. 2005. Production and processing of medicinal plants (Volume1). Astan Quds Razavi Publications, Mashhad, pp. 347.

Ozcan, M., Hacıseferoğulları, H., Marakoğlu, T. and Arslan, D., 2005. Hawthorn (Crataegus spp.) fruit: some physical and chemical properties. Food engineering. 69, 409-413.

Raghavendra, H., Vijayananda, B., Madhumathi, G. and Hiremath, A., 2010. In vitro antioxidant activity of *Vitex negundo* L. Leaf extracts. Chiang Mai Journal of Science. 37(3), 489-497.

Rashedi, H., Amiri, H. and Gharezi, A., 2015. Assessment of phytochemical and antioxidant properties of the Capparis spinosa L. Khuzestan province. Journal of Qazvin University of Medical Sciences. 18, 11-07. (In Persian with English abstract)

Roy, A., Sitalakshmi, T., Geetha, R.V., Lakshmi, T., Vishnu Priya, V., 2011. In Vitro Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of the Ethanolic Extract of *Dioscorea villosa* (Wild Yam) Tubers. Drug Invention Today. 3(9), 214-15.

Saboura, A., Ahmadi, A., Zeinali, A., Parsa, M., 2014. Comparison between the contents of phenolic and flavonoid compounds and aerial part antioxidant activity in Scutellaria pinnatifida in two NorthIranian populations. Journal Rafsanjan University of Medical Sciences. 13, 249-66. (In Persian with English abstract)

Salehi, S., Long, S.R., Proteau, P.J. and Filtz, T.M., 2009. Hawthorn (Crataegus monogyna Jacq.) extract exhibits atropine-sensitive activity in a cultured cardiomyocyte assay. *Nature Medicine*. 63(1) 1-8.

Shukla, S.h,, Mehta, A., Bajpai, V.K. and Shukla, S., 2009. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. Food Chemistry Toxicol. 47, 2338-43.

Slinkard, K., and singleton, V., 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American journal of enology and viticulture. (28), 49-55.

Sokmen, A., Sokmen, M., Daferera, D., Polissiou, M., Candan, F., Unlu, M. and Akpulat, H.A., 2004. The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of Achillea biebersteini Afan. *Phytotherapy Research International Journal*. 18, 451-56.

Sun, J., Chu, Y., Wu, X. and Liu, R.H., 2002. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. Agriculture and Food Chemistry. 50,7449–7454.

Yen, G.C. and Duh, P.D., 1995. Antioxidant activity of methanolic extracts of peanut huls from various cultivars. Journal of the American Oil Chemists' Society. 72(9), 1065-1067.

Zaringhalami, S. and Khataei, M., 2017. Determination of Some chemical composition of Dog Rose fruit and seed. Journal of Food Science and Technology. 64(14), 1-8.

Environmental Sciences Vol.21 / No 3 / Autumn 2023

73-88
Original Article

Evaluation of different extraction methods on antioxidant compounds of dog-rose mountain, red hawthorn and black hawthorn (Mazandaran fruits)

Mojtaba Esmailzadeh, Hossein Moradi* and Fatemeh Davatgar

Department of Horticultural Sciences, Crop Sciences College Research Institute of Medicinal Plant Biotechnologies (RIMPBio), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Received: 2022.10.04 Accepted: 2023.04.09

Esmailzadeh, M., Moradi, H. and Davatgar, F., 2023. Evaluation of different extraction methods on antioxidant compounds of dog-rose mountain, red hawthorn and black hawthorn (Mazandaran fruits). Environmental Sciences. 21(3): 73-88.

Introduction: Free radicals are considered harmful and damaging compounds to plant and animal cells and damage human health. Phenols are a large group of hydroxyl compounds that include compounds such as flavonoids and anthocyanins. Mountain dog-rose, red hawthorn and black hawthorn are three medicinal fruits with valuable compounds such as polyphenols, flavonoids, and vitamins, in the north of the country, with very favorable vegetative and reproductive growth.

Material and methods: In order to investigate and determine the maximum amount of extraction of antioxidant compounds, different extraction methods were used in these fruits. The fruits of these plants were collected from Nava area (52.209 and 35.854, altitude 2300 meters above sea level) located in Amol City. After drying, they were extracted with four solvents i.e. water, ethanol, hydroalcohol (water and ethanol 50:50) and methanol. Then the amount of phenol, flavonoid and percentage of DPPH free radicals were measured for each fruit and extraction method.

* Corresponding Author: *Email Address*. h.moradi@sanru.ac.ir
http://dx.doi.org/10.48308/envs.2023.1235
http://dorl.net/dor/20.1001.1.17351324.1402.21.3.3.3

Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Results and discussion: The results of this research showed that different extraction methods of dog-rose fruit have a significant difference at the level of 1% ($p<0.01$) on phenol and antioxidants and at the level of 5% ($p<0.05$) on flavonoids. Also, based on the comparison of the average extraction methods in the dog-rose fruit, the use of hydroalcoholic solvent (water and ethanol) caused a significant difference compared to other solvents and was able to show the highest amount of total phenol in this plant. The effects of different extraction methods on the fruit of the red hawthorn showed all extraction methods (water, hydroalcoholic, ethanolic and methanolic) were effective on the amount of phenol, flavonoid and antioxidant and were significant at 1% level. Based on the comparison of the average extraction methods in the red hawthorn fruit, the extracts obtained from the hydroalcohol solvent showed the highest number in phenolic and flavonoid traits and were the superior treatment. Extraction methods were significant in flavonoid and antioxidant traits at the level of 1% ($p<0.01$) and in phenol at the level of 5% ($p<0.05$) in the black hawthorn fruit. Also, based on the results of the comparison table of the average extraction methods in the fruit of black hawthorn, hydroalcohol solvent was the best solvent in extracting phenolic compounds compared to other solvents.

Conclusion: The phenolic compounds of the three medicinal fruits were more favorable by hydroalcohol solvent than other solvents, such as water, ethanol and methanol. Also, the highest amount of phenol among the three tested fruits was observed in the dog-rose mountain fruit. While in the red hawthorn, hydroalcohol (water and ethanol) and in the black hawthorn, methanol contained the most measured flavonoids. In general and considering the importance of phenolic compounds, it is suggested to use hydroalcohol solvent to extract these types of compounds in these plants.

Keywords: Ethanol, Free radicals, Extraction method, Medicinal plants, Methanol.