دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر
فصلنامه‌ی کاربرد شیمی در محیط زیست

سال ششم، شماره‌ی ۲۴
پاییز ۱۳۹۴، صفحات ۴۹-۴۱

بررسی اثر زمان، توان تابش امواج و نسبت آب به گیاه بر بازده و اثر آنتی اکسیدانی عصاره گیاه اکلیل کوهی (Rosmarinus officinalis L) تحت تابش ریزموج از استان کاشان

محبوبه طاهرخانی
استادیار دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تاکستان، تاکستان، ایران
mahtaherkhani@yahoo.com, mah.taherkhani@tiau.ac.ir

علی اکبر ایمانی
دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بوئین زهرا، بوئین زهرا، ایران

مهدی خلج
استادیار دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بوئین زهرا، بوئین زهرا، ایران

چکیده

در این پژوهش سعی شده است که با شناخت پارامترهای مؤثر بر استخراج عصاره از گیاه Rosmarinus officinalis جمع‌آوری‌شده از قمصر کاشان، تحت تابش ریزموج، بهترین شرایط برای استخراج عصاره ارزشمند این گیاه از طریق تکنیک نوین استخراج کمک شده با ریزموج و بدون استفاده از منابع حرارتی، به دست آید. حلال آب به‌عنوان مطلوب‌ترین حلال استخراج‌کننده تحت تابش مایکروویو و سه متغیر زمان تابش‌دهی و توان تشعشع و نسبت آب به گیاه به‌عنوان تأثیرگذارترین متغیرها در نظر گرفته شده‌اند. خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه R. officinalis به دو روش آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن در حضور لینولئیک اسید و سنجش ظرفیت به دام انداختن رادیکال ۲ و ۲- دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) انجام شد. نتایج نشان داد که مطلوب‌ترین حالت از جهت راندمان استخراج و خاصیت آنتی‌اکسیدانی برای سه متغیر مورد بررسی به ترتیب زمان تابش‌دهی برابر با ۵۵ دقیقه، توان تشعشع ۵۵۰ وات و نسبت حلال (آب) به گیاه برابر با ۳ میلی‌لیتر بر گرم می‌باشد.

کلید واژه‌ها: Rosmarinus officinalis، بهینه‌سازی راندمان استخراج، استخراج کمک شده با ریزموج، عصاره رزماری، آنتی‌اکسیدان.

مقدمه

گیاه اکلیل کوهی با نام علمی Rosmarinus officinalis L. از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) می‌باشد. تیره نعناعیان حدود ۱۸۷ جنس دارد که تقریبا ۳۰۰۰ گونه از آن در مناطق مدیترانه‌ای می‌رویند. این گیاه زینتی به‌عنوان دارو در صنایع داروسازی و به‌عنوان طعم‌دهنده و یا ادویه در غذا و نوشیدنی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. اکلیل کوهی دارای خواص ضد اسپاسم، ضد قارچ، ضد انگل، ضد نفخ، محرک رشد مو، تونیک، تقویت حافظه، صفرا آور، قاعده آور و تسکین دردهای رماتیسمی و عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴-۲-۱]. اجزای اصلی روغن اسانسی این گیاه آلفا-پینن، ۱ و ۸- سینئول، کامفور، لیمونن، ترپینئول و کامفن می‌باشند [۱]. در این گیاه ترکیبات آنتی‌اکسیدان زیادی همچون فلاونوئیدها مانند لوتئولین، اسیدهای فنولیک، رزماریک اسید، کافئیک اسید، لابیاتیک اسید، دی ترپن‌های فنولیک مانند کارنوزیک اسید و کارنوزول، تری ترپن‌ها، تانن‌ها، پلی فنول‌ها، ساپونین‌ها، پلی‌ساکاریدها و همچنین برخی از متابولیت‌های اولیه نظیر پروتئین‌ها و چربی‌ها نیز وجود دارند [۶-۳]. به‌طور مثال بیش‌ترین غلظت روغن اسانسی گیاه R. officinalis جمع‌آوری‌شده از بهشهر مربوط به ترکیبات آلفا پینن (۱۴/۲۸٪) و ۱ و ۸- سینئول (۱۳/۰۴٪) و همچنین بیش‌ترین غلظت روغن اسانسی گیاه R. officinalis جمع‌آوری‌شده از بلده مربوط به ترکیبات آلفا پینن (۱۲/۸۰٪) و ۱ و ۸- سینئول (۱۲/۰۸٪) و کامفور (۸/۲۰٪) بوده است [۷]. نتایج حاصل از یک تحقیق بر روی گیاه R. officinalis جمع‌آوری‌شده از تهران در مجموع وجود ۵۲ ترکیب را نشان داد که ۳۱ ترکیب بین فصول مختلف مشترک بوده‌اند. اجزای اصلی اسانس مذکور را آلفا- پینن، لیمونن، کاممفون، کامفور، ۱ و ۸- سینئول و بورنیل استات تشکیل می‌دادند. بیش‌ترین میزان بورنیل استات در فصل بهار (۵/۴۹٪) و بیش‌ترین میزان ۱ و ۸- سینئول در فصل تابستان مشاهده شد (۱۴/۱۵٪). بیش‌ترین میزان آلفا-پینن و لیمونن در ماه بهمن به‌ترتیب به میزان ۲۸/۲۸ و ۱۷/۲۹٪ مشاهده شد [۶]. روش‌های مختلفی برای استخراج عصاره گیاهان وجود دارد که از این میان، استفاده از امواج ریزموج نسبت به انواع دیگر روش‌های استخراج عصاره گیاهان از بازده بالاتری بر خورداراست [۸]. امواج ریزموج از جنس امواج الکترومغناطیس با طول‌موج بلند و انرژی کم هستند که در برخورد با مولکول قطبی، انرژی را به شکل تشعشعات حرارتی آزاد می‌کنند. طراحی آزمایش‌ها یکی از قوی‌ترین فنون بهبود کیفیت و افزایش بهره‌وری است. در این شیوه، از طریق انجام برخی آزمایش‌ها، آگاهانه، تغییراتی در فرآیند یا سیستم اعمال می‌شود تا تاثیر آن‌ها در ویژگی‌های عملکردی یا پاسخ فرآیند یا سیستم به آن‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد [۹]. روشی که ما در این تحقیق از آن بهره می‌بریم، روش یک متغیر در زمان (One Factor At a Time) است. در این روش می‌توان با تغییر سطوح هر عامل به اثر آن به‌صورت جداگانه بر خروجی پی برد [۵]. درنهایت تاثیر هر یک از این عوامل در میزان استخراج عصاره و تاثیر بر خواص آنتی‌اکسیدانی بررسی خواهد شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گونه گیاهی: بدین منظور در تیر ماه سال ۱۳۹۲، اندام‌های هوایی گیاه رزماری، شامل برگ، ساقه و سرشاخه‌های گل‌دار، کشت‌شده در منطقه قمصر کاشان، جمع‌آوری شد. پس از انجام آزمون‌های اولیه، حلال آب به‌عنوان مطلوب‌ترین حلال استخراج‌کننده تحت تابش مایکروویو و سه متغیر زمان تابش‌دهی و توان تشعشع و نسبت آب به گیاه به‌عنوان تأثیرگذارترین متغیرها در نظر گرفته شدند. بازده استخراج به‌عنوان پاسخ کمی و خواص

ضداکسیدانی (تعیین فعالیت مهار رادیکال DPPH و مهار پراکسیداسیون لیپید) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که از نظر راندمان استخراج برای سه متغیر مورد بررسی به ترتیب زمان تابش‌دهی ۵۵ دقیقه، توان تشعشع ۵۵۰ وات و نسبت حلال (آب) به گیاه برابر با ۳، بهترین مقادیر می‌باشد. در مورد آزمون‌های بیولوژیکی نیز به نظر می‌رسد که تغییر فاکتورهای مؤثر در عصاره‌گیری منجر به ایجاد تغییرات محسوس در میزان درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نخواهد داشت و در مورد فعالیت مهار پراکسیداسیون لیپید، تنها عامل مؤثر در عصاره‌گیری فاکتور نسبت آب به گیاه است.

- بهینه‌سازی بازده استخراج عصاره به روش OFAT

در جدول شماره ۱، اجراهای انجام‌شده تحت تاثیر سه فاکتور زمان تابش‌دهی، توان تشعشع و نسبت آب به گیاه به‌صورت سه دسته آورده شده است.

جدول ۱- شرایط آزمایشگاهی ۹ اجرای انجام شده به کمک روش OFAT تحت تابش ریزموج و یک اجرا تحت شرایط گرمایی

شماره آزمایش	زمان تابش-دهی (min)	توان تشعشع (W)	نسبت آب به گیاه (mL/g)
۱-الف	۲۵	۸۵۰	۱/۵
۲-الف	۵۵	۸۵۰	۱/۵
۳-الف	۸۵	۸۵۰	۱/۵
۱-ب	۵۵	۵۵۰	۱/۵
۲-ب	۵۵	۸۵۰	۱/۵
۳-ب	۵۵	۱۱۵۰	۱/۵
۱-ج	۵۵	۸۵۰	۰
۲-ج	۵۵	۸۵۰	۱/۵
۳-ج	۵۵	۸۵۰	۳
روش حرارتی	۳۳۰	-	۳۰۰

در هر دسته با توجه به ثابت نگه‌داشتن دو فاکتور در سطح متوسط و تنها تغییر یک فاکتور، تاثیر هر یک از فاکتورها به‌طور جداگانه بر بازده استخراج عصاره مشخص خواهد شد. سپس با رسم سه نمودار، بهترین شرایط برای استخراج عصاره آبی رزماری تعیین می‌گردد.

- آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن در حضور لینولئیک اسید

این آزمون نمونه‌ای از سنجش به روش انتقال اتم هیدروژن است و در آن با توجه به درصد مهار پراکسید شدن بتاکاروتن با لینولئیک اسید و اکسیژن، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه اندازه‌گیری می‌شود. میزان کاهش رنگ بتاکاروتن با سنجش میزان جذب نور آن در ۴۷۰ نانومتر معین می‌شود.

محلول‌های ساخته شده مورد نیاز آزمایش به‌صورت زیر تهیه گردید:

۱) مقدار ۲۵۰ میلی‌لیتر از آب مقطر به درون ارلن ریخته و جریان مداومی از گاز اکسیژن به مدت یک ساعت به درون آن وارد شده تا از اکسیژن اشباع شود.

۲) مقدار ۲۸/۱۹ گرم لینولئیک اسید در بالن ژوژه ۵ میلی‌لیتری ریخته و با کلروفرم به حجم رسانده می‌شود.

۳) ۵ میلی‌گرم بتاکاروتن در یک بالن ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری تیره ریخته شده و با کلروفرم به حجم رسانده می‌شود.

۴) سپس مقدار ۱۵۰ میلی‌گرم توئین ۴۰ در یک بالن ۲۵۰ میلی‌لیتری و ۱۰۰ میلی‌گرم توئین ۴۰ در بالن ۲۵۰ میلی‌لیتری دیگری اضافه گردید.

۵) مقدار ۲۰ میلی‌گرم از هر یک از عصاره‌ها در بالن ۱۰ میلی‌لیتری با دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) حل شد.

۶) مقدار ۲۰ میلی‌گرم شاهد مثبت (BHT) در ۱۰ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) حل شد.

تهیه محلول نهایی:

۷) به بالن اول ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی توئین به میزان ۳ میلی‌لیتر و به بالن دوم ۲ میلی‌لیتر از محلول شماره ۲ اضافه می‌شود.

۸) به بالن اول حاوی توئین مقدار ۳/۲ میلی‌لیتر از محلول شماره ۳ اضافه می‌شود.

۹) با استفاده از تبخیرکننده دوار حلال کلروفرم موجود در هر دو بالن تبخیر شده و به بالن اول ۷۵ میلی‌لیتر و به بالن دوم ۵۰ میلی‌لیتر از محلول شماره ۱ اضافه و خوب حل می‌گردد.

۱۰) برای هر یک از عصاره‌ها و شاهد مثبت یا شاهد منفی سه لوله آزمایش هر کدام حاوی ۳۵۰ میکرولیتر از محلول‌های مذکور در قسمت‌های ۵ و ۶ و شاهد منفی تهیه می‌شود. همچنین یک لوله آزمایش حاوی ۷۰۰ میکرولیتر از محلول‌های نامبرده و شاهد منفی تهیه می‌گردد. به میزان ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول بالن ۱ به سری سه‌تایی و مقدار ۵ میلی‌لیتر از محلول بالن ۲ به سری یک‌تایی اضافه می‌گردد.

۱۱) دستگاه طیف‌سنج ماوراءبنفش در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از شاهد منفی صفر شده و جذب سری سه‌تایی شاهد منفی سه بار در این طول‌موج خوانده می‌شود. جذب‌ها پس از میانگین‌گیری جداگانه در این طول‌موج، معادل طول‌موج ماکزیمم در طول‌موج نامبرده است.

۱۲) تمامی نمونه‌ها و شاهد مثبت و منفی به مدت دو ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. پس از این مدت مجددا دستگاه اسپکتروفوتومتر با محلول‌های موجود در سری یک‌تایی مربوط به نمونه‌ها، شاهد مثبت و شاهد منفی در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر صفر می‌گردد و جذب سری سه‌تایی نمونه‌ها و شاهد مثبت و منفی در این طول‌موج خوانده، درصد جذب در مقایسه با جذب ماکزیمم محاسبه می‌شود.

- سنجش ظرفیت به دام انداختن رادیکال DPPH

ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی گیاه رزماری با روش DPPH انجام شد. در این روش توانایی عصاره‌های گیاهی (به‌عنوان آنتی‌اکسیدان) در دادن الکترون به رادیکال ۲ و ۲- دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) با تغییر رنگ محلول متانولی DPPH (از بنفش به زرد) مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. رادیکال DPPH در ۵۱۷ نانومتر جذب دارد و در غلظت‌های کم از قانون بیر لامبرت پیروی می‌کند و کاهش جذب آن رابطه خطی با مقدار ماده آنتی‌اکسیدان دارد. به ازای افزایش هر چه بیش‌تر ماده آنتی‌اکسیدان، DPPH مصرف می‌شود. همچنین از بوتیلِتِد هیدروکسی تولوئن (BHT) به‌عنوان شاهد استاندارد استفاده گردید. آزمایش‌های مربوط به عصاره و نمونه استاندارد BHT برای به حداقل رساندن خطاهای آزمایش و اطمینان یافتن از صحت نتایج، سه بار تکرار و پس از میانگین‌گیری از داده‌ها انحراف استاندارد مربوط به هر یک از آزمایش‌ها گزارش شد.

برای انجام این آزمایش محلول‌های زیر تهیه شدند:

۱) میزان ۴/۷ میلی‌گرم از DPPH (خلوص ۱۰۰درصد) با ترازوی آنالیتیک توزین و در بالن ژوژه‌ی ۵۰ میلی‌لیتری تیره‌رنگ (به‌منظور محافظت از نور) ریخته و با متانول مرک به حجم رسانده می‌شود. محلول حاصل بنفش رنگ است. از آنجا که محلول حاصل به مرور زمان احیا می‌گردد (به رنگ زرد تبدیل می‌شود) بهتر است در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. به دلیل از بین رفتن ماهیت این ماده به مرور زمان و قرارگیری در معرض نور بهتر است هر چه زودتر مورد استفاده قرار گیرد.

۲) محلول شاهد: میزان ۱ میلی‌لیتر از متانول مرک به همراه ۱ میلی‌لیتر از محلول نمونه ساخته شده داخل بالن ژوژه‌ی ۱۰ میلی‌لیتری ریخته و به‌عنوان محلول شاهد جذب آن خوانده می‌شود.

۴) محلول‌های عصاره‌ها: میزان ۱۰ میلی‌گرم از هر یک از هفت نمونه عصاره مورد نظر داخل بالن ژوژه‌ی ۱۰ میلی‌لیتری روشن ریخته و با توجه به عدم انحلال‌پذیری عصاره آبی رزماری در متانول ابتدا عصاره در سه قطره آب

حل شده سپس با متانول مرک به حجم رسانده می‌شود. شکل ۱ تصویری از نمونه‌های آماده شده را نشان می‌دهد.

شکل ۱: تصویر هفت محلول از عصاره

درون هر یک از بالن‌های تیره، ۱ میلی‌لیتر از نمونه عصاره و ۱ میلی‌لیتر از DPPH ریخته و در اثر هم زدن پیوسته به‌وسیله دستگاه تکان‌دهنده دوار، همگن می‌شود. جذب محلول‌های شاهد و نمونه بعد از ۳۰ دقیقه در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis خوانده می‌شود. در نهایت قدرت آنتی‌اکسیدان فرآورده‌های گیاهی به‌صورت مضربی از قدرت آنتی‌اکسیدانی استاندارد BHT گزارش می‌گردد. به‌منظور به حداقل رساندن خطای آزمایش و اطمینان از صحت آزمایش، جذب هر یک از عصاره‌ها سه بار خوانده شد و پس از میانگین‌گیری از داده‌ها IC_{50} مربوط به آزمایش گزارش گردید. میزان در صد مهار با معادله زیر محاسبه می‌شود:

$$I(\%) = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \times 100$$

در فرمول بالا A_{blank} میزان جذب شاهد (نمونه حاوی تمام معرف‌ها به غیر از عصاره) و A_{sample} میزان جذب نمونه در ۵۱۷ نانومتر است.

یافته‌ها و بحث

- بازده استخراج عصاره

بازده استخراج عصاره رزماری تحت شرایط مختلف زمان تابش‌دهی، توان تشعشع و نسبت آب به گیاه تحت تابش ریزموج مطابق جدول ۲ به‌دست آمد. کمیت‌های سه متغیر زمان تابش‌دهی، توان تشعشع و نسبت آب به گیاه، بر اساس روش طراحی آزمایش DOE به‌صورت تصادفی از میان مجموعه‌ای از داده‌ها انتخاب شده است.

جدول ۲- شرایط آزمایشگاهی و بازده استحصال عصاره برای ۹ اجرای انجام‌شده به کمک روش OFAT تحت تابش ریزموج و اجرا تحت شرایط گرمایی

شماره‌ی اجرا	زمان تابش‌دهی (دقیقه)	توان (وات)	نسبت آب به گیاه (mL/g)	بازده (٪)
۱- الف	۲۵	۸۵۰	۱/۵	۱/۶۹۰۸
۲- الف	۵۵	۸۵۰	۱/۵	۲/۹۶۳۲
۳- الف	۸۵	۸۵۰	۱/۵	۲/۴۳۵۸
۱- ب	۵۵	۵۵۰	۱/۵	۳/۰۷۹۳
۲- ب	۵۵	۸۵۰	۱/۵	۲/۹۶۳۲
۳- ب	۵۵	۱۱۵۰	۱/۵	۲/۸۲۷۹
۱- ج	۵۵	۸۵۰	۰	۱/۵۶۷۱
۲- ج	۵۵	۸۵۰	۱/۵	۲/۹۶۳۲
۳- ج	۵۵	۸۵۰	۳	۴/۲۱۸۵
روش حرارتی	۳۳۰	-	۳۰۰	۴/۲۴۹۴

با توجه به جدول ۲ می‌توان نتیجه گرفت عصاره استحصال شده از طریق روش حرارتی بیش‌ترین میزان بازده استخراج را به خود اختصاص داده است.

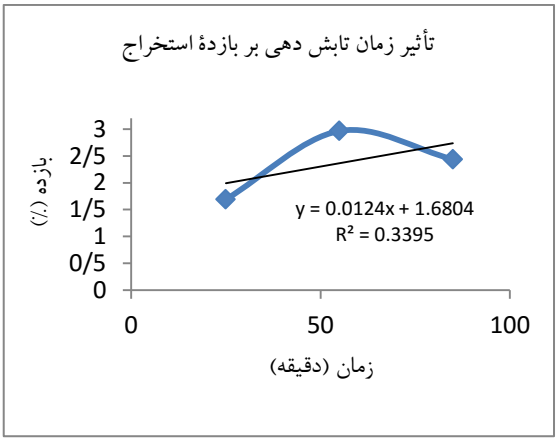
- تاثیر فاکتور زمان تابش‌دهی بر بازده استخراج عصاره

در این بخش به رسم نمودار و جدولی پرداخته می‌شود که به کمک آن‌ها می‌توان به تاثیر فاکتور زمان تابش امواج ریزموج بر بازده استخراج عصاره پی برد.

جدول ۳- جدول تاثیر فاکتور زمان تابش‌دهی بر بازده استخراج عصاره رزماری

شماره‌ی اجرا	زمان تابش-دهی	توان	نسبت آب به گیاه	بازده (٪)
۱- الف	۲۵ min	۸۵۰W	۱/۵ mL/g	۱/۶۹۰۸
۲- الف	۵۵ min	۸۵۰W	۱/۵ mL/g	۲/۹۶۳۲
۳- الف	۸۵ min	۸۵۰W	۱/۵ mL/g	۲/۴۳۵۸
روش حرارتی	۳۳۰ min	-	۱/۵ mL/g	۴/۲۴۹۴

مقایسه بازده استخراج عصاره در دسته الف که تنها در سطوح فاکتور زمان تابش‌دهی متفاوتند، نشان می‌دهد که برای داشتن بیشترین بازده استخراج بهتر است حد میانه‌ای برای فاکتور زمان انتخاب شود؛ در زمان ۲۵ دقیقه کم‌ترین بازده و در زمان ۵۵ دقیقه طبق نمودار بیش‌ترین بازده استخراج را در پی داشته است.



نمودار ۱: نمودار تاثیر فاکتور زمان تابش‌دهی بر بازده استخراج عصاره رزماری

همچنان که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، تغییر زمان تابش‌دهی تاثیر زیاد اما دوگانه‌ای بر راندمان استخراج دارد، به‌گونه‌ای که شیب نمودار در دو طرف نقطه وسط، متفاوت و زیاد است.

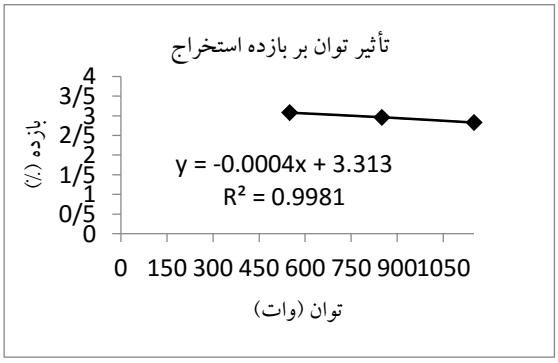
- تاثیر فاکتور توان تشعشع بر بازده استخراج عصاره

به کمک جدول ۴ و نمودار ۲، می‌توان به تاثیر فاکتور توان تشعشع و شدت تابش امواج ریزموج بر بازده استخراج عصاره پی برد.

جدول ۴- جدول تاثیر فاکتور توان تشعشع بر بازده استخراج عصاره رزماری

شماره‌ی اجرا	زمان تابش‌دهی	توان تشعشع	نسبت آب به گیاه	بازده (٪)
۱- ب	۵۵ min	۵۵۰w	۱/۵ mL/g	۳/۰۷۹۳
۲- ب	۵۵ min	۸۵۰w	۱/۵ mL/g	۲/۹۶۳۲
۳- ب	۵۵ min	۱۱۵۰w	۱/۵ mL/g	۲/۸۲۷۹
روش حرارتی	۳۳۰ min	-	۱/۵ mL/g	۴/۲۴۹۴

با مقایسه دسته ب در جدول ۴ که تنها در سطوح فاکتور توان و شدت تابش ریزموج‌ها متفاوتند، می‌توان نتیجه گرفت بازده استخراج عصاره رابطه‌ای عکس با تغییرات فاکتور مذکور دارد.



نمودار ۲: نمودار تاثیر فاکتور توان تشعشع بر بازده استخراج عصاره رزماری

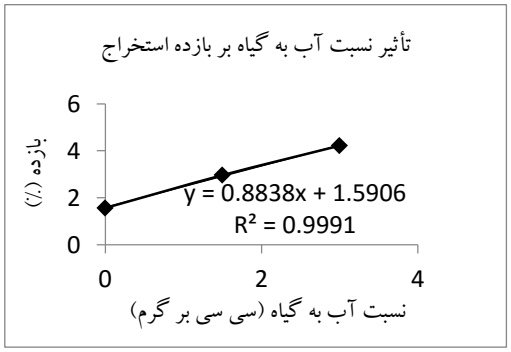
همچنان که در نمودار مشاهده می‌شود، شیب تغییرات راندمان با افزایش توان، منفی و بسیار کند است؛ بنابراین توان تابش امواج در محدوده‌های مورد بررسی، فاکتور چندان تأثیرگذاری نمی‌باشد.

- تاثیر فاکتور نسبت آب به گیاه بر بازده استخراج عصاره

در این بخش نیز به کمک جدول ۵ و نمودار ۳ می‌توان به تاثیر فاکتور نسبت آب به گیاه بر بازده استخراج عصاره پی برد. طبق جدول ۵ و از آنجا که کم‌ترین و بیش‌ترین بازده استخراج عصاره به‌ترتیب مربوط به سطح پایین (تنها ۱۷۵ میلی‌لیتر آب که از آن با عنوان رطوبت پایه ذکر شد) و بالای (۳۲۵ میلی‌لیتر آب) فاکتور نسبت آب به گیاه می‌شود، می‌توان نتیجه گرفت این فاکتور دارای بیش‌ترین تاثیر بر میزان بازده استخراج عصاره بوده است، به طوری که هرچه نسبت آب به گیاه افزایش یابد بازده استخراج عصاره نیز افزایش خواهد یافت.

جدول ۵- جدول تاثیر فاکتور نسبت آب به گیاه بر بازده استخراج عصاره رزماری

شماره‌ی اجرا	زمان تابش‌دهی	توان	نسبت آب به گیاه	بازده
۱- ج	۵۵ min	۸۵۰w	۰/۰ mL/g	۱/۵۶۷۱
۲- ج	۵۵ min	۸۵۰w	۱/۵ mL/g	۲/۹۶۳۲
۳- ج	۵۵ min	۸۵۰w	۳/۰ mL/g	۴/۲۱۸۵
روش حرارتی	۳۳۰min	-	۳۰۰ mL/g	۴/۲۴۹۴



نمودار۳: نمودار تاثیر فاکتور نسبت آب به گیاه بر بازده استخراج عصاره رزماری

همچنان‌که در نمودار مشخص است، شیب تغییرات راندمان استخراج نسبت به تغییر میزان آب، مثبت و نسبتا تند می‌باشد.

آزمون DPPH

میزان درصد مهار رادیکال آزاد DPPH برای هر یک از عصاره‌های مورد آزمون در جدول ۶ آورده شده است.

جدول ۶- درصد مهار مربوط به عصاره‌های گیاه رزماری

نمونه	میانگین درصد مهار	انحراف معیار
۳- الف	٪۷۷/۷۰	۰/۰۲
۳- الف	٪۸۴/۸۶	۰/۱۰۹
۱- الف	٪۷۸/۰۹	۰/۰۰۷۷
۱- الف	٪۸۹/۴۸	۰/۰۰۵۴
۳- ب	٪۷۷/۴۵	۰/۵۰
۳- ب	٪۸۸/۵۸	۱/۲۳
۱- ب	٪۷۷/۰۳	۰/۰۱۴
۱- ب	٪۸۷/۱۱	۰/۲۰۴
۳- ج	٪۷۷/۶۲	۰/۲۰۴
۳- ج	٪۸۷/۳۹	۰/۰۲۰
۱- ج	٪۷۷/۶۴	۰/۰۱
۱- ج	٪۸۳/۳۰	۰/۰۵۷
۲- الف ب ج	٪۷۷/۳۲	۰/۰۱۴
۲- الف ب ج	٪۸۳/۱۵	۰/۰۶

همان‌گونه که در جدول ۶ ملاحظه می‌شود، میزان انحراف معیار برای سه بار تکرار نشان‌دهنده دقت قابل قبول در انجام آزمایش می‌باشد. بر اساس جدول فوق می‌توان نتیجه گرفت که تغییر فاکتورهای مؤثر در بازده استخراج عصاره منجر به تغییرات محسوس در میزان درصد مهار عصاره مورد نظر نمی‌شود.

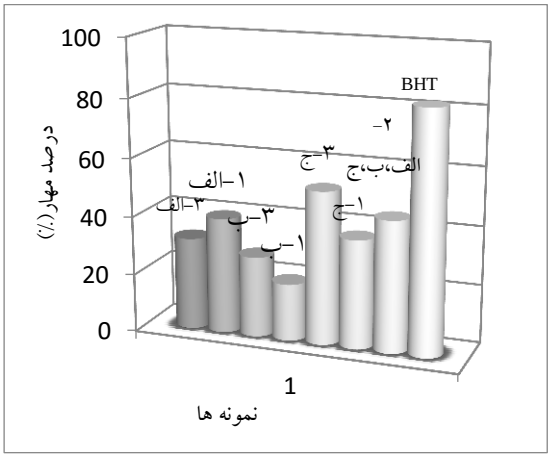
- آزمون بی‌رنگ شدن β-کاروتن در حضور لینولئیک اسید

آزمون ارزیابی فعالیت مهار پراکسیداسیون لیپید از طریق اندازه‌گیری میزان بی‌رنگ شدن بتاکاروتن انجام شد که نتایج حاصل از آن در جدول زیر آمده است.

جدول ۷- درصد مهار نمونه‌های عصاره درآزمون بی‌رنگ شدن β-کاروتن در گیاه رزماری

نمونه	درصد مهار (٪)
۳- الف	۳۱/۶۰
۱- الف	۳۹/۶۰
۳- ب	۲۷/۵۶
۱- ب	۱۹/۴۹
۳- ج	۵۲/۱۸
۱- ج	۳۷/۱۴
۲- الف، ب، ج	۴۴/۸۰
شاهد مثبت BHT	۸۱/۹۴
شاهد منفی DMSO	۰۰/۰۰

نمودار ۴ نیز درصد مهار نمونه‌های عصاره را در آزمون مذکور به‌طور مقایسه‌ای نشان می‌دهد. همان‌گونه که در نمودار ۴ ملاحظه می‌شود درصد مهار عصاره‌های گیاهی در آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن در حضور لینولئیک اسید بیش‌ترین میزان آن مربوط به نمونه‌ی ۳- ج است که از بالاترین سطح فاکتور نسبت آب به گیاه یعنی ۳ برخوردار بود. همچنین مقایسه نمونه‌های ۱، ۲ و ۳- ج نشان می‌دهد که هرچه نسبت آب به گیاه بیش‌تر شود درصد مهار عصاره افزایش می‌یابد. درصد مهار نمونه‌های ۳- ب و ۱-ب نسبتا کم و تقریبا نزدیک به هم است و این بیانگر تاثیر کم فاکتور توان و شدت تابش امواج بر درصد مهار نمونه‌های عصاره در آزمون بی‌رنگ شدن β-کاروتن است. مقادیر متفاوتی را نشان می‌دهد.



نمودار ۴: نمایش درصد مهار عصاره‌های گیاه رزماری در آزمون بی‌رنگ شدن β-کاروتن

در روش حرارتی بازده استخراج عصاره رزماری به بیش‌ترین میزان خواهد رسید. همچنین برای داشتن بیش‌ترین بازده استخراج بهتر است حد میانه‌ای برای فاکتور زمان تابش‌دهی انتخاب شود؛ از آنجا که در زمان کوتاهی مانند ۲۵ دقیقه فرصت کافی برای استخراج ترکیبات عصاره نمی‌باشد و در زمان ۸۵ دقیقه به‌علت طولانی شدن زمان تابش‌دهی، برخی ترکیبات نیمه‌فرار عصاره تبخیر شده‌اند، زمان میانی ۵۵ دقیقه بیش‌ترین بازده استخراج را به خود اختصاص داده است. زمان تابش‌دهی تاثیر زیاد اما دوگانه‌ای بر بازده استخراج عصاره رزماری دارد، به‌طوری‌که در جهت افزایش و یا کاهش زمان مطلوب، در جهت کاهش بازده پیش می‌رود. از طرف دیگر، بازده استخراج عصاره مذکور رابطه‌ای عکس با افزایش توان و شدت تابش ریزموج‌ها دارد. نسبت حلال (آب) به گیاه دارای بیش‌ترین تاثیر بر میزان بازده استخراج عصاره رزماری است. همان‌گونه که انتظار می‌رفت استفاده از

میزان آب بیش‌تر منجر به آغشته شدن تمام گیاه به آب و در نتیجه استحصال عصاره بیش‌تری می‌شود؛ بنابراین هرچه نسبت آب به گیاه افزایش یابد بازده استخراج عصاره نیز افزایش خواهد یافت. شیب تغییرات راندمان استخراج نسبت به تغییر میزان آب، مثبت و نسبتا تند می‌باشد. به‌طور کلی به‌نظر می‌رسد که این پارامتر، تأثیرگذارترین متغیر در راندمان استخراج است. نتایج به دست آمده از خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه رزماری به روش مهار پراکسیداسیون لیپید عصاره در آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن در حضور لینولئیک اسید نشان داد که بیش‌ترین میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به بالاترین سطح فاکتور نسبت آب به گیاه است. به‌طوری‌که هرچه نسبت آب به گیاه بیش‌تر شود درصد خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره افزایش می‌یابد. بررسی نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که فاکتور توان و شدت تابش امواج بر درصد مهار پراکسیداسیونِ لیپید عصاره در آزمون بی‌رنگ شدن β-کاروتن تاثیر کمی دارد. پیش از این تحقیقی در این زمینه بر روی افزایش بازده عصاره رزماری صورت نگرفته است.

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه می‌توان گفت که نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که می‌توان با کنترل متغیرهای زمان تابش‌دهی، توان دستگاه ریزموج و نسبت آب به گیاه، بازده استخراج عصاره گیاه رزماری را افزایش داد. از نظر راندمان استخراج، زمان تابش‌دهی ۵۵ دقیقه، بهترین شرایط را در استخراج عصاره رزماری ایجاد می‌کند. توان، تاثیر چندانی در میزان استخراج عصاره نداشت و بر مبنای نسبت آب به گیاه، با افزایش این نسبت، میزان استخراج عصاره افزایش یافت به‌گونه‌ای که این متغیر بیش‌ترین تاثیر را در استحصال عصاره و افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی آن خواهد داشت.

منابع

[1] Al-Sereiti. M. R, Abu-Amer. K. M, Sen. P, 1999. Pharmacology of rosemary (Rosmarinus officinalis Linn.) and its therapeutic potentials. Indian J. Exp. Biol., 37: 124-130.

[2] Celiktas. O.Y, Kocabas. E.E.H, Bedir. E, Sukan. F.V, Ozek. T, Baser. K.H.C, 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. Food Chem., 100: 553-559.

[3] Chiej. R, 1988. The Macdonald Encyclopedia of medicinal Plants. London: Macdonald & Co. (Publishers) Ltd. 264.

[4] Inouye. S, Takizawa. T, Yamaguchi. H, 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. J. Antimicrob. Chemother, 47: 565-573.

[5] Irfan. M, Nadeem. M, Syed, Q., 2014. One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IR05 in solid-state fermentation. J. Rad. Res. Appl. Sci., 7 (3): 317-326.

[6] Kiarostami. K.H, Bahrami. M, Talebpour. Z, Nazem bokaii, Z., Khanavi, M., Haji Akhondi, A., 2009. Study of seasonal variation in essential oil of Rosmarinus officinalis L. J. Med. Plants., 8(32): 84-90.

[7] Mohammad. N, Ganji. S.M, Moradi. H, Ghanbari. A, Akbarzadeh. M, 2014, The effect of altitude on the quantity and quality of essential oil of Rosmarinus officinalis L. plant cultivated in two regions of Mazandaran, Eco-phytochemical J. Med. Plants., 5(1): 36-42.

[8] Momeni.T, Shahrokhi. N, 1991. Essential oils and their their therapeutic actions. Tehran, Iran: Tehran University. Press; (in Persian)

[9] Omid Beigi. R, 2005. Production and processing herbal plants. Astane Ghodese Razavi Publication. Forth edition, vol 1.