Food Hygiene, Vol. 13, No. 50, Summer 2023

"Research article" **DOI: 10.30495/JFH.2023.1979539.1390**

Effect of the solvent types and extraction conditions on the quality and antimicrobial characteristics of *Paeonia officinalis L.* extract

Effect of Solvent and Extraction Conditions on Quality of *Paeonia officinalis L.* Extract

Yaghobi Koupaei, Z.[1], Abbasi, H.[2]*

1- Master's degree Food Science and Technology, College of Agriculture and Natural Resources, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2- Associate Professor department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Natural Resources, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
*Corresponding author E-mail: H.Abbasi@Khuisf.ac.ir
(Received: 2023/4/9 Accepted: 2023/7/18)

Abstract

Paeonia officinalis L. is one of the species of the *Paeoniaceae* family. Its root has different effective compounds e.g., polyphenols, flavonoids, triterpenoids, tannins, and monoterpenes. It shows biological activities such as antibacterial, anti-oxidative, relaxing and anti-pain properties. This study evaluated the effect of three solvents, ethanol/water, water, and water/ethanol/hexane on extracting the active ingredients. These solvents were applied by the methods of immersion, immersion with ultrasonic waves, and the use of supercritical fluid carbon dioxide with auxiliary solvents. The efficiency, qualitative characteristics (pH, polyphenolic compounds and antioxidant properties) and antimicrobial properties of the extracts were evaluated by the well-diffusion method against *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella* Typhimurium and *Candida albicans.* Also, the MIC and MBC of the extracts on the activity of these organisms were determined. The results showed that the independent variables significantly affect the quantity and quality of the produced extracts ($P \leq 0.05$). Using the water/ethanol, and the immersion method in combination with ultrasonic waves, the highest extract efficiency (17.66± 0.34), of the phenolic compounds (33.5±0.65) and antioxidant property (76±1.44) was obtained. The diameter of the inhibition zone for *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* in the vicinity of this sample was more than others. Meanwhile, the inhibition zone of *S.* Typhimurium was larger in the presence of watery extract using the immersion method. The quantity and quality of the extract using supercritical fluid was lower than others.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: *Paeonia officinalis*, ultrasonic waves, supercritical fluid, antioxidant

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2023.1979539.1390

ارزیابی تاثیر نوع حلال و شرایط استخراج بر ویژگی‌های کیفی و آنتی‌میکروبی عصاره فاوانیا (*Paeonia officinalis L.*)

ارزیابی حلال و شرایط استخراج بر کیفیت عصاره فاوانیا

زهرا یعقوبی‌کوپائی[۱]، هاجر عباسی[۲*]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۲- دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

*نویسندهٔ مسئول: H.Abbasi@Khuisf.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱/۲۰ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۴/۲۷)

چکیده

گیاه عودالصلیب، با نام علمی *Paeonia officinalis L.* یکی از گونه‌های متعلق به خانواده *Paeoniaceae* است. ریشه گیاه عودالصلیب دارای ترکیبات مؤثره متفاوتی از جمله فنل‌ها، فلاونوئیدها، تری‌ترپنوئیدها ،تانن‌ها، مونوترپن‌ها و فعالیت‌های بیولوژیکی متنوعی از جمله اثرات ضدباکتری، ضد اکسیداتیو، آرامش‌بخش و ضددرد می‌باشد. در این مطالعه ارزیابی تاثیر سه حلال آب، اتانول/آب، و آب/اتانول/هگزان در استخراج مواد مؤثره ریشه گیاه عودالصلیب در سه روش غوطه‌وری، غوطه‌وری به‌همراه اعمال امواج اولتراسونیک و استفاده از سیال فوق بحرانی دی‌اکسیدکربن به همراه حلال‌های کمکی مذکور بر راندمان بر ویژگی‌های کیفی (pH، محتوی ترکیبات پلی‌فنولیک و خواص آنتی‌اکسیدانی) و خواص ضدمیکروبی عصاره‌های حاصل بر *اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی‌موریوم و کاندیدا آلبیکانس* ارزیابی شد. همچنین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی عصاره‌ها معین گردید. نتایج نشان داد که نوع حلال مورد استفاده و شرایط استخراج عصاره بر کمیت و کیفیت عصاره‌های تولید شده تاثیر معنی‌داری دارد ($p \leq ۰/۰۵$). با استفاده از آب/اتانول و در روش غوطه‌وری با اعمال امواج اولتراسونیک بیش‌ترین راندمان استخراج عصاره (۱۷٫۰±۷٫۳) با بالاترین محتوی ترکیبات فنولیک (۳۳٫۰±۵٫۶) و خاصیت آنتی‌اکسیدانی(۷۶/۱±۰/۴) حاصل شد. حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی این عصاره برای اغلب میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه کمتر از سایر نمونه‌ها بود و قطر هاله عدم رشد *اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس* و *کاندیدا آلبیکانس* در مجاورت این نمونه بیش از سایر عصاره‌ها ارزیابی شد. درحالیکه هاله عدم رشد *سالمونلا تیفی‌موریوم* در اثر مجاورت با عصاره استخراج شده در آب در روش غوطه‌وری قطر بیشتری داشت. کمیت و کیفیت عصاره مستخرج با سیال فوق بحرانی نسبت به سایر روش‌ها کمتر بود.

واژه‌های کلیدی: عودالصلیب، امواج اولتراسونیک، سیال فوق بحرانی، آنتی‌اکسیدان

مقدمه

محصولات طبیعی حاصل از گیاهان دارویی یکی از مهم‌ترین منابع اولیه برای تهیه مواد آرایشی، عطرسازی، ترکیبات طعم‌دهنده، رنگ‌ها و هم‌چنین داروها هستند (Nematollahi *et al.*, 1391). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی امروزه بیش از ۸۰ درصد مردم جهان برای درمان بیماری‌ها از داروهایی با منشاء گیاهی استفاده می‌کنند و تقریباً یک چهارم داروهای تهیه شده در دنیا منشاء گیاهی دارند.

گیاه عودالصلیب، با نام علمی *Paeonia officinalis L.* یکی از گونه‌های متعلق به خانواده *Paeoniaceae* است. این گیاه علفی و دارای ساقه‌های گوشتی و خوابیده روی زمین می‌باشد (Jahanshahi Afshar, 1391). عودالصلیب عمدتاً در آسیا پراکنده است و خاستگاه اصلی آن کشور چین می‌باشد. گیاه دارای گل‌هایی به رنگ زرد، سفید، قرمز می‌باشد و از گل این گیاه با نام گل صد تومانی یاد می‌شود. دانه‌های این گیاه دارای اسیدهای چرب غیراشباع و روغن‌های ضروری هستند و دارای خواص درمانی و خوراکی می‌باشد. ریشه گیاه عودالصلیب دارای ترکیبات مؤثره متفاوتی از جمله فنل‌ها، فلاونوئیدها، تری‌ترپنوئیدها ،تانن‌ها، مونوترپن‌ها، می‌باشد. فعالیت‌های بیولوژیکی متعددی از جمله اثرات ضدباکتری، ضد اکسیداتیو، آرامش‌بخش و ضددرد برای آن گزارش شده است (Gao *et al*., 2017; Yan *et al*., 2022).

نیاز جامعه بشری به استخراج ترکیبات موثره گیاهی سبب انجام پژوهش‌های گسترده‌ای در زمینه‌ی معرفی فرآیند استخراجی کارآمدتر و اقتصادی شده است (Moshari-Nasirkandi *et al*., 2020). شرایط استخراج، کیفیت و کمیت ماده مستخرج را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Saboora., 2014). در عصاره حاصل از گیاه مرزنجوش با سه روش سوکسله، سیال فوق بحرانی و تقطیر با بخار آب، تفاوت‌های بسیاری از نظر نوع ترکیبات و ویژگی‌های کیفی مشاهده شد (Vegi *et al.*, 2002). تاثیر استخراج به کمک امواج اولتراسونیک و سیال وفوق بحرانی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیمی قارچ خوراکی نیز نشان داد که تغییر روش استخراج تاثیر زیادی بر محتوی ارگوسترول عصاره حاصل ایجاد می‌کند (Milovanovic *et al*., 2020). در روش استخراج با حلال، نوع، ترکیب و ویژگی‌های حلال نیز بر کیفیت ماده استخراج شده تاثیر قابل توجهی دارد(Sabora., 2014). اعمال تیمارهایی مانند هم‌زدن، حرارت دادن، استفاده از امواج اولتراسونیک و ... به منظور بهبود کمیت و کیفیت مواد مستخرج از گیاه درراستای افزایش کمیت و کیفیت ماده استخراج شده می‌تواند بسیار مفید باشد (Shirani *et al*., 1400).

اعمال امواج اولتراسونیک با افزایش امکان انتقال جرم بین حلال و ماده، فرآیند استخراج را بهبود می‌بخشد. فروپاشی حباب‌های کاویتاسیون منجر به شکست بهتر سلول از طریق تشکیل میکروجت‌ها، نفوذ بهتر حلال به داخل سلول‌های گیاه، افزایش انتقال جرم، وابستگی کم‌تر فرایند به حلال، امکان استخراج در دمای پایین‌تر و در بسیاری از موارد بازده بیش‌تر ماده مؤثره می‌گردد (Tiwari, 2015). اعمال امواج اولتراسونیک در تولید اسانس‌های روغنی از گیاهان معطر مانند نعناع، درمنه و اسطوخودوس و گل‌های مرکبات به‌کارگرفته شده است (Soria and Villamiel, 2010). شایان ذکر است که تاثیرگذاری این امواج بسته به نوع نمونه و

شرایط اعمال تیمار متفاوت است و لازم است شرایط مناسب استخراج برای هر نمونه مورد مطالعه قرار گیرد. به‌کارگیری سیالات فوق بحرانی، یکی دیگراز روش‌های مناسب در استخراج مواد مؤثره گیاهان است. در فشار و دمای بالاتر از حالت بحرانی، سیالات حلالیت بالایی برای استخراج مواد سبک وزن و عموما دارای قطبیت اندک دارند و البته تحت تاثیر دما و فشار تغییر یافته، احتمال استخراج ترکیبات متفاوتی را فراهم می‌کنند. از این روش در استخراج کافئین از دانه‌های قهوه سبز، تولید عصاره آبجو، بهبود بو و مزه گیاهان و ادویه‌جات و استخراج و تفکیک جزء به جزء روغن‌های خوراکی و حذف مواد آلاینده و موارد دیگر استفاده شده است (Gorbani *et al.*, 1394). قدرت حلالیت بالا، بی‌اثر بودن بر فرآورده، جداسازی آسان از نمونه، ارزان بودن، فشار بحرانی پایین و افزایش عملکرد از ویژگی‌های سیالات مورد استفاده در این روش است (khajenoori and haghighi, 1393). استفاده از حلال‌های کمکی در راستای استخراج بهتر ترکیبات مؤثره موردنظر خصوصا ترکیبات قطبی می تواند بسیار مؤثر باشد (Nomanbhay *et al.*, 2018).

هدف از این پژوهش، ارزیابی تاثیر سه حلال اتانول ۵۰ درصد ،آب ، هگزان، اتانول، آب در استخراج مواد مؤثره ریشه گیاه عودالصلیب در سه روش غوطه-وری، غوطه‌وری به‌همراه اعمال امواج اولتراسونیک و استفاده از سیال فوق بحرانی دی‌اکسیدکربن به همراه حلال‌های کمکی مذکور می‌باشد. در این راستا پس از استخراج عصاره، ویژگی‌های کیفی و ضدمیکروبی آن‌ها ارزیابی می‌شود.

مواد و روش‌ها

-آماده‌سازی نمونه

ریشه گیاه *فاوانیا آفیسینالیس* از بازار گیاهان دارویی در شهرستان اصفهان تهیه گردید. نمونه توسط آسیاب برقی آسیاب گردید، از الکی با مش ۴۵ عبور داده شد و در شرایط سرد و خشک نگهداری گردید.

-مواد مورد نیاز

ترکیبات شیمیایی مورد استفاده از جمله هگزان، اتانول، توین۸۰، فولین سیوکالتیو،۲،۲ دی فنیل -۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، کربنات سدیم، متانول، فنل فتالین، اسید گالیک، هیدروکسید سدیم از شرکت مرک آلمان و میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکو اورئوس* (ATCC25923)، *اشریشیا کلی* (ATCC25922)، *کاندیدا آلبیکانس* (J 905)، *سالمونلا تیفی‌موریوم* از شرکت زیست یاخته (اصفهان، ایران) تهیه شدند.

-استخراج عصاره‌گیری از ریشه گیاه فاوانیا

استخراج عصاره ریشه گیاه فاوانیا با استفاده از آب، اتانول ۵۰ درصد و مخلوط آب / اتانول/ هگزان (۴۰،۴۰،۲۰) در روش غوطه‌وری انجام گرفت. برای این منظور، ۱۵۰ گرم از نمونه آسیاب شده با ۶۰۰ میلی لیتر حلال مخلوط و به مدت ۴۵ دقیقه با استفاده از مگنت مغناطیسی همزده و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. مخلوط حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن تفکیک و توسط روتاری تحت خلأ (۴۰ درجه سانتی گراد، ۸۰ دور در دقیقه و به مدت ۲ساعت) حلال از عصاره جدا گردید (Vega *et al.*, 2017).

جهت بررسی تأثیر اعمال امواج اولتراسونیک بر استخراج، مخلوط حلال و نمونه پس از اتمام زمان

غوطه‌وری، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و با توان ۲۰۰ وات در معرض امواج اولتراسونیک قرار گرفتند.

استخراج عصاره فاوانیا با استفاده از دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی نیز انجام گرفت. در این مرحله از حلال‌های کمکی آب/اتانول ۵۰ درصد، آب، آب / اتانول/ هگزان (۴۰،۴۰،۲۰) استفاده شد. حلال کمکی در چند مرحله به لوله استخراج اضافه شدند و فرایند استخراج در دمای ۴۰ درجه و فشار ۱۷۰ انجام شد. عصاره استخراج شده در ظروف تیره رنگ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Vidovic *et al.*, 2021). راندمان استخراج عصاره‌های تولید شده در هر مرحله پس از حذف حلال و تنظیم محتوای مواد جامد محلول نمونه‌ها توسط رفرکتومترمدل (BPTR-100) بر ۵۰ BX° به روش وزنی اندازه‌گیری شد (Oladzade *et al.*, 1395; Hohen *et al.*, 2003).

-ارزیابی خواص شیمیایی عصاره‌ها

pH-

pH هر یک از عصاره‌ها با استفاده از دستگاه pH متر مدل (Ltd-shanghi. sanxin, China) ارزیابی شد (Sun *et al.*, 2019).

-اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک

میزان ترکیبات فنولیک موجود در عصاره‌ها با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو به روش رنگ‌سنجی اندازه-گیری شد. برای این منظور به ۰/۱ میلی‌لیتر از هر عصاره ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو (رقیق شده با آب به نسبت ۱۰:۱) افزوده و نمونه به مدت ده دقیقه در تاریکی قرارداده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۷/۵ درصد وزنی – حجمی) به مخلوط افزوده و پس از ۴۵ دقیقه نگهداری در تاریکی، جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر(Unico, Malaysia) در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. نتایج بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم نمونه گزارش شد (Fu *et al.*, 2022).

-ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره، ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره با ۳/۹ میلی‌لیترمحلول متانولی ۲،۲دی فنیل -۱-پیکریل هیدرازیل مخلوط گردید و پس از نگهداری نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی، جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد و درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH طبق رابطه ۱ محاسبه گردید (Yan *et al.*, 2021).

رابطه ۱

$$\text{درصد بازدارندگی (\%)} = \frac{\text{جذب شاهد} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب شاهد}} \times 100$$

-ارزیابی خصوصیات ضدمیکروبی عصاره‌ها

-آماده‌سازی سوسپانسیون میکروبی

جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی، پس از انجماد زدایی، سویه‌ها در محیط نوترینت براث فعال شدند و به منظور بررسی کلنی‌های خالص آن‌ها، از نمونه‌های باکتریایی بر محیط جامد تریپتیکاز سویا آگار کشت خطی داده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. *کاندیدا آلبیکانس* پس از انجمادزدایی، به محیط پوتیتو دکستروز براث وارد و به منظور بررسی کلنی‌های خالص، بر روی محیط جامد پوتیتودکستروزآگار کشت خطی داده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. سپس از کلنی‌های خالص هر باکتری و مخمر در آب مقطر استریل، سوسپانسیونی با کدورت معادل

استاندارد نیم مک فارلند تهیه و برای اطمینان از غلظت میکروارگانیسم‌ها، توسط دستگاه اسپکتوفتومتر، جذب آن‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید. تراکم میکروارگانیسم‌ها با غلظت cfu/ml $۱۰^{۸}$ × ۱/۵، می‌بایست جذبی معادل ۰/۱-۰/۰۸ داشته باشد (Yeasmin *et al*., 2016).

-روش انتشار از چاهک در آگار(Diffusion Method)

بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره گیاهان با روش انتشار از چاهک در آگار انجام شد بدین منظور ارزیابی اثرات ضد میکروبی بر باکتری‌های *استافیلو کوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *کاندیدا آلبیکانس* با روش انتشار چاهک در آگار انجام شد. به‌این‌منظور باکتری‌های مورد استفاده به مدت ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایشات فعال گردیدند و با استفاده از سوآپ استریل از سوسپانسون استاندار نیم مک فارلند هر میکروب در محیط کشت مولر هینتون آگار برای باکتری‌ها و پوتیتودکستروزآگار برای مخمر کشت چمنی انجام شد. سپس با استفاده از پیپت پاستور استریل، چاهک‌هایی با فاصله مناسب ایجاد و عصاره‌های استریل‌شده با فیلتر ۰/۴۵ میکرون در غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰٪ به چاهک‌ها اضافه شدند. از آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین به عنوان کنترل مثبت و از محیط کشت مولر هینتون براث به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. در مرحله بعد محیط کشت‌های حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و محیط کشت حاوی مخمر به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. پس از گذشت این زمان، کشت‌های میکروبی از نظر تشکیل یا عدم تشکیل هاله عدم رشد مورد بررسی قرارگرفتند و قطر هاله‌های تشکیل شده بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و گزارش گردیدند (Yeasmin *et al*., 2016).

-ارزیابی حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها

با استفاده از روش رقت لوله‌ای، حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌ها (MIC) و حداقل غلظت کشندگی آن‌ها (MBC) تعیین گردید. برای این منظور، ۱ میلی‌لیتر عصاره خالص به اولین لوله حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث اضافه گردید و پس از مخلوط کردن محتویات لوله با استفاده از شیکر لوله (Behdad, Iran) ، این کار تا لوله ششم ادامه یافت تا به ترتیب غلظت‌های مختلف عصاره تهیه شود. به هر کدام از رقت‌ها ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی (معادل استاندارد نیم مک فارلند) اضافه شد. یک لوله به عنوان کنترل مثبت و یک لوله به عنوان کنترل منفی درنظر گرفته شد. شاهد مثبت دارای محیط کشت حاوی باکتری یا مخمر، بدون عصاره و شاهد منفی دارای محیط کشت بدون باکتری یا مخمر بود. لوله‌های حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و لوله‌های حاوی مخمر به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. به علت رنگی بودن عصاره‌ها و به‌منظور افزایش دقت در عملکرد، از تمام لوله‌های تلقیح شده بر پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت انجام شد. برای این منظور۱۰ میکرولیتر از لوله‌ها به پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار انتقال داده شد و پلیت‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه انتقال یافت تا بعد از ۲۴ ساعت نتایج بررسی گردد. برای تعیین MIC وMBC مخمر نیز

همین روش انجام گردید و از محیط‌های پوتیتو دکستروز براث و پوتیتو دکستروز آگار استفاده شد. در هر مرحله لوله‌ها و پلیت‌ها ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری و سپس مورد بررسی قرار-گرفتند (Arulmozhi *et al*., 2018).

-روش تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایشات در این پژوهش در سه تکرار انجام گرفت و تجزیه و تحلیل نتایج در قالب طرح کاملا تصادفی-آزمون فاکتوریل توسط نرم‌افزار SAS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها بر مبنای حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ انجام و نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل رسم شدند.

یافته‌ها

-بررسی خواص فیزیکوشیمیایی عصاره‌ها

-راندمان استخراج

در میان تیمارهای مورد بررسی، استخراج با سیال فوق‌بحرانی با استفاده از حلال کمکی آب، نتواست عصاره ریشه فاوانیا را استخراج کند. راندمان عصاره‌گیری از سایر تیمارها ارزیابی و نتایج آن ارائه گردید. اثر مستقل متغیرها در جدول ۱ نشان می‌دهد که درصورت اعمال امواج اولتراسونیک بالاترین راندمان و در شرایط استخراج با سیال فوق بحرانی کمترین راندمان استخراج عصاره حاصل شده است. در مقایسه نوع حلال از نظر تاثیر بر راندمان استخراج، آب/ اتانول/ هگزان بالاترین و حلال آب پایین‌ترین راندمان استخراج را حاصل نمود. با اعمال امواج اولتراسونیک و با به‌کارگیری حلال‌های آب/ اتانول و آب/ اتانول/ هگزان و در روش غوطه‌وری با استفاده از حلال آب/ اتانول/ هگزان بیش‌ترین راندمان استخراج عصاره حاصل می‌شود ($p \leq$ ۰/۰۵) (نمودار۱- الف). شایان ذکر است که در استخراج با حلال آب، اعمال امواج اولتراسونیک تاثیر معنی‌داری در افزایش راندمان استخراج حاصل نداشت ($p>$۰/۰۵).

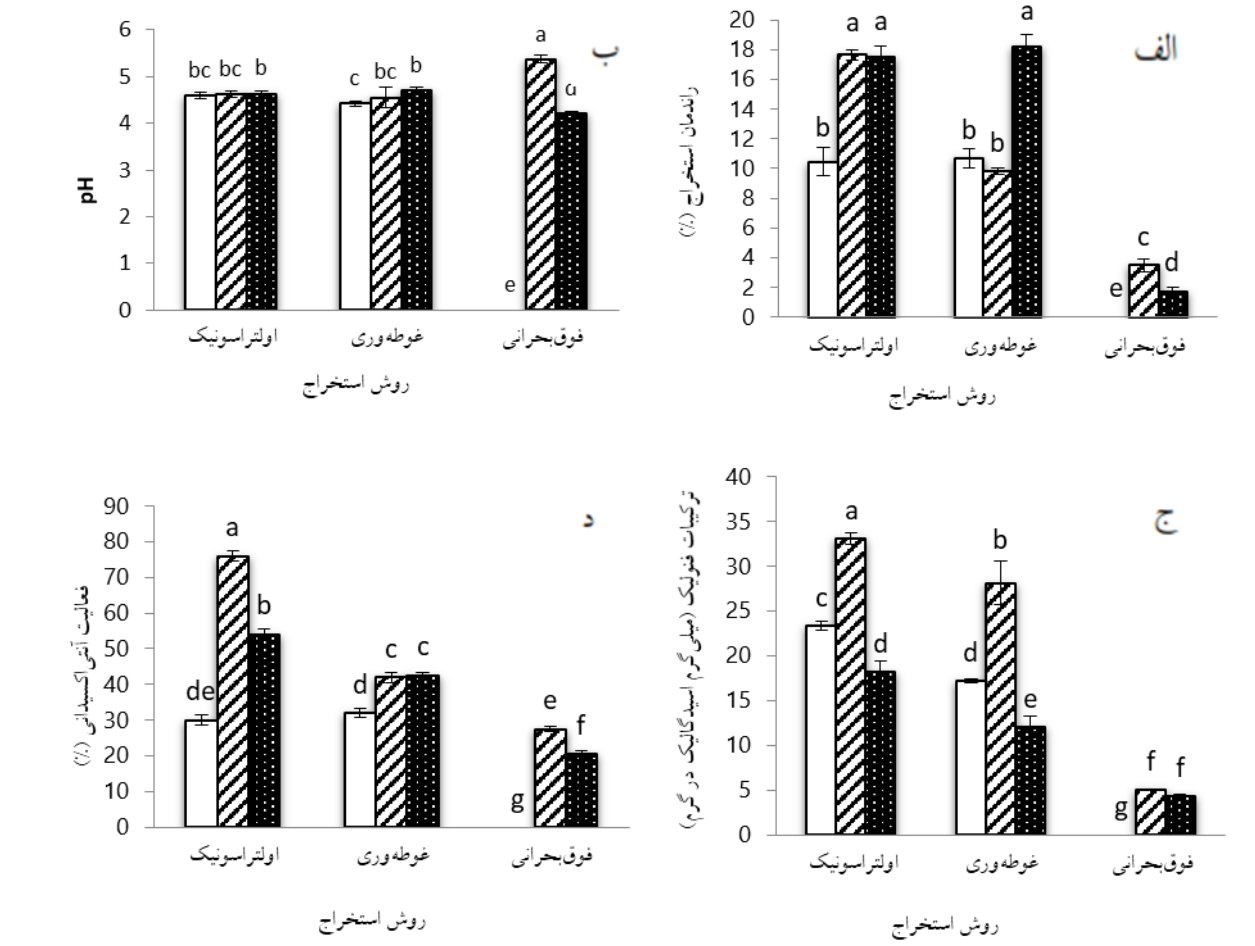
عصاره‌های استخراج شده در روش غوطه‌وری با یا بدون اعمال امواج اولتراسونیک، pH بالاتری در مقایسه با عصاره تولید شده در روش استخراج با سیال فوق بحرانی دارند. عصاره‌های آبی کمترین و عصاره‌های آب/اتانول بیشترین pH را دارا بودند (جدول ۱). اثر متقابل متغیرها نشان می‌دهد که عصاره حاصل از استخراج با سیال فوق بحرانی و با حلال آب/ اتانول با تفاوت معنی‌داری ($p\leq$۰/۰۵) دارای بیش‌ترین pH در بین عصاره‌ها است. همچنین کم‌ترین pH در عصاره حاصل از روش استخراج با سیال فوق بحرانی با حلال آب/ اتانول/ هگزان به دست آمد. ملاحظه می‌شود عصاره‌های حاصل با حلال‌های آب/اتانول و آب/اتانول/هگزان در روش‌های غوطه‌وری و اولتراسونیک تفاوت معنی‌داری ($p>$۰/۰۵) از این نظر باهم ندارند (شکل ۱-ب).

با اعمال امواج اولتراسونیک، بالاترین محتوی ترکیبات فنولیک و خواص آنتی‌اکسیدانی در عصاره مشاهده شد. عصاره استخراج شده با سیال فوق بحرانی، کمترین محتوی ترکیبات فنولیک و خواص آنتی‌اکسیدانی را دارا بود. آب/اتانول مؤثرترین و آب نامناسب‌ترین حلال از این نظر ارزیابی شدند (جدول ۱). با مقایسه تیمارها مشاهده می‌شود که اعمال امواج اولتراسونیک در مجاورت هر سه حلال، افزایش معنی‌داری در محتوی فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

عصاره‌های استخراج شده ایجاد می‌کند (P≤۰/۰۵). کم‌ترین محتوی ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره، با تفاوت معنی‌داری (P≤۰/۰۵) با استفاده از سیال فوق بحرانی استخراج شد (شکل ۱-ج). در بین حلال‌های مورد استفاده، آب/اتانول با اختلاف معنی‌داری بیش‌ترین مقدار ترکیبات فنولیک موجود در نمونه در هر سه روش را استخراج نمود (P≤۰/۰۵). هرچند در روش غوطه‌وری عصاره‌های حاصل از حلال‌های آب/ اتانول و آب/ اتانول/ هگزان تفاوت معنی‌داری از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان ندادند (P>۰/۰۵).

جدول (۱): مقایسه میانگین اثر روش عصاره‌گیری و نوع حلال بر راندمان و برخی از ویژگی‌های کیفی عصاره

		راندمان استخراج	pH	آنتی‌اکسیدان (٪)	ترکیبات فنولیک (میلی‌گرم اسیدگالیک در گرم نمونه)
روش عصاره‌گیری	اولتراسونیک	۱۵/۲۲^{a}	۴/۶۱^{a}	۵۳/۳۳ ^{a}	۲۴/۸۴^{a}
	غوطه‌وری	۱۲/۸۹^{b}	۴/۵۶^{a}	۳۸/۸۳ ^{b}	۱۹/۱۱^{b}
	فوق‌بحرانی	۱/۷۳^{c}	۳/۱۹^{b}	۱۶/۰۲ ^{c}	۳/۱۰^{c}
نوع حلال	آب	۷/۰۴^{c}	۳/۰۰^{c}	۲۰/۶۷ ^{c}	۱۳/۵۲^{c}
	آب/اتانول	۱۰/۳۱^{b}	۴/۸۵^{a}	۴۸/۵۰ ^{a}	۲۲/۰۴^{a}
	آب/اتانول/هگزان	۱۲/۴۹^{a}	۴/۵۱^{b}	۳۹/۰۲ ^{b}	۱۱/۴۹^{b}



نمودار ۱- الف- راندمان استخراج، ب- pH، ج-ترکیبات فنولیک، د- فعالیت آنتی اکسیدانی

میانگین‌هایی که برای هر صفت دارای حروف مشابه هستند، در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نیستند($P > ۰/۰۵$).

آب □ آب+اتانول ▨ آب+اتانول+هگزان ■

- ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی عصاره‌ها

- روش انتشار چاهک در آگار

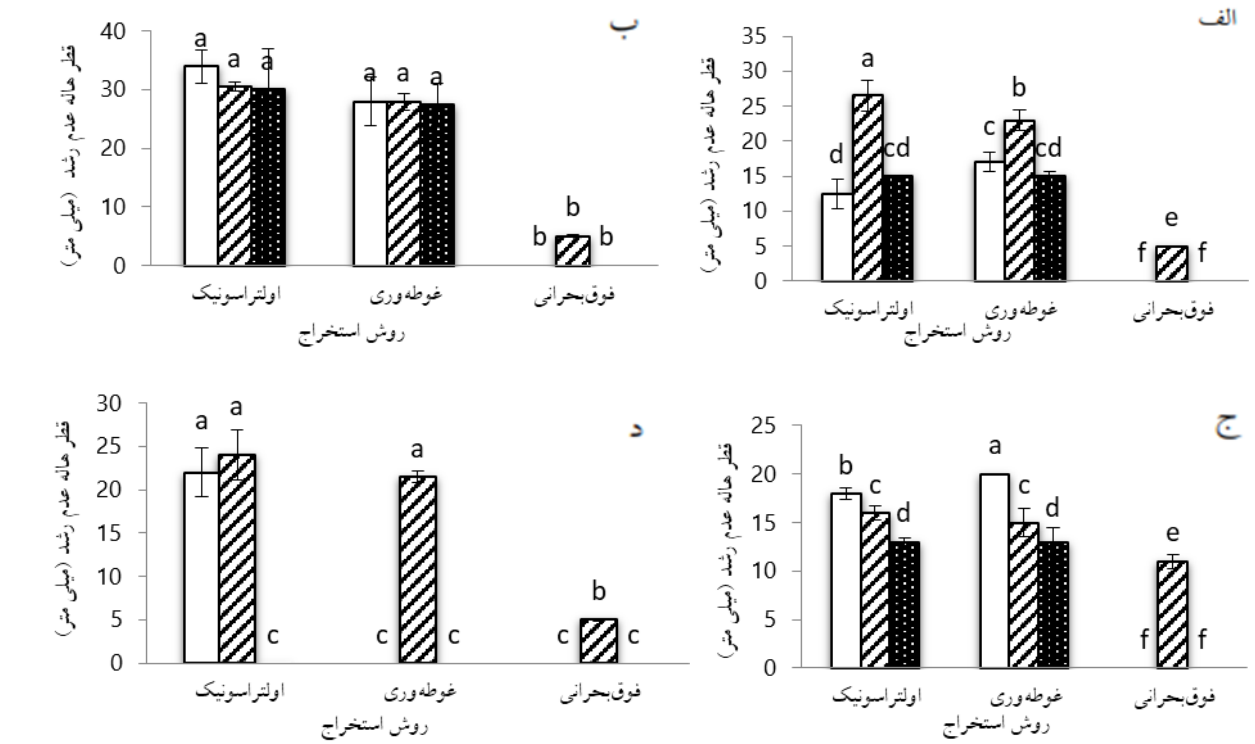
قطر هاله عدم رشد عصاره‌های استخراج شده در روش غوطه‌وری با یا بدون اعمال امواج فراصوت بیش از عصاره‌های استخراج شده با سیال فوق بحرانی است. فعالیت ضدمیکروبی عصاره استخراج شده با اعمال امواج فراصوت بر *کاندیدا آلبیکانس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش از عصاره استخراج شده بدون اعمال امواج ارزیابی شد درمیان حلال‌های مورد استفاده، آب/اتانول نسبت به دو حلال دیگر از این نظر برتری دارد. عصاره استخراج شده با آب/اتانول/هگزان هیچ تاثیری بر فعالیت *کاندیدا آلبیکانس* نشان نداد و قطر هاله عدم رشد *سالمونلا تیفی‌موریوم* در مجاورت این عصاره کمتر عصاره استخراج شده با آب ارزیابی شد (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر متقابل روش استخراج و نوع حلال بر قطر هاله عدم رشد عصاره استخراج شده از ریشه گیاه فاوانیا در غلظت ۱۰۰ بر کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌ها در شکل ۲ نمایش داده شده است.

عصاره استخراج شده از فاوانیا در روش غوطه‌وری با حلال آب/اتانول و اعمال امواج فراصوت قدرت بازدارندگی بالاتری بر فعالیت *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کاندیدا آلبیکانس* دارد. درحالیکه قطر هاله عدم رشد *سالمونلا تیفی‌موریوم* در اثر مجاورت با عصاره استخراج شده در آب و روش غوطه‌وری بیشتر است. در استخراج با سیال فوق بحرانی، تنها عصاره حاصل با سیال کمکی آب/اتانول هاله عدم رشد برای میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه ایجاد نمود.

جدول (۲)- مقایسه میانگین اثر روش عصاره‌گیری و نوع حلال بر قطر هاله‌های عدم رشد میکروارگانیسم‌های مختلف

		سالمونلا تیفی‌موریوم	***کاندیدا آلبیکانس***	***اشرشیاکلی***	***استافیلوکوکوس اورئوس***
روش استخراج	اولتراسونیک	۱۵/۶۷^{a}	۱۵/۳۳ ^{a}	۱۸/۰۰^{a}	۳۱/۵۰^{a}
	غوطه‌وری	۱۶/۰۰^{a}	۷/۱۷ ^{b}	۱۸/۳۳^{a}	۲۷/۸۳^{b}
	فوق‌بحرانی	۳/۶۷ ^{b}	۱/۵۶۷ ^{c}	۱/۶۷^{b}	۱/۶۷^{c}
نوع حلال	آب	۱۲/۶۷^{b}	۷/۳۳ ^{b}	۹/۸۳ ^{b}	۲۰/۶۷^{a}
	آب+اتانول	۱۴/۰۰^{a}	۱۶/۸۳ ^{a}	۱۸/۱۷^{a}	۲۱/۱۷^{a}
	آب+اتانول+ هگزان	۸/۶۷^{c}	۰/۰۰ ^{c}	۱۰/۰ ^{b}	۱۹/۱۷^{a}

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف متفاوت هستند، در سطح پنج درصد آزمون LSD اختلاف معنی‌دار دارند. میانگین± معیار

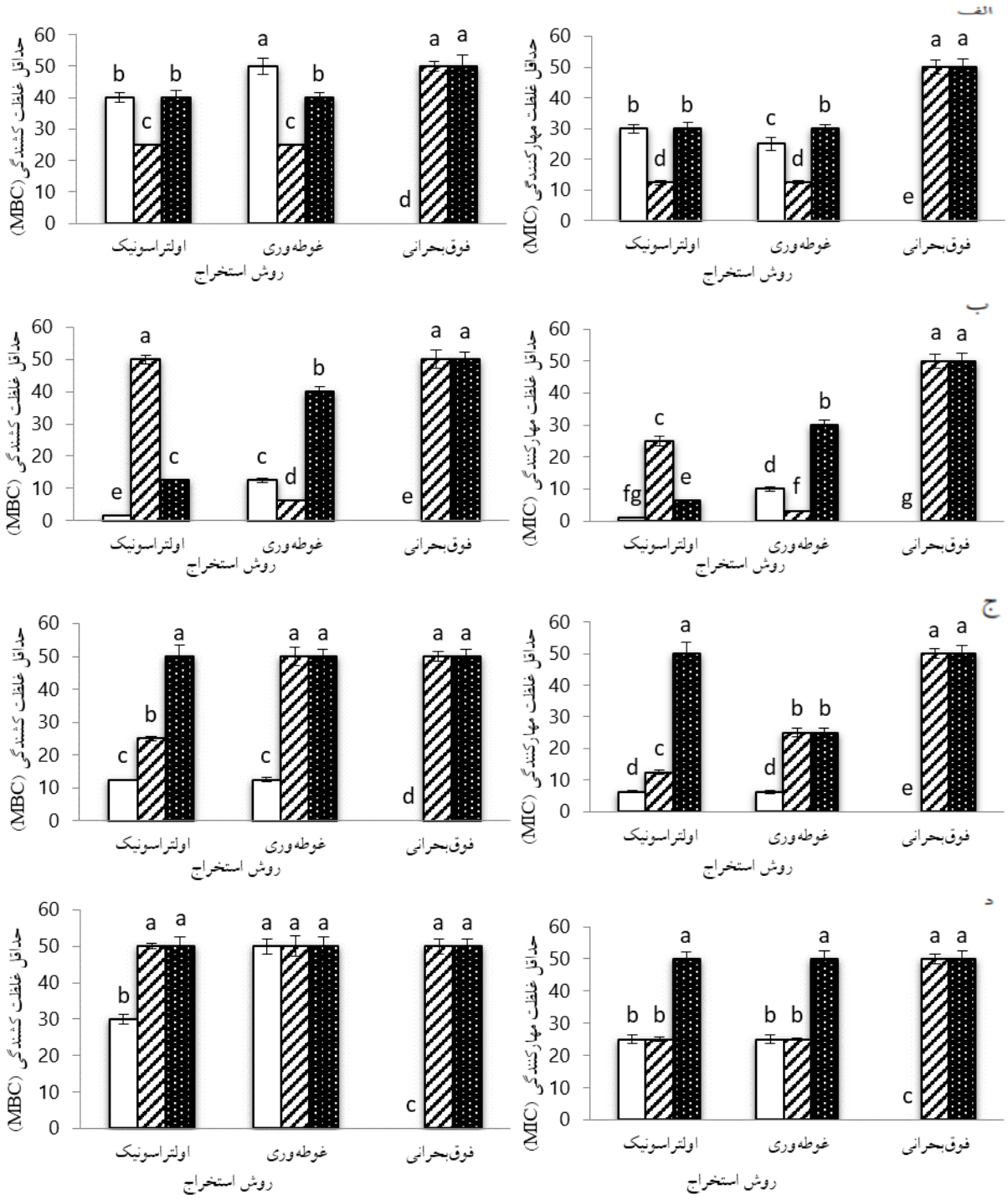


نمودار ۲- قطر هاله عدم رشد الف- *اشریشیا کلی*، ب- *استافیلوکوکوس اورئوس*، ج- *سالمونلا تیفی موریوم* و د- *کاندیدا آلبیکانس* در مجاورت عصاره‌های استخراج شده. میانگین‌هایی که برای هر صفت دارای حروف مشابه هستند، در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نبودند. ($P \leq ۰/۰۵$)

-ارزیابی حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها

حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی برای میکروارگانیسم‌های *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *کاندیدا آلبیکانس* در نمودار ۳ آمده است. MIC و MBC *اشریشیا کلی* برای عصاره حاصل از روش غوطه‌وری با یا بدون اعمال امواج فراصوت و با استفاده از حلال آب/ اتانول برابر و با تفاوت معنی‌داری ($p\leq ۰/۰۵$) کمتر از عصاره حاصل از روش فوق بحرانی و به‌کارگیری دیگر حلال‌ها است. کمترین MIC و MBC *استافیلوکوکوس اورئوس* با تفاوت معنی‌داری ($p\leq ۰/۰۵$) نسبت به سایرین در عصاره استخراج شده با آب/اتانول و در روش غوطه‌وری مشاهده شد. MIC و MBC *سالمونلا تیفی موریوم* برای عصاره حاصل از روش غوطه‌وری با اعمال امواج اولتراسونیک و به‌کارگیری حلال آب با تفاوت معنی‌داری ($p\leq ۰/۰۵$) نسبت به سایر نمونه‌ها کمتر است به دست آمد. ارزیابی فعالیت *کاندیدا البیکانس* نشان داد که عصاره حاصل از روش‌های غوطه‌وری با آب و آب/ اتانول درصورت به‌کارگیری یا عدم به‌کارگیری امواج اولتراسونیک با اختلاف معنی‌داری اثر بازدارندگی بیشتری در مقایسه با سایر عصاره‌ها براین میکروارگانیسم دارد. در نهایت عصاره استخراج شده با آب در روش غوطه‌وری و با اعمال

امواج فراصوت توان بیشتری برای غیرفعال کردن این میکروارگانیسم از خود نشان داد ($p\leq ۰/۰۵$).



نمو

دار۳- حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC): الف- الف- *اشریشیاکلی*، ب- *استافیلوکوکوس اورئوس*، ج- *سالمونلا تیفی موریوم* و د- *کاندیدا آلبیکانس*. میانگین‌هایی که برای هر صفت دارای حروف مشابه هستند، در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نبودند ($P<۰/۰۵$).

آب □ آب+اتانول ▨ آب+اتانول+هگزان ■

بحث و نتیجه‌گیری

روش‌های استخراج و نوع حلال مورد استفاده تأثیر زیادی در راندمان و کیفیت عصاره استخراج شده دارند. با استفاده از حلال آب/ اتانول و در روش غوطه‌وری با اعمال امواج اولتراسونیک می‌توان بیش‌ترین میزان عصاره از ریشه این گیاه را استخراج کرد. در فرایند اولتراسونیک، کاویتاسیون ناشی از اعمال امواج فراصوت، باعث شکستن دیواره‌های سلول‌ها و افزایش تماس بین حلال و ماده گیاهی می‌شود. همچنین ریزش حباب‌های کاویتاسیون باعث فشرده شدن حلال به داخل سلول شده و در نتیجه دسترسی حلال به سلول را آسان‌تر می‌کند (Soria *et al.*, 2010). عملکرد متفاوت نوع حلال‌ها در راندمان و کیفیت عصاره‌های استخراج شده ازجمله pH و ویژگی‌های شیمیایی را می‌توان به تفاوت در حلالیت، ضریب نفوذ و همچنین قطبیت حلال‌ها نسبت داد گزارش شده است استفاده از مخلوط حلال‌های آلی نسبت به استفاده هر یک از آنها به تنهایی در ارتقاء راندمان استخراج عصاره از گیاهان مختلف مؤثرتر عمل می‌کند (Delazar *et al.*, 2012). تفاوت مشاهده شده در pH عصاره‌های حاصل از روش‌های مختلف استخراج را می‌توان به توانایی روش استخراج برای خارج نمودن ترکیبات موجود در ریشه گیاه فاوانیا از جمله فنول‌ها، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها، کربوهیدرات‌ها، قندها و غیره نسبت داد (Nur Syukriah *et al.*, 2021). کارایی استخراج تحت تأثیر عوامل مختلفی همچون ماهیت شیمیایی ترکیبات گیاهی، روش استخراج، اندازه ذرات ماده اولیه و نوع حلال قرار دارد (Besharati *et al.*, 1398). بیش‌تر بودن محتوی فنول کل و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده با روش غوطه‌وری در مقایسه با استخراج با سیال فوق بحرانی را می‌توان به مدت زمان طولانی‌تر تماس ماده گیاهی با حلال نسبت داد که این فرایند با فراهم کردن فرصت کافی برای انتشار حجم مناسبی از حلال به داخل سلول‌های گیاه، خروج بیش‌تر مواد آنتی اکسیدانی را ممکن می‌سازد. توانایی بالاتر سیال فوق بحرانی دی‌اکسیدکربن در استخراج ترکیبات غیرقطبی و ماهیت قطبی ترکیبات فنولیک و آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره ریشه این گیاه دلیل دیگری بر این مشاهده است (Saboora, *et al.*, 1392). استرس برشی حاصل از امواج فراصوت با شکستن مولکول‌های پلیمری بزرگ، انتقال مواد را سرعت می‌بخشد و در نتیجه باعث استخراج بهتر ترکیبات فنولیک می‌گردد. از طرفی فراصوت موجب کاهش اندازه ذرات شده از این طریق سطح تماس را افزایش و در نتیجه انتشار حلال در بافت گیاه را بهبود می‌بخشد (Aliano-Gonzalez *et al.*, 2022). بالاتر بودن میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در عصاره استخراج شده به روش اولتراسونیک در مقایسه با عصاره‌های حاصل از روش‌های غوطه‌وری و سیال فوق بحرانی به‌دلیل بالا بودن ترکیبات فنولی این عصاره است. افزایش غلظت ترکیبات فنولی به‌طور مستقیم توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد (Mansool Mollashahi and Varaste, 1392). بالاتر بودن محتوی ترکیبات فنولیک کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره

حاصل از حلال آب/اتانول در مقایسه با عصاره‌های آبی و عصاره حاصل از ترکیب حلال آب/ اتانول/ هگزان می تواند به‌دلیل اختلاف در قطبیت و ویسکوزیته آنها باشد. حلال اتانولی به راحتی در داخل منافذ مواد گیاهی رسوخ می‌کند و موجب خروج بهتر ترکیبات زیست فعال مانند آنتی اکسیدان‌ها می‌گردد (Ein afshar and Sharayeii *et al.*, 2022). استفاده از آب به همراه اتانول باعث تورم بافت گیاهی و افزایش سطح تماس ماتریکس و حلال و در نتیجه بهبود بازدهی استخراج ترکیبات می‌شود (Mandal *et al.*, 2022). لازم به ذکر است که ترکیبات فنولی اکثراً قطبی هستند، اما برخی ممکن است به دلیل اتصال گروه‌های غیرقطبی به مولکول‌های آنها غیرقطبی تلقی شوند و محلول در حلال‌هایی با قطبیت ضعیف باشند. بنابراین ترکیب حلال‌هایی مانند آب/ اتانول نتایج بهتری در استخراج آنها دارد (Mokrani and Madani *et al.*, 2016). در تحقیقات دیگری نیز استفاده از امواج اولتراسونیک و حلال آب/ اتانول در افزایش استخراج پلی‌فنل‌ها وترکیبات آنتی‌اکسیدانی مناسب ارزیابی شد (Eftekhar *et al.*, 2022; Kabiri *et al.*, 1393). ارزیابی خواص ضدمیکروبی عصاره این گیاه نشان می‌دهد که ریشه گیاه فاوانیا خاصیت ضدمیکروب قابل توجهی بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه دارد که البته این ویژگی بسته به خصوصیات عصاره و نوع میکروارگانیسم مورد مطالعه متفاوت است. تفاوت مشاهده شده در فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های حاصل از روش‌های مختلف استخراج را می‌توان به توانایی روش استخراج و نوع حلال در میزان استخراج ترکیبات موجود در ریشه گیاه فاوانیا از جمله فنول‌ها، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها و به ویژه ترکیبات مؤثره این گیاه از جمله بنزوئیک اسیدها نسبت داد (Ahmad *et al.*, 2012). در پژوهش‌های دیگر نیز نشان داده شده است که شرایط استخراج (روش استخراج و نوع حلال) بر ویژگی‌های کیفی ماده مستخرج بسیار تاثیرگذار است. استخراج عصاره بره موم نقاط مختلف جنوب برزیل با روش‌های غوطه‌وری و اولتراسونیک با استفاده از حلال اتانول ۷۰-۸۰ درصد به این نتیجه دست یافتند که عصاره حاصل از روش اولتراسونیک دارای بیش‌ترین خاصیت ضدمیکروبی می باشد (Lima *et al.*, 2016). این نتایج با یافته های به دست امده در این تحقیق مطابقت دارد. Esmaielzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۹، اعمال امواج اولتراسونیک در استخراج آنتی‌اکسیدان و ترکیبات فنولیک را مؤثرتر از سیال فوق بحرانی معرفی کردند (Esmaielzadeh *et al.*, 2019). در پژوهشی دیگر اثر ضدقارچی و قدرت مهار رادیکال‌های آزاد اسانس استخراج شده به روش تقطیر با آب بیش از نمونه استخراج شده با سیال فوق‌بحرانی ارزیابی شد. هرچند با توجه به افزایش راندمان استخراج با سیال فوق بحرانی، این رویه اقتصادی‌تر از تقطیر است (Ramak *et al.*, 2019). ارزیابی ترکیبات شیمیایی اسانس برگ گشنیز (Coriandrum sativum L.) استخراج شده با سیال فوق بحرانی و تقطیر با آب با استفاده از GC-MS نیز نشان داد که ۲۳ جزء مختلف در روغن استخراج شده با سیال فوق بحرانی و ۱۸ جزء در اسانس تقطیر شده با آب وجود دارد که لینالول به عنوان جزء اصلی این اسانس معرفی شد (Abass et al., 2022). مقایسه عملکرد، فعالیت‌های بیولوژیکی و ترکیب شیمیایی اولئورزین Pinus roxburghii استخراج

شده با تقطیر با بخار، استخراج با بخار فوق بحرانی و استخراج با بخار فوق‌گرم در دماهای مختلف (۱۲۰، ۱۴۰ و ۱۶۰ درجه سلسیوس) نشان داد که اسانس استخراج شده با بخار فوق گرم در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس و ۱۴۰ درجه سلسیوس به ترتیب بیشترین فعالیت ضد قارچی و ضد باکتریایی را دارد. لذا بخار فوق گرم یک روش جایگزین و موثر برای استخراج اسانس اولئورزین است که عملکرد اسانس استخراج شده و فعالیت های بیولوژیکی آن را بهبود می‌بخشد (Ayub *et al*., 2022).

تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Aliaño-González, M.J., Barea-Sepúlveda, M., Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., López-Castillo, J.G., Palma, M. *et al.*, (2022). Ultrasound-assisted extraction of total phenolic compounds and antioxidant activity in mushrooms. Agronomy, 12(8): 1812.
- Abbas, A., Anwar, F., Ahmad, N., Shahid, M., Al-Mijalli, S. H., Yaseen, M., and Iqbal, M. (2022). Characterization of bioactives and nutra-pharmaceutical potential of supercritical fluid and hydro-distilled extracted coriander leaves essential oil. Dose-Response, 20(4), 15593258221130749.
- Ayub, M. A., Choobkar, N., Hanif, M. A., Abbas, M., Ain, Q. U., and Riaz, M. (2022). Chemical composition and biological potential of Pinus roxburghii oleoresin essential oils extracted by steam distillation, superheated steam, and supercritical fluid CO2 extraction. Research Square, 1: 1-18.
- Ain Afshar, S. and Sharayi, Parvin. (2020). Investigating the effect of extraction conditions on the amount of bioactive compounds in saffron onion extract. Scientific research of saffron agriculture and technology, 8(1): 89-98 [In Persian]
- Ahmad, F. and Tabassum, N. (2013). Preliminary phytochemical, acute oral toxicity and antihepatotoxic study of roots of Paeonia officinalis Linn. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 3(1): 64-68.
- Arulmozhi, P., Vijayakumar, S. and Kumar, T. (2018). Phytochemical analysis and antimicrobial activity of some medicinal plants against selected pathogenic microorganisms. Microbial pathogenesis, 123: 219-226.
- Delazar, A., Nahar, L., Hamedeyazdan, S. and Sarker, S.D. (2012). Microwave-assisted extraction in natural products isolation. Natural products isolation, 89-115.
- Fu, X., Belwal, T., He, Y., Xu, Y., Li, L. and Luo, Z. (2022). UPLC-Triple-TOF/MS characterization of phenolic constituents and the influence of natural deep eutectic solvents on extraction of Carya cathayensis Sarg. Peels: Composition, extraction mechanism and in vitro biological activities. Food Chemistry, 370: 131042.
- Gao, L.L., Li, Y.Q., Wang, Z.S., Sun, G.J., Qi, X.M. and Mo, H.Z. (2018). Physicochemical characteristics and functionality of tree peony (Paeonia suffruticosa Andr.) seed protein. Food Chemistry, 240: 980-988.

- Abu Najami, M., Ghorbani, M. and Ghorbani Javed, M. (1394). Ultrasonic waves a new method in extracting herbal compounds. Promotional Scientific Journal of Sound and Vibration, 4(8): 119-125. [In Persian]
- Hoehn, E., Gasser, F., Guggenbühl, B. and Künsch, U. (2003). Efficacy of instrumental measurements for determination of minimum requirements of firmness, soluble solids, and acidity of several apple varieties in comparison to consumer expectations. Postharvest Biology and Technology, 27(1): 27-37.
- Jehanshahi Afshar, A. (2017). Favaniya. Journal of Traditional Medicine of Islam and Iran, 1: 133-138. [In Persian]
- Kabiri, S. and Seyed-Alangi, S. Z. (2014). Comparison of antioxidant properties of different extracts of Melissa officinalis leaves obtained by two methods of water extraction and extraction with the help of microwaves and its effect on the oxidation stability of soybean oil. Technology Quarterly New food products, 8: 23-38. [In Persian]
- Khaja Nouri, M. and Haghighi, A. (2014). Investigating of natural compounds extraction of plants by microwave and ultrasound waves. Journal of New Food Sciences and Technologies, 1(3): 81-91. [In Persian]
- Morelli, L.L.L. and Prado, M.A. (2012). Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology. Ultrasonics sonochemistry, 19(6): 1144-1149.
- Li, P., Shen, J., Wang, Z., Liu, S., Liu, Q., Li, Y. et al., (2021). Genus Paeonia: A comprehensive review on traditional uses, phytochemistry, pharmacological activities, clinical application, and toxicology. Journal of Ethnopharmacology, 269: 113708.
- Mokrani, A. and Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (Prunus persica L.) fruit. Separation and Purification Technology, 162: 68-76.
- Milovanovic, I., Zengin, G., Maksimovic, S. and Tadic, V. (2021). Supercritical and ultrasound-assisted extracts from Pleurotus pulmonarius mushroom: chemical profiles, antioxidative, and enzyme-inhibitory properties. Journal of the Science of Food and Agriculture, 101(6): 2284-2293.
- Mandal, V., Mohan, Y. and Hemalatha, S.J.P.R. (2007). Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. Pharmacognosy reviews, 1(1): 7-18.
- Moshari-Nasirkandi, A., Alirezalu, A. and Hachesu, M.A. (2020). Effect of lemon verbena bio-extract on phytochemical and antioxidant capacity of strawberry (Fragaria× ananassa Duch. cv. Sabrina) fruit during cold storage. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 25: 101613.
- Nematollahi, A., Mashayekh, M., Sohrabvandi, S., Khosravani, K. and Nejad-Bariki I. (1391). Use of supercritical carbon dioxide in the extraction and purification of vegetable oils. Journal of Nutritional Sciences and Food Industries of Iran, 7(4): 35-44. [In Persian]
- Nomanbhay, S., Uskenbayeva, S.A. and Ong, M.Y. (2018). On Increase of The Efficiency of Extracting Phenolic Compounds from Palm Oil Mill Effluent. Journal of Chemical Technology & Metallurgy, 53(1).
- Ramak, P., Karimian, V., and Sepahvand, A. (2019). Effects of supercritical fluid and distillation extraction methods on the yield, antioxidant and antifungal activities of Artemisia persica Boiss essential oil. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 7(2), 26-39. [In Persian]
- Syukriah, A.N., Liza, M.S., Harisun, Y. and Fadzillah, A.A.M. (2014). Effect of solvent extraction on antioxidant and antibacterial activities from Quercus infectoria (Manjakani). International Food Research Journal, 21(3): 1031.
- Saboora, A., Pourbarat, F. and Fallah-Hossini, H. (2014). Comparison of Different Extraction Methods for Optimizing Antioxidant Compounds in Origanum Majorana L. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, 21: 693-704. [In Persian]

- Esmaielzadeh, R., and Raftani Amiri, Z. (2019). The effect of ultrasound assisted and super critical fluid extraction on antioxidant and antibacterial properties of cinnamon extract. Journal of food science and technology (Iran), 16(86), 335-347. [In Persian]
- Soria, A.C. and Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. Trends in food science & technology, 21(7): 323-331.
- Sharma, S., Barkauskaite, S., Jaiswal, A.K. and Jaiswal, S. (2021). Essential oils as additives in active food packaging. Food Chemistry, 343: 128403.
- Shirani Beed Abadi, Kh., Safaiyan, Sh., Mousavi Nadoshan, R. and Rahimi Fard, N. (1400). Investigation of different extraction methods (maceration and ultrasound) on the antioxidant, anti-Alzheimer and antimicrobial properties of Cappadina algae extraction. Journal of Iran Food Sciences and Industries, 112: 69-79. [In Persian]
- Soria, A.C. and Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. Trends in food science & technology, 21(7): 323-331.
- Sun, X., Guo, X., Ji, M., Wu, J., Zhu, W., Wang, J. *et al*., (2019). Preservative effects of fish gelatin coating enriched with CUR/βCD emulsion on grass carp (Ctenopharyngodon idellus) fillets during storage at 4 C. Food Chemistry, 272: 643-652.
- Tiwari, B.K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 71: 100-109.
- Vardanega, R., Santos, D.T. and Meireles, M.A.A. (2014). Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation. Pharmacognosy reviews, 8(16): 88.
- Vega-Arroy, D.J., Ruiz-Espinosa, H., Luna-Guevara, J.J., Luna-Guevara, M.L., Hernandez-Carranza, P., Avila-Sosa, R. et al., (2017). Effect of solvents and extraction methods on total anthocyanins, phenolic compounds and antioxidant capacity of Renealmia alpinia (Rottb.) Maas peel. Czech Journal of Food Sciences, 35(5): 456-465.
- Vagi, E., Simándi, B., Daood, H.G., Deak, A. and Sawinsky, J. (2002). Recovery of pigments from Origanum majorana L. by extraction with supercritical carbon dioxide. Journal of agricultural and food chemistry, 50(8): 2297-2301.
- Vidović, S., Vasić, A., Vladić, J., Jokić, S., Aladić, K., Gavarić, A. et al., (2021). Carbon dioxide supercritical fluid extracts from yarrow and rose hip herbal dust as valuable source of aromatic and lipophilic compounds. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 22: 100494.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrasonics sonochemistry, 8(3): 303-313.
- Yan, Z., Xie, L., Li, M., Yuan, M., Tian, Y., Sun, D. et al., (2021). Phytochemical components and bioactivities of novel medicinal food–peony roots. Food Research International, 140: 109902.
- Yeasmin, D., Swarna, R.J., Nasrin, M.S., Parvez, S. and Alam, M.F. (2016). Evaluation of antibacterial activity of three flower colours Chrysanthemum morifolium Ramat. Against multi-drug resistant human pathogenic bacteria. International Journal of Biosciences, 9: 78-87.