(مقاله پژوهشی)

شرایط بهینه استخراج الکلی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی برگ و ریشه گیاه کبر به روش فراصوت

عبدالواحد صفرزائی[۱]، حمید سرحدی[۱*]، علیرضا داشی پور[۲]

۱-گروه علوم و صنایع غذایی، واحد بم، دانشگاه آزاد اسلامی، بم، ایران.
۲-گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۶

چکیده

گیاهان دارای ترکیبات موثری از جمله فنلی، آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی هستند. روش‌های مختلفی از جمله سوکسله و غرقابی و یا از طریق فناوری‌های جدید نظیر مایکروویو و یا امواج فراصوت مورد استفاده قرار می‌گیرند که می‌توانند تاثیر بسزایی در میزان استخراج این ترکیبات داشته باشند. هدف از این مطالعه، بررسی کارایی استفاده از امواج فراصوت در استخراج ترکیبات فنلی، ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی برگ و ریشه گیاه کبر می‌باشد. بهینه‌سازی به روش سطح پاسخ با استفاده از فاکتور زمان در سه سطح (۱۰، ۲۵ و۴۰ دقیقه) و شدت صوت نیز در سه سطح(۴۰،۷۰ و۱۰۰ درصد) با حلال الکلی در نظر گرفته شد. از نتایج آزمون‌های انجام شده با روش آماری سطح پاسخ، شدت صوت به عنوان تاثیرگذارترین فاکتور استخراج ترکیبات فنلی، آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی از برگ و ریشه گیاه کبر بدست آمد که با افزایش زمان و شدت صوت میزان استخراج این ترکیبات افزایش یافت. شرایط بهینه استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی با حمام فراصوت، زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد برای برگ و ریشه میزان ترکیبات فنلی کل به ترتیب ۲۵/۴۷ و ۱۷/۲۴ میلی گرم بر گرم و میزان بهینه IC_{50} برگ و ریشه نیز به ترتیب ۹/۱۳ و ۴۰/۲۰ میکروگرم بر میلی‌گرم بدست آمد. مقدار عددی حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و باکتری‌کشی برای *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت کمتر از *اشریشیاکلی* مشاهده گردید.

واژه های کلیدی: گیاه کبر، آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، فراصوت.

*مسئول مکاتبات: sarhadi@iaubam.ac.ir

۱-مقدمه

بخش عمده درمان در طب سنتی، متکی به عصاره گیاهان دارویی و ترکیبات فعال آن ها می‌باشد(۲۸). ترکیبات فعال فنلی دارای مزایا و خصوصیات فیزیولوژیکی ارزشمندی نظیر ضدآلرژی، ضدالتهاب، ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند که در حوزه‌های دارویی، غذایی، آرایشی- بهداشتی و همچنین کشاورزی کاربرد دارند(۱۵). این ترکیبات در فعالیت‌های میکروبی تداخل ایجاد می‌کنند و در بسیاری از موارد سبب نابودی میکروب‌ها می‌شوند بدون این که اثرات نامطلوبی بر سلامت مصرف کننده داشته باشند(۶). در سال‌های اخیر به دلیل عوارض جانبی نامطلوب ترکیبات سنتزی دارویی، تمایل به مصرف گیاهان دارویی بیشتر شده است(۳۵). حدود ۳۰ تا ۵۰ درصد از کل داروهای موجود در داروخانه‌ها مشتقاتی از گیاهان دارویی بوده که فرمولاسیون آن ها الهام گرفته از گیاهان دارویی است(۱۴). در فرآیند استخراج ترکیبات فنلی عواملی نظیر نوع حلال، نسبت نمونه به حلال، مدت زمان استخراج، شدت صوت و دما بسیار مهم هستند. فرآیند استخراج می‌تواند به صورت سنتی از طریق روش‌هایی مانند سوکسله و غرقابی و یا از طریق فناوری‌های جدید نظیر مایکروویو و یا امواج فراصوت صورت گیرد(۲۲). استخراج به کمک امواج فراصوت از جمله مهمترین روش‌های استحصال ترکیبات ارزشمند از منابع گیاهی محسوب می‌شود که در مقیاس‌های بزرگ و کوچک قابل اجرا می‌باشد. سامانه‌های پروب و حمام دو روش رایج استفاده از امواج فراصوت هستند. حمام فراصوت، اندازه ذرات را به طور چشمگیری کاهش می‌دهد و باعث افزایش قابلیت انحلال پذیری آن ها می‌شود(۱). روش حمام فراصوت به منظور استخراج از نمونه‌های خشک شده و پودر شده در مقیاس بزرگ و صنعتی روشی کارآمد می‌باشد(۳۷). در سیستم پروب فراصوت، نمونه گیاهی به طور مداوم و مستقیم در تماس با پروب (امواج فراصوت) قرار می‌گیرد از این رو تاثیر امواج بر بافت های گیاهی بیشتر می‌باشد اما از این سیستم به طور گسترده‌ای برای فراصوت دهی نمونه‌ها با حجم کم استفاده می‌شود و قابلیت تکرارپذیری کمی دارد. علاوه بر این خطر آلودگی نمونه و تولید کف نسبت به حمام فراصوت بیشتر است در حالی که حمام فراصوت می‌تواند بر طیف وسیعی از نمونه‌ها به طور همزمان عمل کند و قابلیت تکرارپذیری بالایی دارد از اینرو بر سیستم پروب فراصوت ترجیح داده می‌شود(۲۵). گیاه کبر با نام علمی *Capparis spinosa L.* گیاهی علفی چندساله، گاها درختچه‌ای و بوته‌ای با ریشه‌ای چوبی و منشعب و دارای برگ‌های متناوب با اندازه‌های متنوع و دمبرگدار می‌باشد(۱۲). کبر دارای ۲۵۰ گونه است که اغلب آن ها وحشی هستند و در زمین‌های خشک و نیمه‌خشک نواحی‌گرمسیری و نیمه‌گرمسیری با قابلیت سازگاری با شرایط خشکسالی قادر به رشد می‌باشند(۱۸و۱۹). مطالعات فیتوشیمیایی، وجود فاکتورهای فعال زیستی فراوانی را در این گیاه شناسایی نموده‌اند که از جمله می توان به ساکاریدها، گلیکوزیدها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، ایندول‌ها و فنلیک‌اسیدها، ترپنوئیدها، روغن‌های فرار، اسیدهای چرب، ویتامین C، ویتامین E و استروئیدها اشاره کرد(۳۹،۳۱). ریشه و جوانه‌های مولد گل این گیاه دارای پکتین، ساپونین، رامنوگلیکوزید و ماده‌ای به نام کاپاری‌روتین هستند(۵).گیاه کبر دارای خواص ضددیابت و کاهنده لیپیدهای خون می باشد(۱۷، ۳۰،۳۷). به طورگسترده‌ای کبر در طب سنتی به دلیل اثرات دیورتیک (مدر)، ضدفشار خون و شل کننده عروق استفاده شده است(۳۸). علاوه بر این، عصاره‌های آبی- اتانولی استخراج شده از برگ‌های گیاه کبر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بازدارنده‌ای را در آزمون‌های بیولوژیکی و شیمیایی نشان داده‌اند(۲۷). در مطالعه‌ای فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی گیاه کبر علیه برخی قارچ‌های پوستی مورد ارزیابی قرار گرفته است(۳۱). از طرف دیگر، عصاره‌های استخراجی از بخش‌های هوایی گیاه کبر با حلال‌های هگزان و پترولئوم اتر دارای اثر مهار فعالیت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نظیر *هلیکوباکتر پیلوری*، *اشریشیاکلی* و *باسیلوس سرئوس* می‌باشند(۲۶). با توجه به گرایش روز افزون بشر به استفاده از ترکیبات طبیعی مشتق شده از منابع گیاهان دارویی در درمان و مقابله با بیماری‌ها، در این تحقیق سعی می‌شود که

شرایط بهینه در استخراج ترکیبات فنلی و ضدمیکروبی برگ و ریشه گیاه کبر مورد بررسی قرار گیرد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد شیمیایی و محیط‌های کشت

کلیه محلول‌ها و مواد شیمیایی مورد استفاده گرید آنالیتیکال بودند. معرف فولین سیوکالچو، اسید گالیک، کربنات سدیم بدون آب (Na_2CO_3)، اتانول و محیط‌های کشت نوترینت آگار، تریپتیک سوی آگار، مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث از کمپانی مرک آلمان و ۲و۲-دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) از کمپانی سیگما آلمان خریداری شده بودند.

۲-۲- شناسایی و آماده‌سازی گیاه

گیاه کبر در اسفندماه سال ۱۳۹۷ از مزارع شهرستان عنبرآباد واقع در استان کرمان جمع‌آوری و با همکاری هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جیرفت مورد شناسایی قرار گرفت. ریشه و برگ گیاه به ترتیب در ماه‌های اسفند و فروردین جمع‌آوری و در دمای اتاق و دور از نور خورشید به طور کامل خشک گردیدند و سپس به منظور آماده‌سازی بخش‌های مختلف گیاه جهت استخراج عصاره توسط آسیاب آزمایشگاهی پودر و از الکی با مش ۴۰ عبور داده شدند.

۲-۳- استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی

۲-۳-۱-استخراج عصاره الکلی به روش فراصوت

۵۰ گرم از نمونه پودر شده گیاهی با۲۰۰ میلی‌لیتر حلال اتانول ۷۰ درجه به نسبت ۱:۴ حجمی/وزنی مخلوط گردید و ظروف حاوی حلال و نمونه در حمام اولتراسونیک مدل JK-DUC-8200LHC ساخت کشور چین با قابلیت کنترل دما مجهز به ترموستات و سیستم سیرکوله در دمای محیط با فرکانس ثابت ۳۵ کیلوهرتز قرار داده شدند. سطوح تیماری روش فراصوت شامل سه سطح زمان (۱۰، ۲۵ و ۴۰ دقیقه) و سه سطح شدت صوت (۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد) در نظر گرفته شدند(۲). پس از اتمام تیمار اولتراسوند، عصاره استخراج شده با ۷۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ و سپس قسمت شفاف بالای مخلوط با سمپلر جدا گردید و از صافی ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. جداسازی حلال و تغلیظ عصاره توسط تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء در دمای ۴۰ درجه سلسیوس با هدف ممانعت از آسیب به ترکیبات فنلی و ۲۰۰ دور در دقیقه انجام شد. به منظور حذف باقیمانده حلال، عصاره تغلیظ شده بر روی پلیت پخش و درون آون خلاء با دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا عصاره به طور کامل خشک گردد. سپس عصاره‌ها تا انجام فرآیند آزمون در فریزر با دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری شدند(۸).

۲-٤ -آزمون‌های شیمیایی

۲-٤-۱- اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل[1]

مقدار ترکیبات فنلی کل موجود در عصاره گیاه کبر از طریق رنگ سنجی به روش فولین سیوکالچو[2] مورد بررسی قرار گرفت(۲۱). جهت انجام آزمون فولین، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره ۱۰۰۰ پی پی ام با سمپلر به لوله آزمایش منتقل و سپس۵۰۰ میکرولیتر از معرف فولین سیوکالچو (که با آب مقطر، ۱۰ برابر رقیق شده بود) و یک میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و حل گردید. پس از گذشت ۱ دقیقه، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم۲۰درصد در دمای اتاق به لوله اضافه و توسط شیکر لوله به طور مناسب همگن شد. محتویات لوله آزمایش به مدت ۲ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد و سپس مقدار جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Aquarius سری ۷۵۰۰ ساخت شرکت CECILانگلستان در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت گردید. مقدار ترکیبات فنلی کل از روی معادله خط رسم شده بر مبنای اسید گالیک و به صورت میلی‌گرم در گرم عصاره بیان گردید.

۲-٤-۲- تعیین فعالیت آنتی‌رادیکالی

تعیین فعالیت آنتی‌رادیکالی از طریق آزمون دی پی پی اچ[3] و به وسیله معرف ۲و۲-دی فنیل پیکریل هیدرازیل انجام

[1] - Total Phenolic Content (TPC)
[2] - Folin ciocalteu
[2] - 2,2′-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH)

گردید(۳۴). حجم‌های بین ۱۰۰۰-۱۰۰ میکرولیتر از عصاره الکلی در رقت ۲۰۰ پی پی ام به لوله‌های آزمایش منتقل و بر اساس حجم عصاره اضافه شده، اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه گردید تا کل حجم درون لوله‌های آزمایش به ۴ میلی‌لیتر رسانده شود سپس به لوله‌ها ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول دی فنیل پیکریل هیدرازیل اضافه گردید و به مدت دمای اتاق در مکان تاریک به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری گردید و سپس جذب نمونه و شاهد در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. فعالیت آنتی‌رادیکالی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد گیرندگی رادیکال آزاد دی پی پی اچ} = \frac{\text{جذب شاهد} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب شاهد}} \times 100$$

۲-۵- آزمون‌های بررسی فعالیت ضد میکروبی

۲-۵-۱- تهیه غلظت مادر از عصاره الکلی

غلظت مادر ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پودر عصاره خشک شده الکلی با استفاده از دی متیل سولفوکساید ۵ درصد آماده گردید و با عبور از فیلتر میکروبی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون استریل شد(۱۰).

۲-۵-۲- تهیه سوسپانسیون باکتریایی نیم مک فارلند

آمپول‌های لیوفیلیزه استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت PTCC 1431 و اشریشیاکلی O157، PTCC 1860 از مرکز منطقه‌ای کلکسیون‌های قارچ ها و باکتری‌های صنعتی ایران خریداری و سویه‌ها مطابق دستورالعمل سازنده آن احیاء گردیدند. سپس از باکتری‌های رشد یافته درون لوله‌های حاوی رینگر استریل اضافه شد تا کدروتی معادل محلول استاندارد نیم مک فارلند (۱۰۸×۱/۵ واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر) و با جذبی معادل ۰/۱۳-۰/۰۸ در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر حاصل گردد(۲۳).

۲-۵-۳-تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد[1]

از روش میکرودایلوشن[2] جهت تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد استفاده شد. در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه، نخست درون چاهک‌های ۱۲ عددی هر ردیف، میزان ۹۵میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث استریل با ۳۰ ثانیه عمل همزدن انجام شد. محلول به دست آمده در۲و۲- غلظت مضاعف اضافه شد. سپس۱۰۰ میکرولیتر از غلظت مادر۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های الکلی به چاهک اول منتقل و غلظت۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها تهیه‌گردید. در ادامه۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول به چاهک دوم منتقل و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها تهیه شد. این ترتیب برای همه چاهک‌ها به جز چاهک شماره ۱۲ که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده بود، ادامه یافت. چاهک شماره ۱۱ به عنوان شاهد و کنترل منفی در نظر گرفته شد. در انتها ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک شماره ۱۱ برداشته و دور ریخته شد. در ادامه ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل کدورت استاندارد نیم مک فارلند به هر یک از چاهک‌ها به جز چاهک شماره ۱۱ اضافه گردید سپس میکروپلیت به مدت ۷ ثانیه در شیکر الایزا تکان داده شد و میزان کدورت اولیه چاهک‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر قرائت گردید. در ادامه میکروپلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد و پس از گذشت این زمان، میزان جذب یا کدورت چاهک‌ها مجددا توسط دستگاه الایزا قرائت و مقایسه گردید. کمترین غلظت عصاره که سبب ممانعت از رشد باکتری گردیده بود به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی در نظر گرفته شد. تیمارها در سه تکرار انجام گردیدند(۳۲،۱۱)

[1] - Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
[2] - Microdilution

۲-۵-٤- تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی[1]

حداقل غلظت باکتری‌کشی با توجه به مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی برای هر عصاره تعیین گردید به طوری که میزان ۵ میکرولیتر از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آنها متوقف شده بود به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح و به طور یکنواخت پخش گردیده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پایین‌ترین غلظت عصاره که در آن ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها رشد نکرده (فاقد رشد باکتری) بودند به عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی در نظر گرفته شد. به منظور تایید نتایج، آزمون‌ها سه بار تکرار گردیدند(۷).

۲-٦-روش های آماری

به منظور بررسی اثر متغیرهای مورد مطالعه (زمان و شدت صوت) بر مقدار ترکیبات فنلی، قدرت رادیکال‌گیرندگی و خصوصیات ضدمیکروبی عصاره از روش سطح پاسخ و نرم افزار Design Expert نسخه ۱۱ استفاده گردید. بر اساس طرح سطح پاسخ، مدل Box-Behnken برای بررسی دو متغیر در سه سطح انتخاب شد و ۱۳ آزمون جهت بررسی روند میزان استخراج و تعیین شرایط بهینه انجام گردید (جداول ۱و۲و۳). مقایسات میانگین بین عصاره الکلی ریشه و برگ به وسیله آزمون یو من- ویتنی۲ در طرح کاملا تصادفی و در سطح ۱ درصد=α به وسیله نرم افزار SAS.9.1 صورت گرفت.

جدول ۱- تیمارهای طراحی شده در آزمون سطح پاسخ و مقادیر پاسخ‌ها برای آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه

تیمار	زمان (A) (دقیقه)	شدت صوت (B) (درصد)	ترکیبات فنلی کل عصاره الکلی برگ (میلی‌گرم بر گرم)	IC_{50} عصاره الکلی برگ (میکروگرم بر میلی‌گرم)	ترکیبات فنلی کل عصاره الکلی ریشه (میلی‌گرم بر گرم)	IC_{50} عصاره الکلی ریشه (میکروگرم بر میلی‌گرم)
۱	۱٤	٤۹	۱۳/۲۲	۱۸/۷۵	٦/۵۸	۷۸/۱۲
۲	۲۵	٤۰	۱۲/٤۸	۱۹/۷٤	٦/۲۵	۷۹/۲۸
۳	۳٦	٤۹	۱۵/۳۲	۱۷/۰٤	۷/۱۰	۷۵/۰۰
٤	۱۰	۷۰	۱٦/٤۵	۱٦/۳۱	۸/۲٤	۷۰/۳٦
۵	۲۵	۷۰	۱۸/۲۸	۱٤/٤۳	۱۰/٤٦	٦۳/۲۳
٦	۲۵	۷۰	۱۸/۲۲	۱٤/٤۷	۱۰/۵۲	٦۱/۸۳
۷	۲۵	۷۰	۱۸/۲۵	۱٤/٤٤	۱۰/٤۰	٦٤/۳۲
۸	۲۵	۷۰	۱۸/۲۷	۱٤/٤۳	۱۰/٤٤	٦۳/۹۳
۹	۲۵	۷۰	۱۸/۸۸	۱۳/۲۰	۹/۰۲	٦۵/۲۰
۱۰	٤۰	۷۰	۲۱/۱۸	۱۱/۷۲	۱۲/۳٤	۵٦/۲٦
۱۱	۱٤	۹۱	۲۲/۱٤	۱۱/۰۳	۱۵/۲۲	٤٦/۸۷
۱۲	۲۵	۱۰۰	۲٦/۲۰	۹/۰٤	۱۸/۳۵	۳۷/۵۰
۱۳	۳٦	۹۱	۲۵/۱۲	۹/٤۳	۱۷/۱۲	٤۰/۱۹

1 - Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

2 - Mann-Whitney U test

جدول ۲- تیمارهای طراحی شده در آزمون سطح پاسخ و مقادیر پاسخ‌ها برای آزمون‌های ضدمیکروبی گیاه (علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت)

تیمار	زمان (A) (دقیقه)	شدت صوت (B) (درصد)	MIC عصاره الکلی برگ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	MBC عصاره الکلی برگ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	MIC عصاره الکلی ریشه (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	MBC عصاره الکلی ریشه (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
۱	۱٤	٤۹	۰/۳۹	۲۵	۰/۷۸	۱۲/۵
۲	۲۵	٤۰	۰/۳۹	۲۵	۰/۷۸	۱۲/۵
۳	۳٦	٤۹	۰/۳۹	۱۲/۵	۰/۷۸	۱۲/۵
٤	۱۰	۷۰	۰/۳۹	۱۲/۵	۰/۷۸	۱۲/۵
۵	۲۵	۷۰	۰/۱۹	٦/۲۵	۰/۳۹	۱۲/۵
٦	۲۵	۷۰	۰/۱۹	٦/۲۵	۰/۳۹	۱۲/۵
۷	۲۵	۷۰	۰/۱۹	٦/۲۵	۰/۳۹	۱۲/۵
۸	۲۵	۷۰	۰/۱۹	٦/۲۵	۰/۳۹	۱۲/۵
۹	۲۵	۷۰	۰/۱۹	٦/۲۵	۰/۳۹	۱۲/۵
۱۰	٤۰	۷۰	۰/۱۹	۳/۱۲	۰/۱۹	٦/۲۵
۱۱	۱٤	۹۱	۰/۱۹	۳/۱۲	۰/۱۹	٦/۲۵
۱۲	۲۵	۱۰۰	۰/۱۹	۱/۵٦	۰/۱۹	٦/۲۵
۱۳	۳٦	۹۱	۰/۱۹	۱/۵٦	۰/۱۹	٦/۲۵

جدول ۳- تیمارهای طراحی شده در آزمون سطح پاسخ و مقادیر پاسخ‌ها برای آزمون‌های ضدمیکروبی گیاه (علیه باکتری *اشریشیاکلی O157*)

تیمار	زمان (A) (دقیقه)	شدت صوت (B) (درصد)	MIC عصاره الکلی برگ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	MBC عصاره الکلی برگ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	MIC عصاره الکلی ریشه (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	MBC عصاره الکلی ریشه (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
۱	۱٤	٤۹	۱۰۰	>۱۰۰	۱۰۰	>۱۰۰
۲	۲۵	٤۰	۱۰۰	>۱۰۰	۱۰۰	>۱۰۰
۳	۳٦	٤۹	۱۰۰	>۱۰۰	۱۰۰	>۱۰۰
٤	۱۰	۷۰	۱۰۰	>۱۰۰	۱۰۰	>۱۰۰
۵	۲۵	۷۰	۵۰	۱۰۰	۵۰	۱۰۰
٦	۲۵	۷۰	۵۰	۱۰۰	۵۰	۱۰۰
۷	۲۵	۷۰	۵۰	۱۰۰	۵۰	۱۰۰
۸	۲۵	۷۰	۵۰	۱۰۰	۵۰	۱۰۰
۹	۲۵	۷۰	۵۰	۱۰۰	۵۰	۱۰۰
۱۰	٤۰	۷۰	۲۵	۵۰	۵۰	۱۰۰
۱۱	۱٤	۹۱	۲۵	۵۰	۵۰	۱۰۰
۱۲	۲۵	۱۰۰	۱۲/۵	۲۵	۲۵	۵۰
۱۳	۳٦	۹۱	۱۲/۵	۲۵	۲۵	۵۰

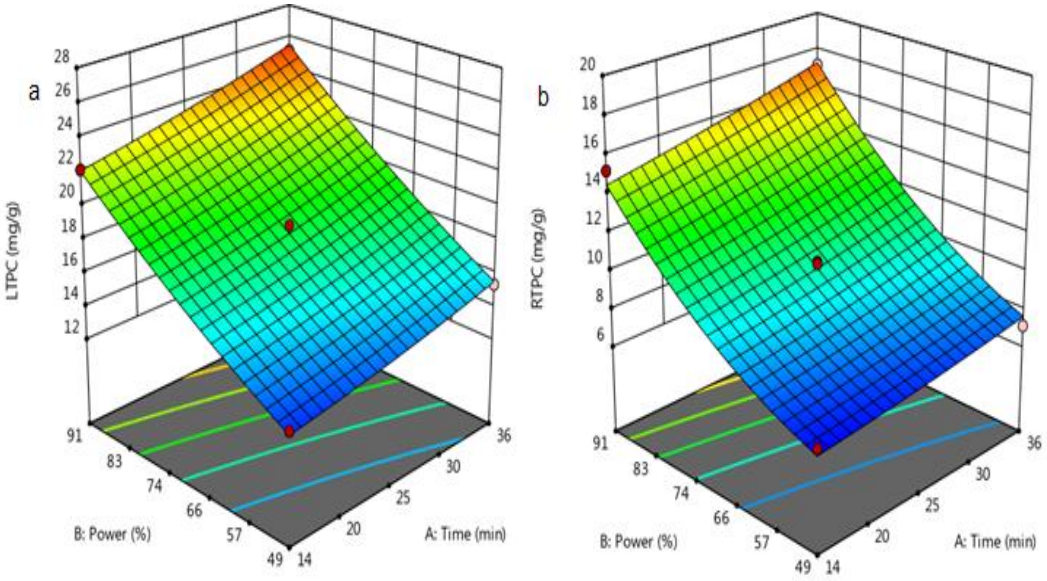
۳- نتایج و بحث

۳-۱-انتخاب بهترین مدل

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری بوسیله روش سطح پاسخ از بخش مدل نشان داد که مدل Quadratic برای آزمون‌های اندازه‌گیری شده در این مطالعه، دارای اختلاف معنی‌دار با سایر مدل‌ها بود و این مدل جهت آنالیز آماری آزمون‌ها انتخاب گردید. پس از انتخاب بهترین مدل، جهت تعیین معادله کلی با توجه به جدول ANOVA، پارامتری که آزمون F برای آن معنی دار نباشد (۵ درصد<P) از مدل حذف شد و سایر پارامترها که دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵٪ بودند در مدل نگهداری شدند. سپس معادله کلی با استفاده از ضرایب داده شده برای هر پارامتر حاصل گردید.

۳-۲-اثر زمان و شدت فراصوت بر استخراج ترکیبات فنلی برگ و ریشه

با توجه به شکل۱که اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت فراصوت را بر مقدار ترکیبات فنلی نشان می‌دهد، مشاهده گردید که با افزایش زمان و شدت فراصوت مقدار استخراج ترکیبات فنلی افزایش می‌یابد. همانند تاثیر زمان و شدت فراصوت در استخراج ترکیبات فنلی برگ، نتایج نشان داد که با افزایش زمان و شدت فراصوت مقدار استخراج ترکیبات فنلی از ریشه نیز افزایش می‌یابد.



شکل ۱- نمایش نمودار سه بعدی، اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت صوت بر میزان ترکیبات فنلی کل عصاره‌های اتانولی برگ (a) و ریشه گیاه (b)

میانگین میزان ترکیبات فنلی کل استخراجی از برگ و ریشه گیاه کبر با حلال اتانول به روش فراصوت به ترتیب ۱۸/۷۷ و ۱۰/۹۳ میلی‌گرم بر گرم بودند. میانگین عصاره‌ی الکلی برگ و ریشه گیاه کبر اختلاف معنی‌داری را با یکدیگر نشان دادند (۱درصد>P). ضریب تبیین (R^2) بالا بین مقادیر واقعی و پیش‌بینی‌شده در این تحقیق بیانگر همبستگی بسیار خوب بین نتایج بدست آمده از روش تجربی و مقادیر پیش‌بینی‌شده‌ی میزان استخراج ترکیبات فنلی کل برگ و ریشه با روش‌های آماری هستند (جداول ۴و۵). گو[1] و همکاران (۲۰۰۷) در استخراج کاتکین‌ها و کافئین از چای به روش فراصوت بیان کردند که یک روند افزایشی در میزان استخراج با افزایش زمان وجود دارد. فاکتور زمان مدت انتقال جرم را افزایش می‌دهد(۲۰). شدت صوت نیز با محتوای انرژی بالای امواج باعث ایجاد نیروی برشی و شکستن و متلاشی‌کردن دیواره‌های سلولی و افزایش احتمال

1 -Gu

رهایش محتویات گیاه به محیط استخراج و بهبود انتقال جرم می‌گردد(۲۴). با توجه به پارامترهای معنی‌دار در فرآیند استخراج ترکیبات فنلی کل از برگ و ریشه گیاه بر اساس جداول آنالیز واریانس (جداول ۴و۵) معادلات کلی را می‌توان به صورت زیر گزارش کرد:

معادله ۱– معادله کلی میزان استخراج ترکیبات فنلی کل از برگ گیاه با حلال اتانول

$$Y=۱۸/۳۸ + ۱/۴۷\ A + ۴/۷۷\ B + ۰/۴۵\ B^2$$

معادله ۲- معادله کلی میزان استخراج ترکیبات فنلی کل از ریشه گیاه با حلال اتانول

$$Y=۱۰/۱۷ + ۱/۰۳\ A + ۴/۴۷\ B + ۱/۱۲\ B^2$$

که Y: میزان ترکیبات فنلی کل استخراجی بر حسب میلی‌گرم بر گرم، A: زمان بر حسب دقیقه و B: شدت صوت بر حسب درصد می‌باشد. با توجه به معادله‌های ۱و۲، شدت صوت(B) به عنوان موثرترین فاکتور استخراج ترکیبات فنلی کل با استفاده از حلال الکلی از برگ و ریشه گیاه کبر بدست آمد. شرایط بهینه برای استخراج ترکیبات فنلی کل از برگ و ریشه گیاه کبر با حلال اتانول به روش فراصوت در زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد به ترتیب مقدار ۲۵/۴۷ میلی‌گرم بر گرم برای برگ ومقدار ۱۷/۲۴میلی‌گرم بر گرم برای ریشه به دست آمد که نشان دهنده بالاتر بودن میزان ترکیبات فنلی کل استخراجی از برگ گیاه کبر در مقایسه با ریشه است. در مطالعه بویار[1] و همکاران (۲۰۱۱)، میزان ترکیبات فنلی تام برگ‌های گیاه کبر منطقه ترانس هیمالیا[2] بین ۲۱/۴۲ تا ۲۷/۶۲ میلی‌گرم بر گرم گزارش شد(۱۶) که با میزان بهینه مطالعه حاضر مطابقت دارد. میزان ترکیبات فنلی عصاره‌های متانولی استخراجی از برگ و ساقه گیاه علف مار (*Capparis spinosa L.*) در مطالعه راشدی و همکاران (۱۳۹۳) به ترتیب ۲۸/۷۳ و ۱۴/۴۰ میلی‌گرم بر گرم به دست آمد(۳) که نشان داد میزان ترکیبات فنلی برگ گیاه بیشتر از ریشه و همسو با مطالعه حاضر است. محبوبی و محبوبی (۲۰۱۴) میزان ترکیبات فنلی کل استخراجی از ریشه گیاه کبر با حلال اتانول ۷۰ درصد به روش غرقابی را ۲۲/۴ میلی‌گرم بر گرم گزارش کردند(۲۶). در مطالعه‌ی حاضر میزان بهینه ترکیبات فنلی کل استخراجی از ریشه گیاه کبر کمتر از این میزان بوده و این اختلاف می‌تواند ناشی از تفاوت در شرایط محیطی محل رویش گیاه باشد(۱۳). دهقان تنها و همکاران (۱۳۹۸) در مطالعه‌ای به بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات فنلی فلفل قرمز با استفاده از حلال متانول به روش سطح پاسخ پرداختند و بیشترین میزان ترکیبات فنلی فلفل قرمز را ۴۹/۶ میلی‌گرم در صدگرم فلفل در دمای ۴۹ درجه سلسیوس، زمان ۳۹ دقیقه و شدت صوت ۸۹/۸ درصد حمام فراصوت گزارش و نشان دادند که با افزایش زمان و شدت فراصوت میزان استخراج ترکیبات فنلی فلفل قرمز افزایش می‌یابد و فاکتور شدت صوت را تاثیرگذارترین پارامتر در استخراج بیان کردند(۲) که با مطالعه حاضر مطابقت دارد.

1 - Bhoyar

2 - Trans-Himalaya region

جدول ٤- آنالیز واریانس (ANOVA) مدل Quadratic میزان ترکیبات فنلی کل عصاره‌های الکلی برگ گیاه

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	عدد F	عدد P
مدل	۲۰۰/٦۹	٥	٤۰/۱٤	۳۸٥/۳٤	<۰/۰۰۰۱
A (زمان)	۱۷/۳۱	۱	۱۷/۳۱	۱٦٦/۲۳	<۰/۰۰۰۱
B (شدت صوت)	۱۸۱/٦۷	۱	۱۸۱/٦۷	۱۷٤٤/۱۳	<۰/۰۰۰۱
AB	۰/۱۹۳٦	۱	۰/۱۹۳٦	۱/۸٦	۰/۲۱٥۰
A^2	۰/۲۳۹۷	۱	۰/۲۳۹۷	۲/۳۰	۰/۱۷۳۱
B^2	۱/٤۰	۱	۱/٤۰	۱۳/٤۱	۰/۰۰۸۰
باقیمانده	۰/۷۲۹۱	۷	۰/۱۰٤۲		
Lack of fit	۰/٤۱٤٥	۳	۰/۱۳۸۲	۱/۷٦	۰/۲۹۳۹
خطای محض	۰/۳۱٤٦	٤	۰/۰۷۸٦		
R^2	۰/۹۹٦٤				
R^2 تعدیل شده	۰/۹۹۳۸				
R^2 پیش بینی شده	۰/۹۸۲۹				

جدول ٥- آنالیز واریانس مدل Quadratic میزان ترکیبات فنلی کل عصاره های الکلی ریشه گیاه

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	عدد F	عدد P
مدل	۱۷۷/٥۸	٥	۳٥/٥۲	۷۱/٦٦	<۰/۰۰۰۱
A (زمان)	۸/٤٤	۱	۸/٤٤	۱۷/۰۳	۰/۰۰٤٤
B (شدت صوت)	۱٥۹/۹٥	۱	۱٥۹/۹٥	۳۲۲/۷٥	<۰/۰۰۰۱
AB	۰/٤۷٦۱	۱	۰/٤۷٦۱	۰/۹٦۰٦	۰/۳٥۹۷
A^2	۰/۰۸۹٦	۱	۰/۰۸۹٦	۰/۱۸۰۸	۰/٦۸۳٤
B^2	۸/۷۰	۱	۸/۷۰	۱۷/٥٦	۰/۰۰٤۱
باقیمانده	۳/٤۷	۷	۰/٤۹٥٦		
Lack of fit	۱/۸۱	۳	۰/٦۰٤۸	۱/٤٦	۰/۳٥۱۲
خطای محض	۱/٦٥	٤	۰/٤۱۳۷		
R^2	۰/۹۸۰۸				
R^2 تعدیل شده	۰/۹٦۷۲				
R^2 پیش بینی شده	۰/۹۱٤٥				

۳-۳- اثر زمان و شدت فراصوت بر IC_{50} عصاره برگ و ریشه

شکل۲ تاثیر زمان و شدت فراصوت را بر میزان IC_{50} عصاره‌های برگ و ریشه نشان می‌دهد. میانگین میزان IC_{50} عصاره‌های استخراجی از برگ و ریشه گیاه کبر با حلال اتانول به روش فراصوت به ترتیب۱۴/۱۶ و۶۱/۷۰ میکروگرم برمیلی‌گرم بدست آمد که نشان می‌دهد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی برگ از ریشه بیشتر است (۱درصد>P). میزان IC_{50} پیشگویی شده عصاره‌های استخراجی توسط مدل به طریق آماری همبستگی بسیار خوبی را با نتایج بدست آمده برای برگ و ریشه به روش تجربی نشان داد (جداول ۶و۷). با توجه به شکل ۲ با افزایش زمان و شدت صوت، میزان IC_{50} عصاره‌های استخراجی از برگ و ریشه با حلال اتانول کاهش می‌یابد. با توجه به پارامترهای معنی‌دار در فرآیند استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان از برگ و ریشه گیاه بر اساس جداول آنالیز واریانس (جداول ۶و۷) معادلات کلی را می توان به صورت زیر گزارش کرد:

معادله۳- معادله کلی تعیین میزان IC_{50} عصاره استخراجی از برگ گیاه با حلال اتانول

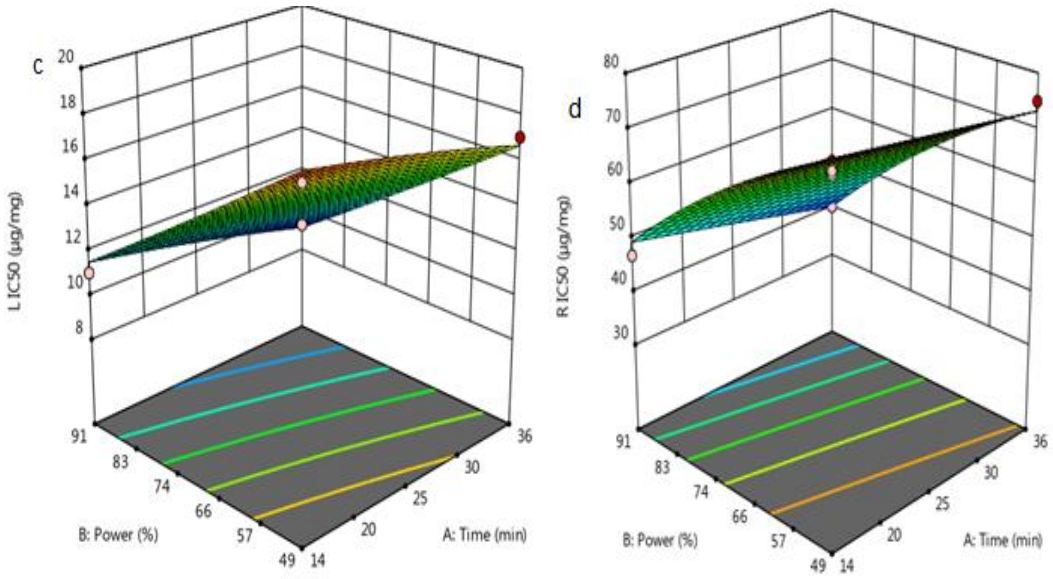
$$Y=۱۴/۱۹ - ۱/۲۳\ A - ۳/۸۱\ B$$

معادله٤- معادله کلی تعیین میزان IC_{50} عصاره استخراجی از ریشه گیاه با حلال اتانول

$$Y=۶۳/۷۰ - ۳/۷۲\ A - ۱۵/۶۴\ B - ۲/۸۶\ B^2$$

که Y: میزان IC_{50} عصاره استخراجی بر حسب میکروگرم بر میلی‌گرم، A: زمان بر حسب دقیقه و B: شدت صوت بر حسب درصد می‌باشد. با توجه به معادله‌های ۳و۴، شدت صوت (B) به عنوان موثرترین فاکتور استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از برگ و ریشه گیاه کبر بدست آمد. شرایط بهینه IC_{50} عصاره‌های استخراجی از برگ و ریشه گیاه با حلال اتانول به روش فراصوت در زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد حمام اولتراسوند به میزان ۹/۱۳ میکروگرم برمیلی‌گرم برای برگ و به میزان ۴۰/۲۰ میکروگرم بر میلی‌گرم برای ریشه بدست آمد. در شرایط بهینه، کارایی عصاره اتانولی برگ گیاه کبر در جمع‌آوری رادیکال‌های دی پی پی اچ خیلی بیشتر از عصاره‌های اتانولی ریشه بود که بامیزان ترکیبات فنلی موجود در برگ گیاه رابطه مستقیم داشت. از جمله ترکیبات آنتی‌اکسیدان برگ گیاه کبر می توان به روتین اشاره کرد(۲۹). نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی ضیاءالحق و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که عصاره‌های متانولی اندام‌های هوایی برگ، گل و میوه گیاه کبر به ترتیب ۱۰۴/۱۷، ۸۶/۰۴ و ۶۹/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر خاصیت آنتی‌اکسیداسیونی دارند که نشان می‌دهد درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه کبر از دیگر قسمت‌های گیاه بیشتر بوده است(۴۰) و با نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر مطابقت دارد. راشدی و همکاران (۱۳۹۳) در مطالعه‌ای به منظور بررسی فیتوشیمیایی و خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه علف مار در استان خوزستان، میزان IC_{50} عصاره‌های متانولی برگ و ساقه گیاه را به ترتیب ۴/۸۳ و ۶/۸۶ میکروگرم بر میلی‌گرم و میزان IC_{50} برگ گیاه را کمتر از اندام‌های دیگر گزارش کردند(۳) که با مطالعه حاضر همسو است. علیازی‌کیوگلو [1] و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای به بررسی ترکیبات فنلیک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنالیز مواد معدنی گیاه *Capparis spinosa L.* پرداختند. نتایج نشان داد، میانگین ترکیبات گیاه دارای غلظت بازدارنده‌ای معادل ۰/۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشند(۱۳) که در مقایسه با نتایج مطالعه حاضر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتری را نشان می‌دهند. محبوبی و محبوبی(۲۰۱۴) در مطالعه‌ای، میزان IC_{50} عصاره‌های اتانولی استخراجی از ریشه گیاه کبر به روش غرقابی را ۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند(۲۶) که در مقایسه با مطالعه حاضر خاصیت آنتی‌اکسیدانی کمتری را نشان داده‌اند. دلیل این تفاوت می تواند ناشی از تاثیر امواج فراصوت در استخراج کارآمد ترکیبات آنتی‌اکسیدان به ویژه ترکیبات فنولیک از گیاه نسبت به روش استخراج سنتی غرقابی باشد.

1 - Aliyazicioglu



شکل ۲- نمایش نمودار سه بعدی اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت صوت بر میزان IC_{50} عصاره‌های اتانولی برگ (c) و ریشه گیاه (d)

جدول ٦- آنالیز واریانس مدل Quadratic میزان فعالیت رادیکال‌گیری دی پی پی اچ عصاره‌های الکلی برگ گیاه

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	عدد F	عدد P
مدل	۱۲۸/۱٦	٥	۲٥/٦۳	۷۰/٤۹	<۰/۰۰۰۱
A (زمان)	۱۲/۰۱	۱	۱۲/۰۱	۳۳/۰۲	۰/۰۰۰۷
B (شدت صوت)	۱۱٥/۹۹	۱	۱۱٥/۹۹	۳۱۹/۰۰	<۰/۰۰۰۱
AB	۰/۰۰۳۰	۱	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۸۳	۰/۹۲۹۹
A^2	۰/۱۰۷۸	۱	۰/۱۰۷۸	۰/۲۹٦٦	۰/٦۰۳۰
B^2	۰/۰۲۷٦	۱	۰/۰۲۷٦	۰/۰۷٥۹	۰/۷۹۰۸
باقیمانده	۲/٥٥	۷	۰/۳٦۳٦		
Lack of fit	۱/۳۱	۳	۰/٤۳٦٤	۱/٤۱	۰/۳٦۲٤
خطای محض	۱/۲٤	٤	۰/۳۰۹۰		
R^2	۰/۹۸۰٥				
R^2 تعدیل شده	۰/۹٦٦٦				
R^2 پیش بینی شده	۰/۹۱٤۰				

جدول ۷- آنالیز واریانس مدل Quadratic میزان فعالیت رادیکال‌گیری دی پی پی اچ عصاره‌های الکلی ریشه گیاه

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	عدد F	عدد P
مدل	۲۱۲۸/۲۱	۵	٤۲۵/٦٤	۱۱۱/۸۷	<۰/۰۰۰۱
A (زمان)	۱۱۰/۵٦	۱	۱۱۰/۵٦	۲۹/۰٦	۰/۰۰۱۰
B (شدت صوت)	۱۹۵۷/٦۹	۱	۱۹۵۷/٦۹	۵۱٤/۵۱	<۰/۰۰۰۱
AB	۳/۱۷	۱	۳/۱۷	۰/۸۳۲۷	۰/۳۹۱۸
A^2	۱/۱۰	۱	۱/۱۰	۰/۲۸۸۵	۰/٦۰۷۸
B^2	۵٦/۷۹	۱	۵٦/۷۹	۱٤/۹۳	۰/۰۰٦۲
باقیمانده	۲٦/٦۳	۷	۳/۸۰		
Lack of fit	۲۰/۲۳	۳	٦/۷٤	٤/۲۱	۰/۰۹۹۳
خطای محض	٦/٤۱	٤	۱/٦۰		
R^2	۰/۹۸۷٦				
R^2 تعدیل شده	۰/۹۷۸۸				
R^2 پیش بینی شده	۰/۹۲۸٦				

۳-٤- میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) رشد عصاره‌های استخراجی الکلی برگ و ریشه گیاه کبر

۳-٤-۱-میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت عصاره‌های اتانولی استخراجی از برگ و ریشه گیاه کبر

با توجه به شکل ۳ با افزایش زمان و شدت صوت، میزان MIC عصاره‌های الکلی برگ و ریشه گیاه کبر علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت کاهش می‌یابد. عصاره‌های الکلی استخراجی از برگ و ریشه گیاه کبر در شدت‌های صوت بالا (۹۱ و ۱۰۰ درصد) قابلیت مهار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت را در کمترین غلظت سریالی (۰/۱۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از خود نشان داده‌اند که بیانگر حساسیت زیاد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت به این عصاره‌های استخراجی می‌باشد. با توجه به پارامترهای معنی‌دار در فرآیند استخراج ترکیبات ضدمیکروبی از برگ و ریشه گیاه بر اساس جداول آنالیز واریانس (جداول ۸و۹) معادلات کلی را می توان به صورت زیر گزارش کرد:

معادله۵-معادله کلی تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز* مثبت عصاره استخراجی از برگ گیاه با حلال اتانول

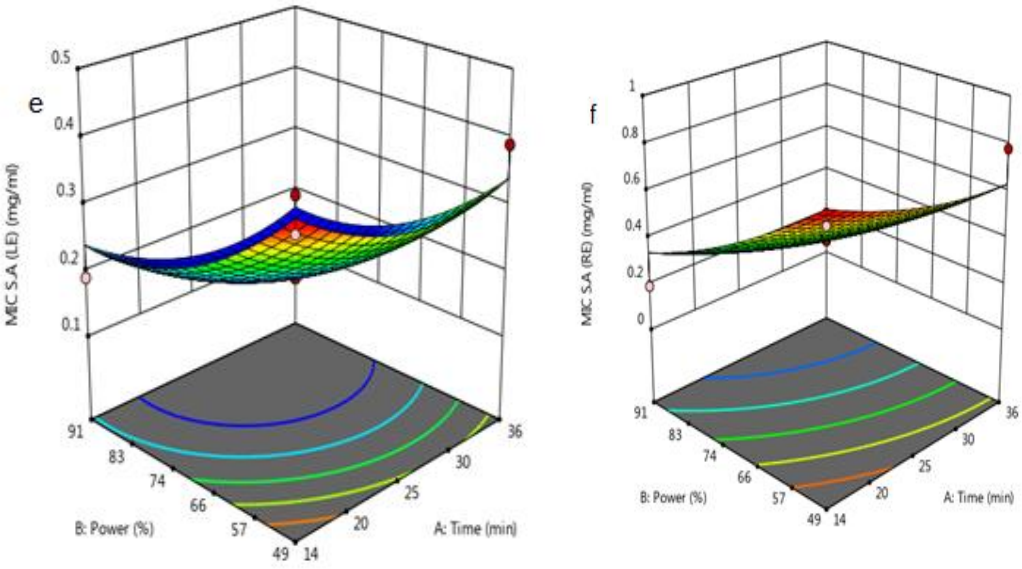
$$Y=۰/۱۹ - ۰/۰۴\ A - ۰/۰۹\ B + ۰/۰۵\ A^2 + ۰/۰۵\ B^2$$

معادله٦-معادله کلی تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز* مثبت عصاره استخراجی از ریشه گیاه با حلال اتانول

$$Y=۰/۳۹ - ۰/۱۰\ A - ۰/۲۵\ B$$

که Y: میزان MIC عصاره استخراجی بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، A: زمان بر حسب دقیقه و B: شدت صوت بر حسب درصد می‌باشد. با توجه به معادله‌های ۵و۶، شدت صوت (B) به عنوان موثرترین فاکتور استخراج ترکیبات ضدمیکروبی از برگ و ریشه گیاه کبر به دست آمد. شرایط بهینه حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت عصاره‌های استخراجی در زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد حمام اولتراسوند به میزان ۰/۱۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای برگ و به میزان ۰/۱۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای ریشه بدست آمد که این موضوع، قدرت ضدمیکروبی بالای عصاره‌های الکلی را نشان می‌دهد. روحانی(۱۳۹۵) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد عصاره‌های الکلی استخراجی از برگ گیاه کبر به روش غرقابی علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را ۱۰۰ میلی‌گرم بر

میلی لیتر گزارش نمود(۴) که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر عدد MIC بیشتری که نشان دهنده مهار ضدمیکروبی پایین‌تری است را نشان می‌دهد. این مقدار در مطالعه محبوبی و محبوبی(۲۰۱۴) در عصاره‌های اتانولی استخراجی از ریشه گیاه کبر به روش غرقابی ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود(۲۶) که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر عدد MIC تقریبا یکسانی را نشان می‌دهد. رحیمی‌فرد و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای، حداقل غلظت بازدارندگی رشد عصاره تام متانولی حاصل از بخش هوایی گیاهان *Capparis cartilaginea* و *Capparis mucronifolia* را علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۳۱/۲۵ و ۱۱/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند که در مقایسه با شرایط بهینه مطالعه حاضر عدد MIC کمتری را نشان می‌دهند(۳۳). این MIC کمتر عصاره‌های استخراجی نسبت به مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از تفاوت ترکیبات بخش‌های هوایی دو گونه گیاه *Capparis* نسبت به *Capparis spinosa* و تفاوت در شرایط محیطی رویش گیاه باشد.



شکل ۳- نمایش نمودار سه بعدی، اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت صوت بر میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت عصاره‌های اتانولی برگ (e) و ریشه گیاه (f)

جدول ۸- آنالیز واریانس مدل Quadratic میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت عصاره‌های الکلی برگ

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	عدد F	عدد P
مدل	۰/۹۹۹۱	۵	۰/۰۱۹۸	۱۱/۸٤	۰/۰۰۲٦
A (زمان)	۰/۰۱۰۰	۱	۰/۰۱۰۰	۵/۹۷	۰/۰٤٤۵
B (شدت صوت)	۰/۰۵۸۳	۱	۰/۰۵۸۳	۳٤/۸۲	۰/۰۰۰٦
AB	۰/۰۰۰	۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰۰
A^2	۰/۰۱۷٤	۱	۰/۰۱۷٤	۱۰/۳۹	۰/۰۱٤٦
B^2	۰/۰۱۷٤	۱	۰/۰۱۷٤	۱۰/۳۹	۰/۰۱٤٦
باقیمانده	۰/۰۱۱۷	۷	۰/۰۱۱۷		
Lack of fit	۰/۰۱۱۷	۳	۰/۰۰۳۹		
خطای محض	۰/۰۰۰	٤	۰/۰۰۰		
R^2	۰/۸۹٤۲				
R^2 تعدیل شده	۰/۸۱۸۷				
R^2 پیش بینی شده	۰/۲٤۷۹				

جدول ۹- آنالیز واریانس مدل Quadratic میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت عصاره‌های الکلی ریشه

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	عدد F	عدد P
مدل	۰/٦۲۲۰	۵	۰/۱۲٤٤	۸/۵٤	۰/۰۰٦۸
A (زمان)	۰/۰۸۷۰	۱	۰/۰۸۷۰	۵/۹۷	۰/۰٤٤۵
B (شدت صوت)	۰/۵۰۷۲	۱	۰/۵۰۷۲	۳٤/۸۲	۰/۰۰۰٦
AB	۰/۰۰۰	۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰۰
A^2	۰/۰۱۵۷	۱	۰/۰۱۵۷	۱/۰۸	۰/۳۳۳۸
B^2	۰/۰۱۵۷	۱	۰/۰۱۵۷	۱/۰۸	۰/۳۳۳۸
باقیمانده	۰/۱۰۲۰	۷	۰/۰۱٤٦		
Lack of fit	۰/۱۰۲۰	۳	۰/۰۳٤۰		
خطای محض	۰/۰۰۰	٤	۰/۰۰۰		
R^2	۰/۸۵۹۲				
R^2 تعدیل شده	۰/۷۵۸٦				
R^2 پیش بینی شده	-۰/۰۰۱۵				

۳-٤-۲-میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد *اشریشیاکلی O157* عصاره‌های اتانولی استخراجی از برگ و ریشه گیاه کبر

میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد عصاره‌های الکلی برگ گیاه کبر علیه باکتری *اشریشیاکلی O157* بسته به شدت صوت و زمان استخراج از ۱۲/۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و عصاره‌های الکلی ریشه گیاه کبر از ۲۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متغیر بودند. در شدت صوت ۹۱ درصد و زمان ۳٦ دقیقه حمام اولتراسوند، عصاره الکلی برگ میزان MIC کمتری را نسبت به عصاره الکلی ریشه دارا بود. روحانی(۱۳۹۵) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد عصاره‌ی الکلی برگ گیاه کبر علیه باکتری *اشریشیاکلی* را ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش نمود(٤) که در مقایسه با میزان MIC مطالعه حاضر (۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، عدد MIC بیشتری را نشان می‌دهد. محبوبی و محبوبی (۲۰۱٤) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد عصاره اتانولی ریشه گیاه کبر علیه باکتری *اشریشیاکلی* را ۲۵/٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند(۲٦) که در مقایسه با کمترین میزان MIC مطالعه حاضر(۲۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، MIC تقریبا یکسان را علیه باکتری *اشریشیاکلی* از خود نشان داده‌اند. محبوبی‌امین(۱۳۹۳) در مطالعه‌ای، اثر ضدمیکروبی عصاره تام متانولی حاصل از بخش هوایی گیاه *Capparis Cartilaginea Decne* را علیه باکتری *اشریشیاکلی* با MIC٦۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر گزارش کرد(۹) که در مقایسه با کمترین میزان MIC مطالعه حاضر دارای حداقل غلظت بازدارندگی رشد کمتری علیه باکتری *اشریشیاکلی* بود. رحیمی‌فرد و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای، حداقل غلظت بازدارندگی رشد عصاره تام متانولی حاصل از بخش هوایی گیاهان *Capparis Cartilaginea* و *Capparis Mucronifolia* را علیه باکتری *اشریشیاکلی* به ترتیب ٤۱/٦۷ و ٤٦/۸۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند(۳۳) که در مقایسه با کمترین میزان MIC مطالعه حاضر دارای عددMIC پایینتری هستند.

۳-۵-میزان‌حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) عصاره‌های الکلی استخراجی از برگ و ریشه گیاه کبر

۳-۵-۱-میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت عصاره‌های اتانولی استخراجی از برگ و ریشه گیاه کبر

MBC در غلظت‌های سریالی تهیه شده به حداقل غلظتی از عصاره اختصاص دارد که قادر به مهار رشد ۹۹/۹ درصد باکتری مورد مطالعه باشد. نتایج حاصل از مقایسه میزان MBC عصاره‌های استخراجی از برگ و ریشه گیاه کبر با حلال اتانول علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت در مرحله آزمایش با مقدار پیشگویی شده توسط مدل به طریق آماری بیانگر همبستگی بسیار خوب بین نتایج بدست آمده بین روش تجربی برای برگ و ریشه و مقادیر پیش‌بینی‌شده با روش آماری بود (جداول ۱۰و۱۱). با توجه به شکل ٤ با افزایش زمان و شدت صوت، میزان MBC عصاره‌های الکلی برگ و ریشه گیاه کبر علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت کاهش یافت. عصاره‌های الکلی استخراجی از برگ و ریشه گیاه کبر در شدت صوت بالای ۹۱ درصد و زمان ۳٦ دقیقه و نیز شدت صوت ۱۰۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه، قابلیت باکتری‌کشی ۹۹/۹ درصد از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت را به ترتیب در غلظت ۱/۵٦ و ٦/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از خود نشان دادند که بیانگر فعالیت ضدمیکروبی بالای عصاره استخراجی از برگ گیاه نسبت به عصاره‌ی ریشه می‌باشد. عصاره‌های استخراجی از برگ گیاه در اثر امواج فراصوت با شدت بالا به دلیل وجود ترکیبات فنولیک و آنتی اکسیدان بیشتر از جمله روتین نسبت به ریشه گیاه دارای اثر باکتری‌کشی بیشتری علیه *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت بوده و از اینرو در غلظت پایین‌تری نسبت به عصاره‌های ریشه قادر به کشندگی ۹۹/۹ درصد باکتری می‌باشند. با توجه به پارامترهای معنی‌دار در فرآیند استخراج ترکیبات ضدمیکروبی از برگ و ریشه گیاه بر اساس جداول آنالیز واریانس (جداول ۱۰و۱۱) معادلات کلی را می توان به صورت زیر گزارش کرد:

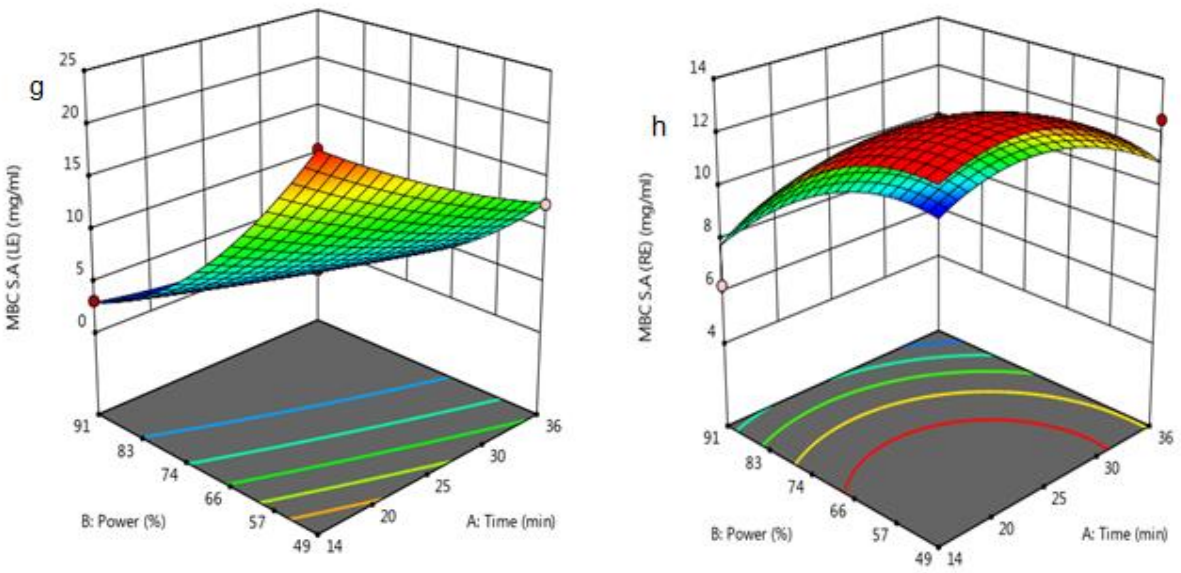
معادله۷-معادله کلی تعیین میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی *استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز* مثبت عصاره استخراجی از برگ گیاه با حلال اتانول

$$Y=٦/٢٥ - ٣/٤٢\ A - ٨/٢٥\ B + ٢/٧٣\ AB + ٠/٧٨\ A^2 + ٣/٥١\ B^2$$

معادله۸-معادله کلی تعیین میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی *استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز* مثبت عصاره استخراجی از ریشه گیاه با حلال اتانول

$$Y=١٢/٥ - ١/١٠\ A - ٢/٦٧\ B - ١/٥٦\ A^2 - ١/٥٦\ B^2$$

که Y: میزان MBC عصاره استخراجی بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، A: زمان بر حسب دقیقه و B: شدت صوت بر حسب درصد می‌باشد. با توجه به معادله‌های ۷و۸ شدت صوت (B) به عنوان موثرترین فاکتور استخراج ترکیبات ضدمیکروبی از برگ و ریشه گیاه کبر بدست آمد. شرایط بهینه حداقل غلظت باکتری‌کشی *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت عصاره‌های استخراجی از برگ و ریشه گیاه با حلال اتانول به روش فراصوت در زمان ۳٦ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد حمام اولتراسوند به میزان ۱/٦۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای برگ و به میزان ۵/٦۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر برای ریشه بدست آمد. روحانی (۱۳۹۵) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی عصاره‌ی الکلی برگ گیاه کبر علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش نمود(٤) که در مقایسه با میزان بهینه MBC عصاره الکلی برگ گیاه در مطالعه حاضر MBC بیشتری را نشان می‌دهد. محبوبی و محبوبی (۲۰۱٤) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی عصاره‌های اتانولی ریشه گیاه کبر علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را ٦/٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند(۲٦) که از میزان بهینه MBC عصاره الکلی ریشه گیاه در مطالعه حاضر بیشتر است.



شکل ٤- نمایش نمودار سه بعدی، اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت صوت بر میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت عصاره‌های اتانولی برگ (g) و ریشه گیاه (h)

جدول ۱۰- آنالیز واریانس مدل Quadratic میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت عصاره‌های الکلی برگ

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	عدد F	عدد P
مدل	۷۵۳/۹۳	۵	۱۵۰/۷۹	۱۱٤۱۲/۹۳	<۰/۰۰۰۱
A (زمان)	۹۳/۳۳	۱	۹۳/۳۳	۷۰٦٤/٤٥	<۰/۰۰۰۱
B (شدت صوت)	٥٤۳/۹۹	۱	٥٤۳/۹۹	٤۱۱۷٤/٦۳	<۰/۰۰۰۱
AB	۲۹/۹۲	۱	۲۹/۹۲	۲۲٦٤/۷۱	<۰/۰۰۰۱
A^2	٤/۲۳	۱	٤/۲۳	۳۲۰/۳٥	<۰/۰۰۰۱
B^2	۸٥/۹٥	۱	۸٥/۹٥	٦٥۰٥/٥۰	<۰/۰۰۰۱
باقیمانده	۰/۰۹۲٥	۷	۰/۰۱۳۲		
Lack of fit	۰/۰۹۲٥	۳	۰/۰۳۰۸		
خطای محض	۰/۰۰۰	٤	۰/۰۰۰		
R^2	۰/۹۹۹۹				
R^2 تعدیل شده	۰/۹۹۹۸				
R^2 پیش بینی شده	۰/۹۹۹۱				

جدول ۱۱- آنالیز واریانس مدل Quadratic میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت عصاره‌های الکلی ریشه

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	عدد F	عدد P
مدل	۹۶/۷۳	۵	۱۹/۳۵	۱۱/۸٤	۰/۰۰۲٦
A (زمان)	۹/۷۷	۱	۹/۷۷	۵/۹۷	۰/۰٤٤٥
B (شدت صوت)	٥٦/۹۲	۱	٥٦/۹۲	۳٤/۸۲	۰/۰۰۰٦
AB	۰/۰۰۰	۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰۰
A^2	۱٦/۹۸	۱	۱٦/۹۸	۱۰/۳۹	۰/۰۱٤٦
B^2	۱٦/۹۸	۱	۱٦/۹۸	۱۰/۳۹	۰/۰۱٤٦
باقیمانده	۱۱/٤٤	۷	۱/٦۳		
Lack of fit	۱۱/٤٤	۳	۳/۸۱		
خطای محض	۰/۰۰۰	٤	۰/۰۰۰		
R^2	۰/۸۹٤۲				
R^2 تعدیل شده	۰/۸۱۸۷				
R^2 پیش بینی شده	۰/۲٤۷۹				

۳-۵-۲-میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی *اشریشیاکلی O157* عصاره‌های اتانولی استخراجی از برگ و ریشه گیاه کبر

میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی عصاره‌های الکلی برگ گیاه کبر علیه باکتری *اشریشیاکلی O157* بسته به شدت صوت و زمان استخراج از ۲۵ تا بیشتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و عصاره‌های الکلی ریشه گیاه کبر از ۵۰ تا بیشتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متغیر بودند. در شدت صوت ۹۱ درصد و زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۱۰۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه حمام اولتراسوند، عصاره‌های الکلی استخراجی از برگ کمترین میزان MBC را نسبت به عصاره‌های الکلی ریشه از خود نشان دادند. روحانی (۱۳۹۵) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی عصاره‌های الکلی برگ گیاه کبر علیه باکتری *اشریشیاکلی* را ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش نمود(۴) که در مقایسه با کم ترین میزان MBC عصاره الکلی برگ گیاه در مطالعه حاضر دارای میزان MBC بیشتری بود. محبوبی و محبوبی(۲۰۱۴) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی عصاره‌های اتانولی ریشه گیاه کبر علیه باکتری *اشریشیاکلی* را ۲۵/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند(۲۶) که در مقایسه با کمترین میزان MBC عصاره‌های اتانولی ریشه گیاه (۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) در مطالعه حاضر دارای میزان MBC کمتری بودند.

٤-نتیجه گیری

استخراج ترکیبات با استفاده از روش فراصوت یکی از روش‌های سریع و با کارایی بالا می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش فاکتورهای زمان و شدت صوت، استخراج ترکیبات فنلیک، آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی از برگ و ریشه گیاه افزایش یافته است و شدت صوت به عنوان تاثیرگذارترین فاکتور انتخاب شد. شرایط بهینه استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی، زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد بدست آمد که در آن میزان بهینه استخراج ترکیبات فنلی کل از برگ و ریشه گیاه به ترتیب ۲۵/۴۷ و ۱۷/۲۴ میلی‌گرم بر گرم و میزان بهینه IC_{50} عصاره‌های استخراجی از برگ و ریشه گیاه به ترتیب ۹/۱۳ و ۴۰/۲۰ میکروگرم بر میلی‌گرم دیده شد. میزان بهینه حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت عصاره‌های استخراجی از برگ و ریشه گیاه با حلال اتانول به روش فراصوت به ترتیب ۰/۱۷

و ۰/۱۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید. این مقادیر علیه باکتری *اشریشیاکلی O157* بسته به شدت صوت و زمان استخراج از ۱۲/۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای عصاره‌های برگ و از ۲۵ تا۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای عصاره‌های ریشه گیاه کبر متغیر بودند. میزان بهینه حداقل غلظت باکتری‌کشی *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز* مثبت عصاره‌های استخراجی از برگ و ریشه گیاه به ترتیب ۱/۶۲ و ۵/۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید. این مقادیر علیه باکتری *اشریشیاکلی O157* از ۲۵ تا بیشتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای عصاره‌های برگ و از ۵۰ تا بیشتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای عصاره‌های الکلی ریشه گیاه کبر متغیر بودند.

۵-منابع

۱. ابونجمی، م.، قربانی، م. و قربانی جاوید، م. ۱۳۹٤. امواج فراصوتی روشی نوین در استخراج ترکیب‌های گیاهی. *نشریه علمی ترویجی صوت و ارتعاش*، سال چهارم، شماره ۸، ۹۹-۸۵.

۲. دهقان تنها، ر.، مهدیان، ا.، امینی فرد، م ح.، بیات، ح. و گاراژیان، ر. ۱۳۹۸. بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات فنلی فلفل قرمز با استفاده از امواج فراصوت به روش سطح پاسخ. *نشریه نوآوری در علوم و فناوری غذایی*، سال یازدهم، شماره ۱، ۹۵-۸۵.

۳. راشدی، ه.، امیری، ح. و قارزی، ا. ۱۳۹۳. بررسی فیتوشیمیایی و خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه علف مار استان خوزستان. *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین*، سال هجدهم، شماره ٦ (پیاپی۷۷)، ۱۷-۱۱.

٤. روحانی، ح. ۱۳۹۵. تعیین برخی خواص اکولوژیکی، آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی گیاه مرتعی کور (*Capparis spinosa*) در رویشگاه‌های شهرستان گناباد. پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی منابع طبیعی، علوم مرتع‌داری، دانشگاه تربت حیدریه، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی.

۵. زرگری، ع. ۱۳۹۰. گیاهان دارویی. جلد اول، موسسه انتشارات دانشگاه تهران، تهران. صفحات ۲٦۱-۲۵۹.

٦. عالی، ا.، محمودی، ر.، کاظمی نیا، م.، حضرتی، ر. و آذرپی، ف. ۱۳۹٦. اسانس‌های گیاهی به عنوان ترکیبات دارویی طبیعی: مقاله مروری. *مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران*، جلد ۷۵، شماره ۷، ٤۸۹-٤۸۰.

۷. علیزاده بهبهانی، ب.، شهیدی، ف.، طباطبایی یزدی، ف.، مرتضوی، س. ع. و محبی، م. ۱۳۹۵. اثر ضدمیکروبی و برهمکنش عصاره‌های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر (*Plantago major*) بر *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا* در شرایط برون‌تنی. *فصلنامه بیماری‌های عفونی و گرمسیری وابسته به انجمن متخصصین بیماری‌های عفونی و گرمسیری*، سال بیست و یکم، شماره ۷۵، ۸-۱.

۸. قربانی، م.، ابونجمی، م.، قربانی جاوید، م. و عرب حسینی، ا. ۱۳۹٦. تاثیر شرایط عصاره‌گیری با امواج فراصوت بر عملکرد و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*). *مجله علوم و صنایع غذایی*، جلد ۱٤، شماره ٦۷، ۷۳-٦۳.

۹. محبوبی امین، م. ۱۳۹۳. بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره تام و فراکسیون‌های اتردوپترولی، کلروفرمی، اتیل‌استاتی، متانولی و آبی حاصل از بخش هوایی *Capparis cartilaginea decne* علیه ٦ سوش باکتریایی. پایان‌نامه دکتری رشته داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم دارویی، دانشکده داروسازی.

۱۰. مهربان، ا. ۱۳۹۳. بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی گیاه *Salvia chorassanica* بر برخی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا با منشا غذایی در شرایط آزمایشگاهی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی، علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی.

۱۱. مهربان، ا.، عدالتیان دوم، م.، حداد خداپرست، م. ح. و مهربان سنگ آتش، م. ۱۳۹۵. ارزیابی اثرات مهارکنندگی و کشندگی عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه سالویا خراسانیکا علیه برخی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در شرایط آزمایشگاهی. *مجله دانشگاه علوم پزشکی قم*، جلد ۱۰، شماره ۲، ۱۱-۲.

۱۲. وحید، ح.، یوسفی، م. و امامی، س. ا. ۱۳۹۵. گیاه کبر از دیروز تا امروز. *مجله طب سنتی اسلام و ایران*، سال هفتم، شماره ۱، ۵۲-۴۵.

13. Aliyazicioglu, R., Eyupoglu, O. E., Sahin, H. Yildiz, O. and Baltas, N. 2013. Phenolic components, antioxidant activity, and mineral analysis of *Capparis spinosa L.* *African Journal of Biotechnology*, 12(47): 6643-6649.
14. Aslam, M. and Sial, A. A. 2014. Effect of hydroalcoholic extract of *cydonia oblonga* miller (quince) on sexual behaviour of wistar rats. *Advances in Pharmacological Sciences*, 20(3): 1-6.
15. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils–a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2): 446-475.
16. Bhoyar, M. S., Mishra, G. P., Naik, P. K. and Srivastava, R. B. 2011. Estimation of antioxidant activity and total phenolics among natural populations of Caper (*'Capparis spinosa'*) leaves collected from cold arid desert of Trans-Himalayas. *Australian Journal of Crop Science*, 5(7): 912-919.
17. Fallah Huseini, H., Hasani-Rnjbar, S., Nayebi, N., Heshmat, R., Sigaroodi, F. K., Ahvazi, M. and et al. 2013. *Capparis spinosa L.* (Caper) fruit extract in treatment of type 2 diabetic patients: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Medicine*, 21(5): 447-452.
18. Gan, L., Zhang, C., Yin, Y., Lin, Z., Huang, Y., Xiang, J. and et al. 2013. Anatomical adaptations of the xerophilous medicinal plant, *Capparis spinosa*, to drought conditions. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 54(2): 156-161.
19. Giménez, T., Mula, D., Gea-Botella, S., Martínez-Madrid, M. C., Martí, N., Valero, M. and et al. 2019. Lipase catalyzed deacidification of tocopherol-rich distillates obtained from natural Vitamin E sources. *Process Biochemistry*, 77: 70-76.
20. Gu, X., Cai, J., Zhang, Z. and Su, Q. 2007. Dynamic ultrasound-assisted extraction of catechins and caffeine in some tea samples. *Annali di Chimica: Journal of Analytical, Environmental and Cultural Heritage Chemistry*, 97(5-6): 321-330.
21. Hayouni, E.A., Abedrabba, M., Bouix, M. and Hamdi, M. 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera L.* and *Juniperus phoenicea L.* fruit extracts. *Food Chemistry*, 105(3):1126-1134.
22. Heydari Majd, M., Rajaei, A., Salar Bashi, D., Mortazavi, S. A. and Bolourian, S. 2014. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine pennyroyal (*Phlomidoschema parviflorum*) leaves using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 57: 195-202.
23. Jokar, M., Rahman, R. A., Ibrahim, N. A., Abdullah, L. C. and Tan, C. P. 2012. Melt production and antimicrobial efficiency of low-density polyethylene (LDPE)-silver nanocomposite film. *Food and bioprocess technology*, 5(2): 719-728.

24. Li, J. W., Ding, S. D. and Ding, X. L. 2007. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba cv. jinsixiaozao*. *Journal of food engineering*, 80(1): 176-183.
25. Luque-Garcıa, J. and De Castro, M. L. 2003. Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(1): 41-47.
26. Mahboubi, M. and Mahboubi, A. 2014. Antimicrobial activity of *Capparis spinosa* as its usages in traditional medicine. *Herba Polonica*, 60(1): 39-48.
27. Mansour, R. B., Jilani, I. B., Bouaziz, M., Gargouri, B., Elloumi, N., Attia, H. and et al. 2016. Phenolic contents and antioxidant activity of ethanolic extract of *Capparis spinosa*. *Cytotechnology*, 68(1): 135-142.
28. Mishra, B. B. and Tiwari, V. K. 2011. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(10): 4769-4807.
29. Moghaddasian, B., Eradatmand, A. and Alaghemand, A. 2012. Quantitative analysis of quercetin in different parts of *Capparis spinosa* by HPLC. *Annals of Biological Research*, 3(12): 5775-5778.
30. Mollica, A. 2017. Anti-diabetic and anti-hyperlipidemic properties of *Capparis spinosa L.*: In vivo and in vitro evaluation of its nutraceutical potential. *Journal of functional foods*, 35: 32-42.
31. Moufid, A. and Farid, O., Eddouks, M. 2015. Pharmacological Properties of *Capparis spinosa* Linn. *Int J Diabetol Vasc Dis Res*, 3(5): 99-104.
32. Ozturk, S. and Ercisli, S. 2007. Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides*. *Food control*, 18(5): 535-540.
33. Rahimifard, N., Shojaii, A., Mahbobi, M., Hafezan, G., Bagheri, F. and Asgarpanah, J. 2015. Evaluation of antibacterial activity and flavonoid content of two Capparis species from iran. *Journal of Medicinal Plants*, 3(55): 89-94.
34. Sharififar, F. Moshafi, M., Mansouri, S., Khodashenas, M. and Khoshnoodi, M. 2007. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food control*, 18(7):800-805.
35. Tai, C. J., Wang, W. C., Wang, C. K., Wu, C. H., Yang, M. D., Chang, Y. J. and et al. 2013. Fermented wheat germ extract induced cell death and enhanced cytotoxicity of Cisplatin and 5-Fluorouracil on human hepatocellular carcinoma cells. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013: 1-9.
36. Wu, Y., Cui, S. W., Tang, J. and Gu, X. 2007. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds by response surface methodology. *Food chemistry*, 105(4): 1599-1605.
37. Yang, T., Liu, Y., Wang, C. and Wang, Z. 2008. Advances on investigation of chemical constituents, pharmacological activities and clinical applications of *Capparis spinosa*. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*, 33(21): 2453-2458.
38. Zeggwagh, N., Michel, J. and Eddouks, M. 2007. Cardiovascular effect of *Capparis spinosa* aqueous extract. part VI: in vitro vasorelaxant Effect. *Am J Pharmacol Toxicol*, 2(3): 135-139.
39. Zhou, H., Jian, R., Kang, J., Huang, X., Li, Y., Zhuang, C. and et al. 2010. Anti-inflammatory effects of caper (*Capparis spinosa L.*) fruit aqueous extract and the isolation of main phytochemicals. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(24): 12717-12721.
40. Zia-Ul-Haq, M., Ćavar, S., Qayum, M., Imran, I. and Feo, V. d. 2011. Compositional studies: antioxidant and antidiabetic activities of *Capparis decidua* (Forsk.) Edgew. *International journal of molecular sciences*, 12(12): 8846-8861.

(Original Research Paper)

Optimization of Antimicrobial and Antioxidant Eextraction of Caper (*Capparis spinosa*) Leaves and Roots Assisted by Ultrasonic Waves

Abdolvahed Safarzaei[1], Hamid Sarhadi[1*], Alireza Dashipour[2]

1-Department of Food Science and Technology, Bam Branch, Islamic Azad University, Bam, Iran.
2-Department of Food Science and Technology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

Received: 08/06/2019 Accepted:28/08/2019

Abstract

Herbals have effective components such as phenolic, antimicrobial, and antioxidant. There are many methods to extract these compounds include soxhlet, maceration, microwave and ultrasound. Kind of method extraction is effective to quantity and quality material extracted. The aim of this study was survey of ultrasound extraction efficacy in phenolics, antimicrobial and antioxidants of leaves and roots of *Capparis spinosa L.* Response surface methodology (RSM) and Box–Behnken design were employed for the optimization of two extraction parameters, including extraction time (10, 25, 40 min) and ultrasound power (40, 70, 100 %) by alcoholic extraction. The results showed ultrasound power was more effective factor than time. By increasing of ultrasound power and the time of extraction the yield increased. The optimum extraction conditions for antioxidant and antimicrobial extraction were as follows: extraction time 36 min and ultrasound power 91 percent. Total phenolic content was obtained 25.47 mg/g in leave and 17.24 mg/g in root and IC_{50} was 9.13 µg/mg in leave and 40.20 µg/mg in root. Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration were less in *coagulase-positive Staphylococcus aureus* when compared to *E.coli.*

Keywords: *Capparis spinosa*, Antioxidant, Antimicrobial, Ultrasound.

[*]Corresponding Author: sarhadi@iaubam.ac.ir