بررسی اثر روش‌های مختلف خشک کردن بر مدت زمان خشک شدن و برخی خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه دارویی *Solidago virgaurea* L.

سپیده پارسافر[۱]، قاسم اقلیما[۲]، محمدحسین میرجلیلی[۳]، صمد نژاد ابراهیمی[٤]، جواد هادیان[۳]*

[۱]کارشناسی‌ارشد، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران

[۲]استادیار، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران

[۳]دانشیار، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران

[٤]دانشیار، گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۰۰/۵/۲۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۰۰/۱۰/۲٦

چکیده

به منظور بررسی تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن بر گیاه دارویی *Solidago virgaurea* L.، آزمایشی بر پایه طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار و سه تکرار در سال ۱۳۹۷ در آزمایشگاه اکوفیزیولوژی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهیدبهشتی تهران اجرا شد. در این مطالعه از اندام‌های هوایی گیاه *S. virgaurea* L. که از رویشگاه طبیعی سنگده واقع در استان مازندران که در مرحله‌گلدهی کامل برداشت شده بود، استفاده گردید. تیمارهای مورد آزمایش شامل خشک کردن طبیعی (خشک کردن در سایه و آفتاب)، خشک کردن در آون (٤۰ و ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد) و خشک کردن در مایکروویو (توان ۵۵۰ و ۱۰۰۰ وات) بودند. در روش‌های مختلف، خشک کردن تا رسیدن محتوای رطوبت به ۱۰ درصد (بر پایه وزن تر گیاهی) ادامه یافت. از نمونه‌های خشک شده جهت استخراج عصاره متانولی به‌منظور اندازه‌گیری برخی متابولیت‌های ثانویه شامل میزان فنل کل، فلانوئیدکل و لئوکارپوزاید استفاده گردید. محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و مقدار لئوکارپوزاید[۱] به‌ترتیب به روش فولین سیوکالتو، آلومینیوم کلراید و آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری شدند. کم‌ترین (۷ دقیقه) و بیشترین (٦۰ ساعت) مدت زمان خشک شدن به ترتیب مربوط به تیمارهای خشک کردن با توان ۱۰۰۰ وات مایکروویو و خشک کردن در سایه بود. بالاترین محتوای فنل کل (۳۰ میلی‌گرم گالیک اسید در یک گرم ماده خشک) در تیمار خشک کردن در سایه و بیشترین محتوای فلاونوئید کل (۷/۹۵ میلی‌گرم روتین در یک گرم ماده خشک) و لئوکارپوزاید (۳/۰۷ میلی‌گرم بر یک گرم ماده خشک) در تیمار آون با دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. به علاوه با افزایش توان مایکروویو و دمای آون میزان متابولیت های فعال کاهش یافت. در مجموع گزینش صحیح روش خشک کردن به عوامل متعددی بستگی دارد و در این میان استفاده از روشی بر مبنای مصرف بهینهٔ انرژی و صرفه جویی در هزینه نیز باید مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنلی، روش و زمان خشک کردن، علف طلایی، لئوکارپوزاید

[۱] Leiocarposide

*نویسنده مسئول: javadhadian@gmail.com

مقدمه

علف طلایی (*Solidago virgaurea* L.)، گیاهی چند ساله و ریزوم‌دار به ارتفاع ۱۰۰- ۲۵ سانتی‌متر متعلق به خانواده کاسنی (Asteraceae)، از جمله گیاهان با ارزش دارویی است. پراکندگی جهانی این گیاه در سراسر اروپا، نواحی معتدله آسیا، شمال غرب آفریقا بوده و در ایران نیز دامنه انتشارآن محدود به نواحی جنگلی و باز مرتعی استان‌های گلستان، مازندران و گیلان می‌باشد (Mozaffarian, 2012). داروهای گیاهی حاوی علف طلایی اروپایی طی قرن‌ها برای درمان بیماری‌های دستگاه ادراری مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این داروها دارای اثرات ضد التهاب، ضد میکروبی، مُدر، ضد اسپاسم و مسکّن می‌باشند و برای درمان التهاب، عفونت، پیشگیری از تشکیل سنگ کلیه و کمک به دفع سنگ‌های ادراری بصورت ایمن و بی‌خطر مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اثرات فارماکولوژیک این گیاه عمدتاً به خاطر وجود ترکیبات شیمیایی ساپونین‌ها، فنولیک اسیدها، فلاونوئیدها و به خصوص لئوکارپوزاید می‌باشند (Yaneva et al., 2020).

گیاهان دارویی دارای سطح بالایی از رطوبت و میکروارگانسیم‌ها هستند. بنابراین جهت جلوگیری از فساد این محصولات و اجتناب از کاهش کمّیت و کیفیت مواد مؤثره آنها، خشک کردن سریع پس از برداشت مواد گیاهی بسیار ضروری است (Mumivand et al., 2020). خشک کردن یکی از مهم‌ترین فرآیندهای پس از برداشت و قدیمی ترین روش برای نگهداری مواد گیاهی است. این روش از طریق حذف رطوبت با به‌کارگیری عمل تبخیر تا رسیدن به یک آستانه خاص موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های میکروب‌ها و مخمرها در مواد گیاهی و کاهش زوال و فساد آنها می‌شود، در نتیجه نگهداری محصول را برای مدت طولانی بدون کاهش کمّیت و کیفیت آن امکان پذیر می کند (Azizi et al., 2009).

اندام های مختلف گیاهان معمولاً پس از جمع آوری حاوی مقادیر فراوانی رطوبت (٦٠ تا٨٠ درصد) هستند که باید این میزان رطوبت را بسته به نوع اندام گیاه دارویی به ١٤-١٠ درصد کاهش داد (Mumivand et al., 2020). از طرف دیگر خشک کردن گیاهان تغییرات فیزیکی و شیمیایی را در آنها به همراه دارد. در فرآیند خشک کردن گیاهان دارویی با توجه به نوع مواد مؤثره (الکالوئید، اسانس، فنل، ترپنوئید و...) آنها باید روش مناسبی انتخاب نمود. به کارگیری روش‌های خشک کردن سریع و صنعتی، سبب حفظ کیفیت محصول و کاهش مدت زمان خشک به میزان قابل توجهی خواهد شد (Omidbaigi, 2010). روش‌های متعددی برای خشک کردن ماده گیاهی وجود دارد که می‌توان به خشک کردن با هوای داغ، آفتاب و سایه، خشک کردن انجمادی، خشک کردن با امواج ماکروویو و خشک کردن در آون اشاره کرد که هر یک دارای مزایا و معایبی هستند (Hassanpouraghdam et al., 2010).

تاکنون، تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن بر ترکیبات فیتوشیمیایی تعدادی از گیاهان دارویی گزارش شده است. در مطالعه‌ای، تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن (خشک کردن در سایه و آفتاب، سه دمای مختلف آون و شش توان ماکروویو،) بر گیاه بابونه نشان داد که سریع‌ترین روش خشک کردن مربوط به ماکروویو و کُندترین به روش مربوط به خشک کردن در سایه بود (Azizi et al., 2009). در مطالعه‌ای دیگر، تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن (آفتاب، آون با دمای ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد و روش ترکیبی آون-ماکروویو) بر خصوصیات نعناع فلفلی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این محققین نشان داد

کـه کوتـاه‌تـرین زمـان خشـک شـدن در روش آون- مـاکروویو بـود. هـم‌چنـین در ایـن روش بـیش‌تـرین ترکیبات فنل کل و بهترین کیفیت رنـگ گـزارش شـد (Arslan et al., 2010). در بررسـی دیگـری، تـاثیر دماهای مختلف خشک کردن بـر ویژگـی‌هـای رنـگ، میزات ترکیبات فنلی، خصوصیات فیزیکی- شـیمیایی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فلفل قرمز مطالعه شده اسـت. نتایج نشان داده است که با افـزایش دمـا از ۵۰ بـه ۹۰ درجه سانتی‌گراد میزان ترکیبات فنلی کاهش می‌یابد و بیشترین فعالیت آنتـی‌اکسـیدانی در کمتـرین دمـا (۵۰ درجه سانتی‌گراد) مشاهد شـد (Vega-Galvez et al., 2009). حسن‌زاده و همکاران، تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن (طبیعی و آون) بر مـدت زمـان خشـک شـدن و برخـی متابولیـت‌هـای ثانویـه گیـاه دارویـی بادرنجبویه را گزارش کردند. نتایج آنها نشـان داد کـه بیش‌ترین درصد اسانس و فعالیـت آنتـی‌اکسـیدانی در خشک کردن با آون با دمای ۳۰ درجـه سـانتی‌گـراد و بیش‌ترین میزان فنل کل در خشـک کـردن بـا آون ٤٠ درجه سـانتی‌گـراد و خشـک کـردن در اتـاق حاصـل گردید (Hassanzadeh et al., 2018). در مطالعه دیگر، بررسی تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن بر زمـان خشک شدن و برخی صفات بیوشیمایی نعنـاع فلفلـی نشان داد کـه بیشـترین محتـوای فنـل کـل و فعالیـت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب در نمونـه تـازه و نمونـه‌هـای خشک شده در سایه مصنوعی و مـاکروویو ۹۰۰ وات بدسـت مـی‌آیـد (Rozdar et al., 2014). در تحقیـق دیگری، بالاترین محتوای فنل کل و فلاونوئید کـل در گیاه دارویی شـمعدانی عطـری بـه‌ترتیـب در خشـک کردن در سایه محصور و سایه هوای آزاد مشاهده شد (Mumivand et al., 2020).

با توجه بـه کـاربرد گسـترده گیـاه دارویـی علـف طلایی در صنایع داروسازی، توسعه کشت این گیاه در ایران و همچنین نظر به اهمیت فرآینـد خشـک کـردن در گیاهان دارویی، ادویه‌ای و عطری، این پـژوهش بـا هدف بررسی تاثیر روش‌های مختلـف خشـک کـردن (خشک کردن با ماکروویو، آون و روش‌هـای طبیعـی) بـر مـدت زمـان خشـک شـدن و برخـی صـفات فیتوشیمیایی گیاه طراحی و اجرا شد. نتایج این تحقیق به خوبی می‌تواند توسط تولیدکنندگان این گیـاه بـرای انتخاب یک روش مطلوب جهت خشـک کـردن گیـاه مورد توجه و استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصـادفی با شش تیمار (روش‌های مختلف خشک کردن) و سـه تکـرار در سـال ۱۳۹۷ اجـرا گردیـد. بـرای انجـام آزمایشـات، از نمونـه‌هـای گیـاهی رویشـگاه طبیعـی سنگده واقع در استان مازنـدران در مرحلـه گـل‌دهـی استفاده شد. این منطقـه در محـدوده درجـه ۳٦ و ٠٤ دقیقه عـرض شـمالی و ۵۳ درجـه و ۱۷ دقیقـه طـول شرقی و در ارتفاع ۱۷۳۰ متر از سطح دریا قـرار دارد. از نظـر اقلیمـی دمـای حـداقل و حـداکثر ۱۰/٤ و ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد و ۵۵٦/۷ متوسط بارنـدگی میلـی‌متـر می‌باشد.

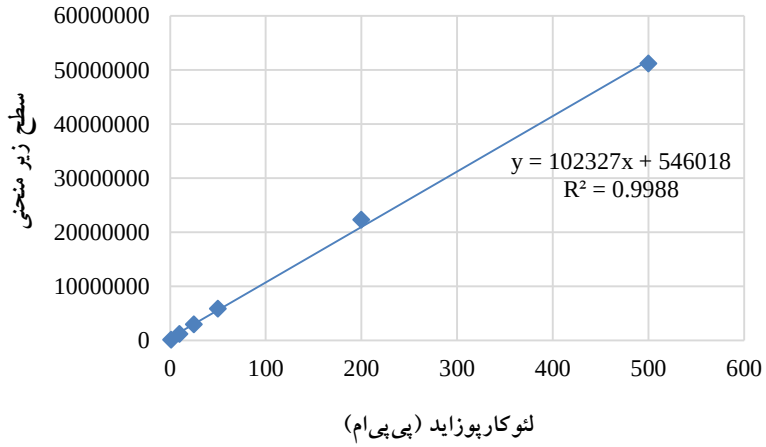
تیمارهای خشک کردن گیاهان: روش‌هـای مختلـف مورد استفاده در این آزمایش شامل خشـک کـردن در آون (دمای ٤٠ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد)، خشک کـردن در مـاکروویو (۵۵۰ و ۱۰۰۰ وات) مـدل Panasonic Dimension و خشک کردن طبیعی (خشک کـردن در سایه با میانگین دمای ۲۵ درجه سـانتی‌گـراد، خشـک کردن در آفتاب با میانگین دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) بود. در این پژوهش در تمامی روش‌ها، خشک کـردن گیاهان تا رسیدن وزن نمونه‌هـا بـه محتـوای رطـوبتی درصد (بر پایه ماده خشـک گیـاهی) ادامـه یافـت. در پایـان، طـول زمـان خشـک شـدن در همـه روش‌هـا محاسبه گردید. برای سنجش محتـوای رطـوبتی اولیـه

مواد گیاهی، ٤ نمونه ۱۰ گرمی در آون با دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت خشک شدند. محتوای رطوبت مواد گیاهی بر پایه وزن تر و خشک محاسبه شد. میزان رطوبت بر پایه وزن تر با استفاده از رابطه ۱ محاسبه و بر حسب درصد بیان شد. نسبت میزان رطوبت بر پایه وزن خشک از رابطه ۲ تعیین گردید (Martinov et al., 2007).

وزن ماده خشک + وزن رطوبت / وزن رطوبت = میزان رطوبت بر پایه وزن تر (۱)

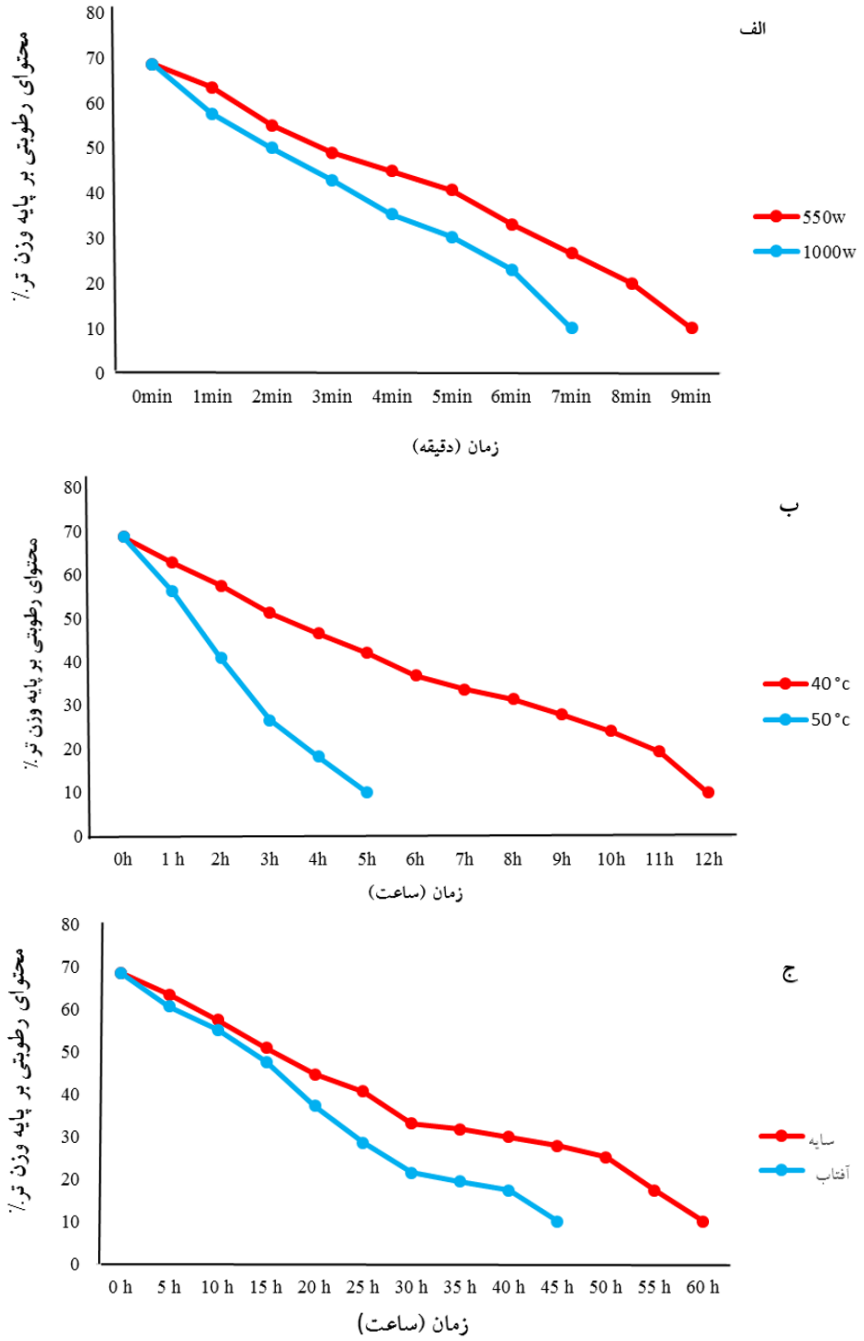
وزن ماده خشک / وزن رطوبت = میزان رطوبت بر پایه وزن خشک (۲)

عصاره‌گیری: به منظور عصاره‌گیری و استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های گیاهی در هر یک از روش‌های خشک کردن پودر شده و استفاده گردید. سپس ۱۰ میلی‌لیتر متانول به نمونه اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک (Ultrasonic) مدل الماسونیک – دی ۷۸۲۲٤ سینجن اچ تی دبلیو (SingenHtw Elmasonic- D 78224)، ساخت شرکت المآ آلمان (Elma Germany) در دمای اتاق قرار گرفت. این مرحله چهار بار تکرار شد تا حداکثر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از ماده گیاهی جدا و در متانول حل شوند. پس از سونیکِیشِن (Sonication)، عصاره متانولی حاصل از چهار مرحله استخراج، جمع‌آوری شده و در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار مدل R۵۷۰۲ ساخت شرکت اپندورف (Eppendorf)، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ٤۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ محلول بالایی به شیشه‌های تیره مخصوص عصاره منتقل شد و در یخچال در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز نگهداری شد.



شکل ۱: منحنی کالیبراسیون غلظت‌های مختلف از استاندارد لئوکارپوزاید

سنجش محتوای فنل و فلاونوئید کل: سنجش محتوی فنل کل و فلاونوئید کل با استفاده از دستگاه پاورویو اچ تی میکروپلیت اسپکتوفوتومتر (Power Spectrophotometer Wave HT microplate) مدل ایکس اس ۲ ساخت شرکت بیوتک (BioTeks) آمریکا، و سیستم پردازش اطلاعات کامپیوتری با نرم‌افزار جن دیتا آنالایزز (Gene data analysis) مورد استفاده قرار گرفت. محتوی فنل و فلاونوئید کل در عصاره گیاه به‌ترتیب بر اساس واکنشگر Ciocalteus (FCR) Folin Reagent و کلرید آلومینیوم ($AlCl_3$) تخمین زده شد. جذب محلول‌ها برای ترکیبات فنلی در طول موج ۷٦۰ nm و برای فلاونوئید کل در طول موج ۵۱۰ توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا خوانده شد و میزان ترکیبات فنل کل گیاه معادل گالیک اسید و فلاونوئید کل معادل روتین اندازه‌گیری شد (Kamtekar et al., 2014; Salehi et al., 2013).



شکل ۲: روند کاهش محتوای رطوبتی مواد گیاهی علف طلایی در واکنش به توان ۵۵۰ و ۱۰۰۰ وات میکروویو (الف)، دمای ۴۰ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد آون (ب) و به روش طبیعی (سایه و آفتاب) (ج)

اندازه‌گیری محتوای ترکیب لئوکارپوزاید با کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC): از سیستم HPLC ساخت شرکت Knauer (Germany) مجهز به دو پمپ (مدل – Wellchron-K1001) و آشکارساز PDA (مدل K2800) برای جداسازی و اندازه‌گیری استفاده شد. ستون مورد استفاده نیز ساخت شرکت Eurosphr و از نوع RP-C18 (با طول ۲۵۰ میلی‌متر و قطر داخلی ٤/٦ میلی‌متر) بوده است.

حلال‌های متانول و آب مخصوص HPLC بـه عنـوان فاز متحرک استفاده ش و جذب و نشـر نمونـه‌هـا در طـول مـوج ۲۱٦ نـانومتر بررسـی شـدند. اسـتاندارد لئوکارپوزاید از شـرکت فیتولـب آلمـان تهیـه گردیـد. جهت رسم منحنی استاندارد لئوکارپوزاید غلظت‌هـای ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ پـی‌پـی‌ام تهیـه و بـه دستگاه تزریق گردید. از نرم‌افـزار شـرکت EZchorm برای انتگرال‌گیری و محاسبه سطح زیر منحنی استفاده گردید. پس از محاسـبه مسـاحت پیـک غلظـت‌هـای استاندارد، منحنی استاندارد با نرم افزار اکسل رسم شد و سپس معادله خط y=bx+a بدست آمد (شکل ۲).

تجزیه آماری داده‌ها

تجزیه واریانس داده‌ها براساس طرح پـایه کاملاً تصادفی با ۸ تیمار و ۳ تکرار به وسیله از نرم‌افزار SAS (ver 9.4) صورت گرفت و مقایسه میانگین تیمارهـا بـا آزمون حداقل تفاوت معنی‌داری (LSD) در سطح یـک درصد انجام شد. بـرای ترسـیم حـداول و نمودارهـا از نرم‌افزارهای Word و Excel استفاده گردید.

نتایج

تجزیه واریانس داده‌های حاصـل از بررسـی تـاثیر روش‌های مختلف خشک کردن بر صفات فیتوشمیایی صورت گرفت. نتایج حاصل نشان داد تاثیر روش‌های مختلـف خشـک کـردن بـر محتـوی فنـل کـل و لئوکارپوزاید در سطح احتمال یک درصد و فلاونوئید کل در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

جدول ۱: تجزیه واریانس محتوای ترکیبات فیتوشیمیایی علف طلایی در روش‌های مختلف خشک کردن

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)		
		فنل کل	فلاونوئید کل	لئوکارپوزاید
تیمار	۵	۷۷/۵٤**	۱/۷۰*	۰/٤٤**
خطا	۱۲	۱/۳	۰/۵۱	۰/۰۰٦۵
ضریب تغییرات (٪)	-	٤/۵	۹/۷٦	۳/۳

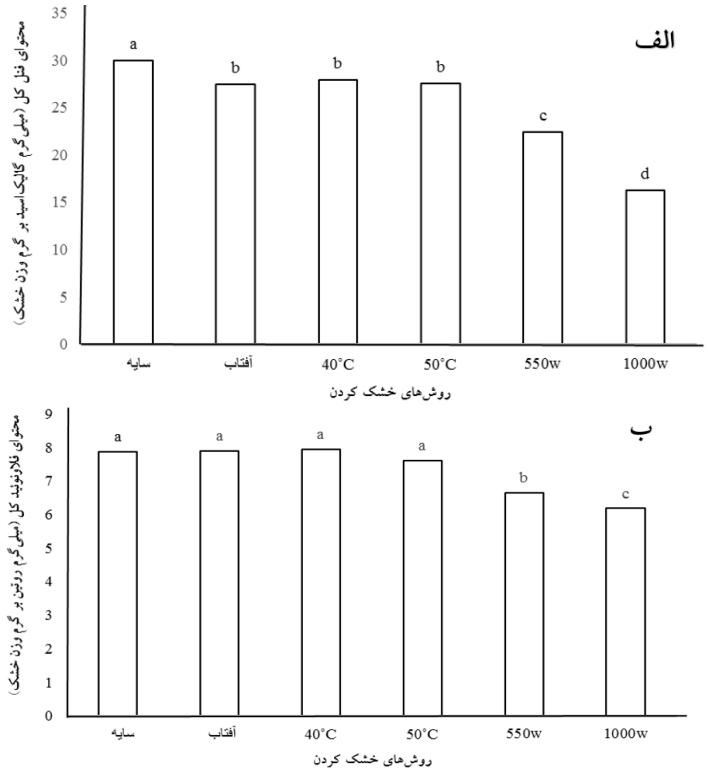
** و * به‌ترتیب عدم معنی داری و معنی دار شدن در سطح ۱ و ۵ درصد می‌باشد.

جدول ۲: مدت زمان لازم برای رسیدن به محتوای رطوبتی ۱۰ درصد بر پایه وزن تر تیمارهای مختلف

روش خشک کردن	آفتاب (ساعت)	سایه (ساعت)	آون ٤۰ °C (ساعت)	آون ۵۰ °C (ساعت)	میکروویو ۵۵۰W (دقیقه)	میکروویو ۱۰۰۰W (دقیقه)
زمان	٤٦±۰/۵	٦۰±۰/٤	۱۲±۰/٦۱	۵±۰/۷۵	۹±۰/۳٦	۷±۰/٦٤

محتوای رطوبتی گیاه: در شکل ۳ و جـدول ۲ رونـد خشک شدن و مدت زمان لازم بـه محتـوای رطـوبتی ۱۰ درصد بـر پایـه وزن تـر بـرای خشـک کـردن بـا توان‌های مختلف مـایکروویو نشـان داده شـده اسـت. نتایج نشان داد که با افزایش توان‌های مایکروویو زمان مورد نیاز برای رسیدن به محتوای رطوبتی ۱۰ درصـد بـر پایـه وزن تـر بـه طـور معنـی‌دار کـاهش یافـت. به‌طوری‌که این زمان از ۹ دقیقه در توان ۵۰۰ وات بـه ۷ دقیقـه در تـوان ۱۰۰۰ وات رسـید. فراینـد خشـک کردن با ماکروویو محتوای رطوبتی اولیـه گیـاه علـف طلایی ٦۸/٦ درصد بر پایه وزن تر و به عبارت دیگـر تقریباً ۲/۱۸ بر پایـه وزن خشـک کـاهش داد و مـدت زمان خشک شدن در تیمار مایکروویو برای توان‌هـای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ وات به‌ترتیب ۹ و ۷ دقیقه بود. همچنین

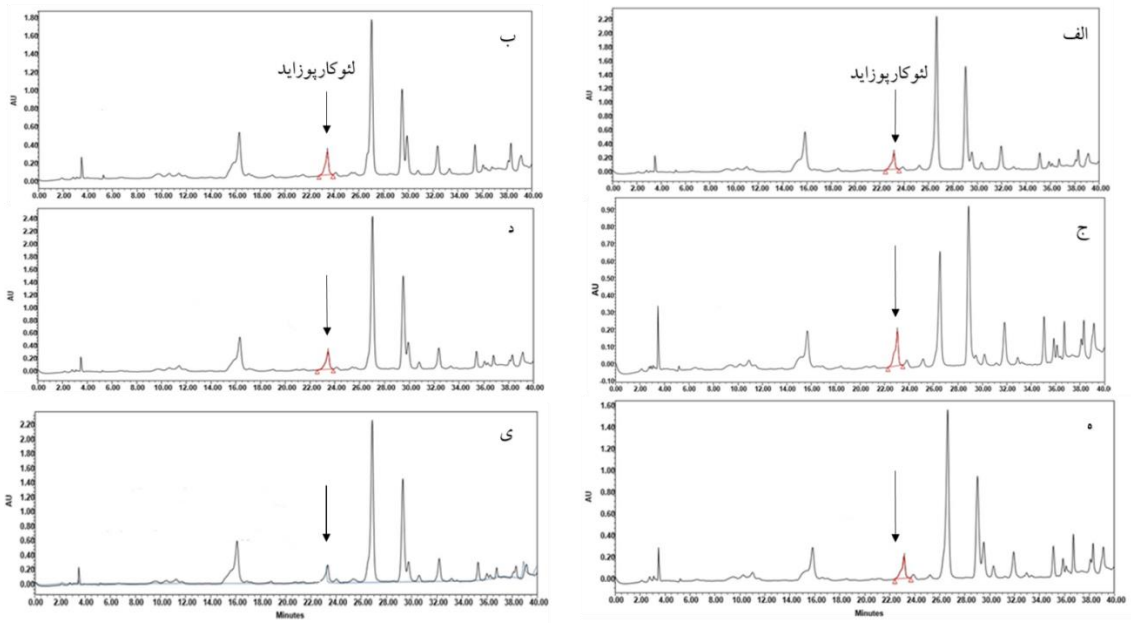
مـدت زمـان خشـک کـردن در روش مـایکروویو بخصوص تـوان ۱۰۰۰ وات در مقایسـه بـا روش آون (با مدت زمان ۵ و ۱۲ ساعت) کوتاه‌تـر بـود (جـدول ۲). براساس نمودار کاهش محتوای رطوبتی گیاه علف طلایی در برابر زمان (شـکل ۳)، در روش خشـک بـا آون، فرآیند خشک کردن با توجه به دماهای گوناگون، از ۵ تا ۱۲ ساعت متفاوت بـود و افـزایش دمـای آون ارتبط مستقمی با افزایش شیب منحنی کاهش محتوای رطوبتی داشت. همچنین مدت زمان خشک کـردن بـا افزایش دما، به طور معنی‌داری کاهش یافـت. نمـودار کاهش رطوبت علـف طلایـی در طـول دوره خشـک کردن در روش طبیعی سایه و آفتاب در شکل ۳ آورده شده است. فرآیند خشک کـردن در روش طبیعـی بـه ترتیب در روش آفتاب و سایه ٤٦ و ٦٠ ساعت بود.



شکل ۳: مقایسه میانگین محتوای فنل کل (الف) و فلاونوئید کل (ب) تحت تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن

محتوای فنل و فلاونوئید کل: براساس نتـایج تجزیـه واریانس (جدول ۱)، اثر روش‌های خشک کردن تـاثیر معنی‌دار در سطح یک درصد بر مقـدار کـل ترکیبـات فنلی داشت. مقایسه میانگین محتوی فنل نشان داد کـه بیشترین میزان فنل به‌ترتیب در روش خشک کردن در سایه (۳۰ میلی‌گرم بر گرم پـودر خشـک)، دمـای ٤٠ درجه سانتی‌گراد آون (۲۷/۹۳ میلی‌گرم بر گـرم پـودر خشـک)، دمـای ۵۰ درجـه سـانتی‌گـراد آون (۲۷/۵۷ میلی‌گرم بر گـرم پـودر خشـک) و خشـک کـردن در آفتاب (۲۷/٤٠ میلی‌گرم بر گرم پودر خشک) بدسـت آمد. همچنین کمترین محتوی فنل در توان‌های ۵۵۰ و ۱۰۰۰ وات میکروویو بدست آمد که به‌ترتیـب ۲۲/٤۳ و ١٦/٢٢ میلی‌گرم بر گرم پودر خشک بود (شکل ٤).

شکل ٤: مقایسه میانگین محتوای لئوکارپوزاید تحت تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن



شکل ٥: کروماتوگرام HPLC-UV مربوط به عصاره گیاه علف طلایی در طول موج ۲۱٦ نانومتر برای روش‌های خشک کردن در آفتاب (الف)، سایه (ب)، آون ٤٠ درجه‌سانتی‌گراد (ج)، آون ٥٠ درجه سانتی‌گراد (د)، مایکروویو ٥٥٠ وات (ه) و مایکروویو ۱۰۰۰ وات (ی).

براساس نتایج جدول ۱، محتوای کل فلاونوئیدها به طور معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد تحت تاثیر روش‌های خشک کردن قرار گرفت. مقایسه میانگین محتوای فلاونوئید نشان داد که بیشترین میزان فلاونوئید به ترتیب در روش خشک کردن در دمای ٤٠ درجه سانتیگراد آون، آفتاب، سایه، دمای ٥٠ درجه سانتی‌گراد آون، توان ٥٥٠ وات مایکروویو و ۱۰۰۰ وات مایکروویو به‌ترتیب ۷/۹۵، ۷/۸۹، ۷/۸۷، ۷/٦۱، ٦/٦٥ و ٦/۸۱ میلی‌گرم بر گرم پودر خشک بود، به طوری‌که بیشترین میزان آن در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد آون و کمترین آن در توان ۱۰۰۰ وات مایکروویو بود (شکل ٤).

محتوای لئوکارپوزاید: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) بیانگر آن است که اثر روش‌های خشک کردن بر مقدار لئوکارپوزاید در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین محتوای لئوکارپوزاید

نشان داد که بیشترین محتوای این ترکیب در روش خشک کردن در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد آون (۳/۰۷ میلی‌گرم بر گرم پودر خشک) بدست آمد. روش‌های خشک کردن در آفتاب، سایه و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد آون (به ترتیب ۲/٤٦، ۲/۵۱ و ۲/۵ میلی‌گرم بر گرم پودر خشک) از نظر محتوی لئوکاپوزاید در حد وسط قرار گرفتند. کمترین میزان این ماده در توان‌های ۵۵۰ و ۱۰۰۰ وات میکروویو (به ترتیب ۲/۱۱ و ۱/۹۵ میلی‌گرم بر گرم پودر خشک) حاصل شد (شکل ۵).

بحث

گیاهان دارویی به شکل تازه و خشک مورد استفاده قرار می‌گیرند. فرآیند پس از برداشت از قبیل خشک کردن باعث تغییرات قابل توجهی در ظاهر و کیفیت خصوصیات فیزیکوشیمیایی محصولات گیاهی می‌شود (Chua et al., 2019). خشک کردن شامل حذف رطوبت با استفاده از عمل تبخیر تا حد رسیدن به یک آستانه خاص است که منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌های میکروبی و به حداقل رساندن واکنش‌های بیوشمیایی می‌شود. همچنین وزن و حجم نمونه‌ها را کاهش می‌دهد و در نتیجه موجب کاهش هزینه‌های حمل‌ونقل و انبارداری می‌گردد (Saifullah et al., 2019). علاوه بر این، خشک کردن می‌تواند ساختار فیزیکی بافت گیاه را تغییر دهد که منجر به افزایش عملکرد استخراج مواد موثره می‌شود. از طرفی دیگر خشک کردن می‌تواند تاثیرات نامطلوبی بر اجزای گیاهی و ترکیبات فیتوشمیایی به ویژه ترکیبات حساس به دما داشته باشد (Nguyen et al., 2018).

چگونگی گرم شدن مواد گیاهی در تیمار با مایکروویو نسبت به سایر روش‌های مرسوم خشک کردن متفاوت است و حرارت ایجاد شده در داخل ماده گیاهی در اثر تکرار برخورد یون‌های قرار گرفته در میدان الکتریکی به وجود می‌آید. در سایر روش‌های متداول انرژی حرارتی از منبع حرارتی خارجی به مواد گیاهی منتقل و انتشار می‌یابد، در حالی‌که در روش مایکروویو قرار گرفتن مولکول‌های آب در راستای میدان الکتریکی سبب ایجاد اصطکاک و تولید حرارت در ماده گیاهی و در نتیجه انرژی حرارتی به وسیله فرآیند جابجایی و هدایت به سایر قسمت‌ها دیگر گیاه نیز انتقال پیدا می‌یابد (Ng et al., 2020). بنابراین، احتمالاً مکانسیم متفاوت انتشار حرارت در روش مایکروویو منجر به خشک شدن گیاه در این روش با زمان کوتاه‌تر شده است. نتایج مشابهی در مورد کاهش زمان خشک شدن با افزایش توان مایکروویو در آویشن دنایی (*Thymus daenensis* L.) و جعفری (*Petroselinum crispum* Mill) گزارش شده است (Arslan and Ozcan, 2012; Dehghani Mashkania et al., 2018).

نمودار کاهش محتوای رطوبتی گیاه علف طلایی اروپایی در برابر زمان نشان داد که شیب منحنی کاهش محتوای رطوبتی با افزایش دمای آون، افزایش یافت (شکل ۳). همچنین با افزایش دما، زمان خشک کردن به طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۲). نتایج پژوهش‌های در مورد مطالعه سینتیک خشک کردن نشان می‌دهد زمان خشک شدن وابسته به محتوی رطوبت گیاهی و دمای محیط است. در نتیجه، چنانچه میزان رطوبت گیاه کمتر باشد، گیاه سریع‌تر خشک می‌شود و از طرف دیگر افزایش دماهای محیط با تسریع فرآیند تبخیر در گیاه سبب کاهش مدت زمان خشک کردن خواهد شد (Chua et al., 2019). از آنجاکه رطوبت اولیه نمونه‌ها تقریبا یکسان بود، این‌گونه به نظر می‌رسد تفاوت در مدت زمان خشک کردن با اثر انتقال حرارت و دما در ماده گیاهی در نتیجه دماهای مختلف آون مرتبط باشد که نتایج مشابهی نیز بر روی گیاه دارویی *Orthosiphon staminiues* Benth. و *Arnica chamissonis* Less

گزارش شده است (Asadi et al., 2020; Abdullah et al., 2011).

کاهش هزینه‌های مربوط به مصرف انرژی در روش‌های خشک کردن طبیعی(در شرایط آفتاب و سایه) اهمیت زیادی دارد ولی با این حال، معایبی از قبیل عدم امکان جابجایی مقادیر زیاد ماده گیاهی و دستیابی به استانداردهای ثابت کیفیت را نیز به دنبال خواهد داشت (Shahdadi et al., 2011). نمودار کاهش رطوبت علف طلایی اروپایی در طول دوره خشک کردن در روش طبیعی سایه و آفتاب در شکل ۳ آورده شده است. فرآیند خشک کردن در روش طبیعی به ترتیب در روش آفتاب و سایه ٤٦ و ٦٠ ساعت بود (جدول ۲). در پژوهش دیگری زمان خشک کردن بابونه (*Matricaria recutita*) در سایه را ۱۲۰ ساعت گزارش کردند (Azizi et al., 2009).

ترکیبات فنلی به‌عنوان یکی از بزرگترین گروه‌های متابولیت‌های ثانویهٔ گیاهی، عمدتاً دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند و خواص ارزشمند ضد ویروس، ضدمیکروبی، ضد سرطان و ضد جهش دارند (Ng et al., 2020). بررسی مسیر شیکیمات به عنوان مسیر اصلی بیوسنتز ترکیبات فنلی، بیانگر ارتباط مسیرهای متابولیکی اولیه و ثانویه در گیاه است؛ چنانکه کربوهیدرات حاصل از متابولیسم اولیه گیاه به عنوان پیش مادهٔ سنتز اریتروز-٦ فسفات با تولید شیکمیک اسید به آغاز مسیر شیکیمات منجر می‌شود (Papoutsis et al., 2017). در بین تمامی روش‌های خشک کردن بیشترین میزان فنل کل در سایه و کمترین آن در مایکروویو (۱۰۰۰ وات) حاصل شد (شکل ٤). گزارش‌های مختلفی در مورد تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن بر محتوی فنلی گیاهان، نتایج متفاوتی از قبیل کاهش (Chan et al., 2009)، افزایش (Hayat et al., 2010) و یا عدم تغییر معناداری (Abdullah et al., 2011) این متابولیت‌ها را نشان می‌دهد. در پژوهش Arsalan و همکاران (۲۰۱۰) کم‌ترین میزان فنل کل مربوط به نمونه‌های خشک شده در آون بود در حالی که نمونه‌های خشک شده در تیمار آون-مایکروویو و پس ز آن تیمار آفتاب بیش‌ترین میزان فنل کل را داشتند. افزایش دمای خشک کردن به دلیل اثر تخریبی دماهای بالا بر روی ترکیبات فنلی، می‌تواند موجب کاهش محتوای این مواد در گیاه شود (Asadi et al., 2020).

در این مطالعه بالاترین میزان فلانوئید کل در آون (دمای ٤٠ درجه‌سانتی‌گراد) و کمترین آن در مایکروویو (۱۰۰۰ وات) بدست آمد (شکل ٤). فلاونوئیدها گروهی از مشتقات ترکیبات فنلی هستند که از پیش ساخت های شیکیمات، استات و ترکیبات چالکن تولید می‌شوند (Qin et al., 2017).

مقایسه اثر توان‌های متفاوت مایکروویو در زمان‌های مختلف بر روی ترکیبات فلاونوئیدی در گیاه کلمانتین (*Citrus reticulata*) نشان داد که افزایش توان مایکروویو و مدت زمان خشک کردن سبب کاهش شدید میزان ترکیبات فلاونوئیدی شد که دلیل آن تاثیر مخرب امواج الکترومغناطیسی مایکروویو بر ساختار فلاونوئیدها بیان شد (Hayat et al., 2010). گرما در ماده گیاهی توسط امواج الکترومغناطیسی مایکروویو به وسیله دو مکانیسیم چرخش دوقطبی و پلاریزاسیون یونی ایجاد می‌شود. در فرآیند پلاریزاسیون یونی، حرکت یون‌های منفی و مثبت به سمت بار مخالف و تکرار برخورد یون‌ها موجب ایجاد حرارت خواهد شد.

امواج الکترومغناطیسی مایکروویو با دو مکانیسم پلاریزاسیون یونی و چرخش دو قطبی سبب ایجاد گرما در مادهٔ گیاهی می شوند. ایجاد حرارت از طریق پلاریزاسیون یونی شامل حرکت یون های مثبت و منفی به سمت بار مخالف و تکرار تصادم یون هاست. چرخش دو قطبی نیز به علت وجود مولکول های

قطبی (مانند مولکول آب) که به واسطه داشتن دو گروه هیدروکسیل و ساختار قطبی که دارند، است (Saifullah et al., 2019). در نتیجه، فلاونوئیدها با دارابودن چنین ساختار و گروه های عاملی، نسبت به میدان الکترومغناطیسی تولید شده در مایکروویو حساس به نظر می رسند و احتمالاً توان های بالای مایکروویو موجب تخریب این ساختار و کاهش میزان فلاونوئیدهای کل می‌شوند. بر این اساس، می‌توان نتیجه گرفت که افزایش مقدار فلاونوئید کل به‌دلیل غیرفعال شدن آنزیم‌های مؤثر در تخریب و تجزیه این ترکیبات در تیمار آون ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد پس از مایکروویو ۵۰۰ و۱۰۰۰ وات بوده است، چنانکه آون ٤٠ درجهٔ سانتی گراد نیز با فراهم کردن دمای مناسب برای فعالیت این آنزیم ها کمترین محتوی فلاونوئید در بین تیمارها را دارد. این مساله در مورد کوئرستین نیز در نتایج پژوهشی مشاهده شد (Dehghani Mashkania et al., 2018). همچنین Abdullah و همکاران (۲۰۱۲)، گزارش کردند که بازده ترکیبات فلاونوئیدی در برگ چای جاوا در روش خشک کردن در آون با ٤٠ درجه سانتی‌گراد نسبت به روش های خشک کردن در سایه و آفتاب بالاتر بود که با نتایج خشک کردن در آون مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج بدست آمده از این تحقیق حاکی از آن است که روش‌های مختلف خشک کردن بر مدت زمان خشک کردن، میزان فنل کل، فلاونوئید کل و لئوکارپوزاید گیاه علف طلایی اثر معنی‌داری داشت. خشک کردن به علت تاثیر در محتوی مواد موثره گیاهی، کیفیت گیاه دارویی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان چنین بیان کرد که افزایش توان مایکروویو و افزایش دمای آون در فرآیند خشک کردن علف طلایی اروپایی، منجر به کاهش محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و لئوکارپوزاید عصاره گردید. در بین روش‌های مورد مطالعه، تیمار خشک کردن در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد، سایه و آفتاب بیشترین میزان فنل کل، فلاونوئید و لئوکارپوزاید را نشان دادند. کمترین میزان نیز برای صفات مورد مطالعه تیمار خشک کردن در مایکروویو با توان ۱۰۰۰ وات مشاهده گردید.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید بهشتی انجام شده است که نویسندگان مقاله، کمال تشکر و قدردانی را ابراز می‌نمایند. همچنین از سرکار خانم شیرین گودرزی جهت همکاری در آنالیزهای فیتوشیمیایی تشکر و قدردانی می‌نمائیم.

Reference

1. Abdullah, S., Ahmad, M.S., Shaari, A.R. and Johar, H.M. 2011. Drying characteristics and herbal metabolites composition of misai kucing (*Orthosiphon staminiues* Benth.) leaves. In: Proceedings of International conference on food engineering and biotechnology, 7th-9th May, Bangkok, Thailand.
2. Abdullah, S., Shaari, A. R. and Azimi, A. 2012. Effect of drying methods on metabolites composition of Misai kucing (*Orthosiphon stamineus*) leaves. Sciverse science direct, 2: 178-182.
3. Arslan, D., Ozcan, M.M. and Okyay Menges, H. 2010. Evaluation of drying methods with respect to drying parameters, some nutritional and colour characteristics of peppermint (*Mentha* × *piperita* L.). Energy Conversion and Management, 51: 2769- 2775.
4. Asadi, M., Nejad Ebrahimi, S., Hatami, M. and Hadian, J. 2020. Changes in secondary metabolite contents of *Arnica chamissonis* Less. in response to

different harvest time, flower developmental stages and drying methods. Journal of Medicinal Plants, 19 (76): 69-88.
5. Azizi, M., Rahmati, M., Ebadi, T. and Hasanzadeh Khayyat, M. 2009. The effects of different drying methods on weight loss rate, essential oil and chamazolene contents of chamomile (*Matricaria recutita*) flowers. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 25(2): 182-192.
6. Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Wong, S.K., Lim, K.K., Tan, S.P., Lianto, S.F. and Yomg, M.Y. 2009. Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. Food Chemistry, 113: 166-172.
7. Chua, L.Y.W., Chong, C.H., Chua, B.L. and Figiel, A. 2019. Influence of drying methods on the antibacterial, antioxidant and essential oil volatile composition of herbs: a review. Food Bioprocess Technology, 12: 450–476.
8. Crozier, A., Clifford, M. and Ashihara, H. 2006. Plant secondary metabolites occurrence, structure and role in the human diet. Black well publishing. United Kingdom. 353 p.
9. Dehghani Mashkania, M.R., Larijani, K., Mehranfarian, A. and Naghdi Badi, H. 2018. Changes in the essential oil content and composition of *Thymus daenensis* Celak. Under different drying methods. Industrial Crops & Products, 112: 389-395.
10. Dewick, P. 2009. Medicinal natural products a biosynthetic approach. John Wiley and Sons, Ltd, Publication. United Kingdom. 509 p.
11. Hassanpouraghdam, M.B., Hassani, A., Vojodi, L. and Farsad-Akhtar, N. 2010. Drying method affects essential oil content and composition of basil (*Ocimum basilicum* L.). Journal of Essential Oil Bearing Plants, 13(6): 759-766.
12. Hassanzadeh, K., Hemmati, Kh. and Mehdi Pour, M. 2018. The effect of different drying methods (natural and oven) on the drying time and some secondary metabolites of Melissa (*Melissa officinalis* L.). Journal of Plant Production Research, 25(1): 143-137.
13. Hayat, Kh., Zhang, X., Farooq, U., Abbas, Sh., Xia, Sh, Jia, Ch., Zhong, F. and Jing, Zh. 2010. Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of *Citrus mandarin* pomace. Food Chemistry, 123(2): 423-429.
14. Kamtekar, S., Keer, V. and Patil, V. 2014. Estimation of phenolic content, flavonoid content, antioxidant and alpha amylase inhibitory activity of marketed polyherbal formulation. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 4(09): 61-65.
15. Martinov, M., Oztekin, S. and Muller, J. 2007. Drying: 85-97. In: Oztekin, S., and Martinov, M.,(Eds.). Medicinal and aromatic crops. CRC Press,United States of America, pp.320.
16. Moosavian, M.T. and Mohammadpoor, V. 2006. Investigation of effective parameters in drying process of food materials by microwave. In: Proceedings of 6th National student congress f Chemistry Engineering & 5th National Student Congress of Oil Engineering, 29-30 th August, Isfahan, Iran.
17. Mozafarian, V. 2012. Identification of medicinal and aromatic plants of Iran. Tehran, Iran: Farhang Moaser Press.1444p.
18. Mumivand, H., Rezaei Nejad, H., Taghipour, Sh., Sepahvand, K. and Moradi, B. 2020. Effect of different drying methods on drying time and some phytochemical characteristic of *Pelargonium* (*Pelargonium graveolens*). Journal of Horticultural Science, 33(4): 655-668.
19. Ng, Z.X., Yong, P.H. and Lim, S.Y. 2020. Customized drying treatments increased the extraction of phytochemicals and antioxidant activity from economically viable medicinal plants. Industrial Crops & Products, 155: 112815.
20. Nguyen, K.Q., Vuong, Q.V., Nguyen, M.H. and Roach, P.D. 2018. The effects of drying conditions on bioactive compounds and antioxidant activity of the Australian maroon bush, *Scaevola*

spinescens. Journal of Food Processing and Preservation, 42 (10): 323-338.
21. Omidbaigi, R. 2010. Approaches to production and processing of medicinal plants. Beh nashr Press, 347p.
22. Papoutsis, K., Pristijono, P., Golding, J.B., Stathopoulos, C.E., Bowyer, M.C., Scarlett, C.J. and Vuong, Q.V. 2017. Effect of vacuum-drying, hot air-drying and freeze-drying on polyphenols and antioxidant capacity of lemon (*Citrus limon*) pomace aqueous extracts. International Journal of Food Scenic and Technology, 52: 880–887.
23. Qin, R.L., Lv, C.N., Zhao, Y.D., Yu, Y. and Lu, J.C. 2017. Assessment of phenolics contents and antioxidant properties in *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim during drying process. Industrial Crops & Products, 107: 288-296.
24. Rozdar, F., Azizi, M., Ghani, A. and Davari Nejad, CH. 2014. Effect of different drying methods on drying time and some phytochemical properties of *Mentha* (*Mentha piperita* L.). Journal of Horticultural Science, 28(3): 407-415.
25. Saifullah, M.D, Mc-Cullum, R., Mc-Cluskey, A. and Vuong, Q. 2019. Effects of different drying methods on extractable phenolic compounds and antioxidant properties from lemon myrtle dried leaves. Heliyon, 5 (12): e03044.
26. Salehi, P., Asghari, B., Esmaeili, M. A., Dehghan, H., and Ghazi, I., 2013. α-Glucosidase and α-amylase inhibitory effect and antioxidant activity of ten plant extracts traditionally used in Iran for diabetes. Journal of Medicinal Plants Research, 7(6): 257-266.
27. Shahdadi, F., Mirzaie, H.A., Maghsadllo, Y., Ghorbani, and Daraie garme khani, A. 2011. Effect of drying process on the phenolic-compounds content and antioxidant activity of two varieties of date-palm fruit Kaluteh and Mazafati. (*Phoenix ductylifera*), Journal of Nutrition Sciences and food industry Iran, 6(3): 67-74.
28. Soysal, Y. (2004). Microwave drying characteristics of parsley. Biosystems Engineering, 89(2), 167-173.
29. Soysal, Y., Oztekin, S. and Eren, O. 2006. Microwave drying of parsley: modelling, kinetics, and energy aspects. Biosystems Engineering, 93(4): 403-413.
30. Tabrizi, L., Dezhban, F., Mostofi, Y. and Moridi Farimani, M. 2015. Variability of physical and phytochemical criteria of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) flowers under different drying methods and plant nutrient source. Iranian Journal of Horticultural Science, 46(2): 243-258.
31. Vega-Galvez, A., Scala, K.D., KLemus-Mondaca, R., Miranda, M., Lopez, J. and Perez-Won, M. 2009. Effect of airdrying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annuum* L. var. Hungarian). Food Chemistry, 117(4): 647- 53.
32. Yaneva, Z.L., Simeonov, E.B. and Ivanova, D.G. 2020. In vitro Ultraviolet-B radiation mediated antioxidant response of Bulgarian Goldenrod (*Solidago virgaurea* L.) extract. Bulgarian Chemical Communications, 52: 33-40.

Effects of different drying methods on drying time and some phytochemical traits of *Solidago virgaurea* L.

Parsafar, S.[1], Eghlima, GH.[2], Mirjalili, MH.[3], Nejad Ebrahimi, S.[3], Hadian, J.[4*]

[1]MSc, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran,

[2]Assistant Professor, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran,

[3]Associate Professor, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran,

[4]Associate Professor, Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran,

Received: 25-7-2021; Accepted: 16-1-2022

Abstract

To investigate the effect of different drying methods on the *Solidago virgaurea* L., an experiment based on a completely randomized design with six treatments and three replications was conducted in 2018 in the Ecophysiology Laboratory of Shahid Beheshti University of Tehran. In this study, aerial parts of *S. virgaurea* L. was harvested from Sangdeh natural habitat located in Mazandan province at full flowering stage. The drying methods were shade and sun-drying (natural drying), oven-drying (40 and 50 °C), and microwave-drying (550 and 1000 watt). In all methods, drying of the plant materials was continued until the moisture content reached 10% (based on plant fresh weight). Methanolic extract was obtained from the dried samples and some secondary metabolites including content of total phenol, total flavonoid and leiocarposide were measured by Folin-Ciocalteu method, aluminum chloride method, and high-performance liquid chromatography (HPLC), respectively. The minimum (7 minutes) and maximum (60 hours) drying times were related to 1000 watt microwave drying and shade drying methods, respectively. The highest content of total phenol (30 mg Gallic acid /g DW) in shading drying treatment and the highest content of total flavonoids (7.95 mg Rutin/g DW) and leiocarposide (3.07 mg/g DW) was observed in the oven at 40 °C. In addition, active metabolites content decreased with increasing microwave power and oven temperature. In general, the correct choice of drying method depends on several factors, and among them, the type of active ingredient, optimal energy consumption and cost savings should also be considered.

***Keywords*:** Drying, Leiocarposide, Phenolic compounds, *Solidago virgaurea* L.

*Corresponding author; javadhadian@gmail.com