

Effect of Solvent Composition and Auxiliary Treatments on the Extraction of *Dracocephalum kotschy* Boiss Extract Using Deep Eutectic Solvents

S. Kiani¹, H. Abbasi¹ ^{2*}

1- Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

(* - Corresponding Author Email: H.abbasi@Khuisf.ac.ir)

Received: 21.01.2025
Revised: 26.04.2025
Accepted: 10.05.2025
Available Online: 18.08.2025

How to cite this article:

Kiani, S., & Abbasi, H. (2025). Effect of solvent composition and auxiliary treatments on the extraction of *Dracocephalum kotschy* Boiss extract using deep eutectic solvents. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 21(4), 393-407. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2025.91737.1403>

Introduction

Recovery of active ingredients from plants is generally carried out using solid-liquid extraction. Selecting an appropriate solvent is one of the parameters that strongly affects the extraction performance and the type of extracted compounds. So far, various solvents have been used to extract these compounds. In addition to the need for large amounts of solvent, the high consumption of organic solvents causes problems such as environmental pollution and possible destruction of active compounds. Green solvents have been considered for the extraction process to reduce the consumption of non-toxic solvents and protect the environment. Natural deep eutectic solvents (NADES) are a new class of solvents used in extraction that consist of a mixture of two or more biodegradable natural compounds with low or no toxicity. The important features of these solvents are their low toxicity, biocompatibility, simple preparation, and low cost. Given the significant advantages of these solvents, in recent years, the use of NADES in the extraction of phenolic and antioxidant compounds has been considered. Applying appropriate auxiliary treatments to the sample or the sample-solvent combination during the extraction process can improve the performance of the extraction process. The use of ultrasonic waves allows for better extraction by creating shear force, disrupting the integrity of the cell wall, and better penetration of the solvent into the tissue. Pulsed electric waves also create pores in the cell membrane without causing minimal damage to the other parts, while maintaining consistency and structure, accelerating the permeability and transport of water and dissolved substances from the cell membrane, and allowing the extraction of active substances under better conditions.

Materials and Methods

This study was conducted in 3 phases to extract the compounds of the golden plant using natural deep eutectic solvents. In the first phase, effect of the type of solvent used including carboxylic acids (citric acid and malic acid), sugars (glucose and fructose), and sugar alcohols (ethylene glycol and glycerol) on the quality of the extracted material was evaluated. In the second phase, to improve the possibility of extracting the active ingredient of this plant, the sample was treated with pulsed electric waves, and in the third phase, the extraction of phenolic compounds from the sample was carried out with the solvent type selected from the first phase under the conditions of applying and non applying ultrasonic waves. Identification of the compounds present in the extract was carried out on the selected samples using HPLC. Finally, the ability to recover the extracted compounds was carried out from the best sample. Statistical analysis of the results was carried out using a completely randomized design - factorial test with SAS VERSION 9 software.

Results and Discussion

The extract from the eutectic solvent containing ethylene glycol due to its high antioxidant activity and the extract from the eutectic solvent containing maleic acid due to its high phenolic compounds were selected as the best solvents for making the *Dracocephalum kotschy* extract. Considering the total number of identified



©2025 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2025.91737.1403>

compounds, the content of identified compounds in the extract with a eutectic solvent containing ethylene glycol was 17000.05 $\mu\text{g/g}$, and in the extract with a eutectic solvent containing maleic acid was 10029.1 $\mu\text{g/g}$. Therefore, the content of active compounds of an extract with a eutectic solvent containing ethylene glycol was about 70% higher than the content of active compounds of an extract with a eutectic solvent containing maleic acid, and this solvent was selected for further studies. The study of the effect of applying electric pulses and ultrasonic waves on the extraction process shows that by increasing the intensity of the electric pulse and the duration of using ultrasonic waves, the content of phenolic compounds and antioxidant properties of the extract increased. Electric pulses accelerate the permeability and transport of water and dissolved substances by creating pores in the cell membrane. The change in the properties of the cell wall membrane in such a way that the substances inside the cell can be quickly and easily removed from the cell, causes the extraction to be carried out in the minimum time and energy required. The total weight of phenolic compounds identified in the extract with a eutectic solvent containing ethylene glycol with the application of auxiliary was 25275.41 $\mu\text{g/g}$, without the application of auxiliary treatments was 17000.05 $\mu\text{g/g}$, and in the sample extracted with ethanol was 21652.89 $\mu\text{g/g}$. Therefore, the application of auxiliary treatments was effective and superior to the ethanol solvent in increasing the extraction of compounds from the plant. The polyphenol content extracted with ethylene glycol-choline chloride with and without auxiliary treatments was determined as 53 and 45 percent, respectively.

Conclusion

The solvent containing choline chloride-ethylene glycol had the best conditions for extracting the active compounds of *Dracocephalum kotschyi*. Applying a 5000 W electric pulse pretreatment and using ultrasonic waves for 30 minutes in the extraction stage had a significant effect in increasing the extractability of the active compounds. Using the anti-solvent (water) precipitation method, 53% of the phenolic compounds were recovered and the eutectic solvent was returned to the system.

Keywords: Antioxidant activity, *Dracocephalum kotschyi*, Natural deep eutectic solvent, Phenolic compounds, Pulse electric field, Ultrasonic waves

مقاله پژوهشی

جلد ۲۱، شماره ۴، مهر - آبان ۱۴۰۴، ص. ۳۹۳-۴۰۷

ارزیابی تأثیر ترکیب حلال و کاربرد تیمارهای کمکی در استخراج عصاره زرین گیاه (*Dracocephalum kotschy Boiss*) به کمک حلال‌های یوتکتیک عمیق

سحر کیانی^۱ - هاجر عباسی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۰

چکیده

در این مطالعه، استخراج ترکیبات مؤثره زرین گیاه با استفاده از حلال‌های یوتکتیک در سه مرحله انجام شد. در مرحله اول، تأثیر ترکیبات مختلف حلال شامل کربوکسیلیک‌اسیدها (سیتریک‌اسید و مالیک‌اسید)، قندها (گلوکز و فروکتوز) و قندالکل‌ها (اتیلن‌گلیکول و گلیسرول) بر کیفیت عصاره استخراج‌شده ارزیابی شد. نسبت ترکیبات گیرنده پیوند هیدروژنی به اهداکننده پیوند هیدروژنی (کولین کلراید) ۱:۱ (مولار) در نظر گرفته شد. در مرحله دوم، به منظور بهبود استخراج عصاره، نمونه تحت تیمار با امواج الکتریکی پالسی در دو شدت میدان ۲۰۰۰ ولت و ۵۰۰۰ ولت قرار گرفت و در مرحله سوم استخراج ترکیبات با حلال منتخب از مرحله اول در شرایط اعمال و عدم اعمال امواج فراصوت در صفر، ۱۵ و ۳۰ دقیقه تحت اعمال امواج فراصوت با توان ۲۰۰ وات صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که عصاره مستخرج با حلال حاوی اتیلن‌گلیکول به دلیل بالا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی و عصاره مستخرج با حلال حاوی مالیک‌اسید به دلیل بالا بودن ترکیبات فنولیک به عنوان بهترین حلال‌ها انتخاب شدند. محتوای ترکیبات مؤثره عصاره مستخرج با حلال اول ۶۹/۵٪ بیشتر از حلال دوم ارزیابی شد و در این مرحله حلال یوتکتیک حاوی کولین کلراید-اتیلن‌گلیکول برای استخراج عصاره زرین گیاه انتخاب شد. با افزایش ولتاژ امواج الکتریکی پالسی بر نمونه و مدت زمان اعمال امواج فراصوت در مرحله استخراج، محتوای ترکیبات فنولیک استخراج شده آن افزایش یافت. مجموع وزنی ترکیبات شناسایی شده در عصاره مستخرج با حلال یوتکتیک حاوی اتیلن‌گلیکول با اعمال تیمارهای کمکی ۲۵۲۷۵/۴۱ و بدون اعمال تیمارهای کمکی ۱۷۰۰۰/۰۵ میکروگرم بر گرم ارزیابی شد. اعمال پیش تیمار امواج الکتریکی پالسی ۵۰۰۰ ولت و استفاده از امواج فراصوت به مدت ۳۰ دقیقه در مرحله استخراج، تأثیر معنی‌داری در افزایش قابلیت استخراج ترکیبات مؤثره زرین گیاه نشان دادند. با استفاده از روش رسوب ضد حلال، ۵۳٪ کل ترکیبات فنولیک استخراج شده با ارزیابی و حلال یوتکتیک به سیستم بازگردانده شد.

واژه‌های کلیدی: امواج الکتریکی پالسی، ترکیبات فنولیک، حلال یوتکتیک عمیق، زرین گیاه، فراصوت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مقدمه

ایران است که معمولاً در ارتفاعات می‌روید (Mozaffarian, 2008). مواد مؤثره اصلی این گیاه شامل لیمونن^۲، جرانال^۳، متیل گرانات^۴، آپیزنین^۵، لوتولین^۶، پندولیتول^۷، نرال^۸ و رزماریک اسید^۹، زانتومیکرول^{۱۰}.

زرین گیاه با نام علمی *Dracocephalum kotschy Boiss* متعلق به خانواده Lamiaceae یکی از گیاهان دارویی با ارزش بومی

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
(*)- نویسنده مسئول: Email: H.abbasi@Khuisf.ac.ir

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2025.91737.1403>

2- Limonene
3- Geranial
4- Methyl geranat
5- Apigenin
6- Luteolin
7- Penduletin
8- Neral
9- Rosmarinic acid
10- Xanthomicrol

سیرسیماریتین^۱ و میرتنول^۲ می‌باشد (Foroozandeh & Asadi-Gharneh, 2021) و در طب سنتی از آن به‌عنوان ضد سرطان، ضد تومور، ضد التهاب، ضد اسپاسم، کاهنده تب، درد مفاصل، رماتیسم و التیام دهنده زخم استفاده می‌شود (Mozaffarian, 2008). ترکیبات این گیاه دارای خواص مهارکننده گی و کشندگی قارچ‌ها، باکتری‌ها و یروس‌ها هستند (Foroozandeh & Asadi-Gharneh, 2021).

بازیابی مواد مؤثره گیاهان عموماً با استفاده از فرآیند استخراج جامد- مایع انجام می‌شود. انتخاب حلال مناسب از پارامترهای است که به شدت بر عملکرد استخراج و نوع ترکیبات عصاره مستخرج تأثیرگذار است. تاکنون حلال‌های مختلفی مانند اتانول، استون، متانول، هگزان و آب به‌طور جداگانه یا مخلوط با یکدیگر برای استخراج این ترکیبات مورد استفاده قرار گرفته‌اند. علاوه بر نیازمندی به مقادیر زیاد حلال، مصرف بالای حلال‌های آلی مشکلاتی مانند آلودگی محیط‌زیست و تخریب احتمالی ترکیبات مؤثره را موجب می‌شود (Azmir et al., 2013).

با هدف کاهش مقدار مصرف حلال‌های غیرسمی و حفاظت از محیط‌زیست، به‌کارگیری حلال‌های سبز در فرآیند استخراج، مورد توجه قرار گرفته است. حلال‌های یوتکتیک عمیق طبیعی^۳ (NADES) دسته‌ی جدیدی از حلال‌های مورد استفاده در استخراج ترکیبات مؤثره گیاهان هستند که از مخلوط دو یا چند ترکیب طبیعی زیست‌تخریب‌پذیر با سمیت کم یا بدون سمیت تشکیل شده‌اند. این حلال‌ها عموماً شامل دو دسته ترکیبات دهنده پیوند هیدروژنی^۴ (HBD) مانند کولین کلراید، بتائین و L- پرولین و گیرنده پیوند هیدروژنی^۵ (HBA) مانند قندها، قند الکل‌ها و کربوکسیلیک‌اسیدها می‌باشند، که با ویژگی‌های متفاوت متأثر از مواد تشکیل دهنده خود مورد استفاده قرار می‌گیرند (Zhang, De Oliveira-Vigier, Royer, & Jérôme, 2012). از ویژگی‌های مهم این حلال‌ها، سمیت کم، سازگاری زیستی، آماده‌سازی ساده و کم‌هزینه بودن آن‌ها می‌باشد (Dai, Spronsenb, Witkampb, Verpoortea, & Hae Choi, 2013). برهمکنش بین ملکول‌های تشکیل‌دهنده این حلال‌ها باعث محدود شدن تحرک و افزایش ویسکوزیته آنها می‌گردد. وجود مولکول‌های آب با تضعیف فعل و انفعالات میان اجزای تشکیل‌دهنده حلال، افزایش ۱۰ تا ۱۰۰ برابری رسانایی حلال را موجب می‌شود (Smith, Abbott, & Ryder, 2014; Florindo, Oliveira, Rebelo, Fernandes, & Marrucho, 2014). با توجه به مزایای قابل توجه این حلال‌ها، در سال‌های اخیر کاربرد NADES در استخراج ترکیبات فنولیک و

آنتی‌اکسیدانی مورد توجه قرار گرفته است (Aydin, Yilmaz, & Soyak, 2018). مطالعات نشان می‌دهد، ترکیبات فنولیک فقط تا ۹۰ روز در آب و اتانول پایدار می‌مانند، درحالی‌که NADES قابلیت تثبیت‌کنندگی بهتری برای آن‌ها دارند (Delos Angeles Fernandez, Espino, Gomez, & Silva, 2018). استخراج ترکیبات فنولیک از برگ توت با استفاده از سه گروه ترکیبات (بتائین، کولین کلراید، L- پرولین) و HBD (آمیدها، الکل‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک) نشان داد که حلال دارای کولین کلراید بالاترین راندمان استخراج ترکیبات فنولیک را دارا است. حلال‌های دارای بتائین و پس از آن حلال‌های حاوی پرولین و آب عملکرد به مراتب ضعیف‌تری در این خصوص نشان می‌دهند. به‌دلیل برهمکنش‌های هیدروژنی میان ملکول‌های تشکیل‌دهنده حلال و ترکیبات فنولیک، در میان ترکیبات هیدروژن گیرنده، حلال دارای سیتریک اسید راندمان استخراج بالاتری در مقایسه با سایرین نشان داد. (Zhou et al., 2018). دراستخراج ترکیبات فنولیک از نعنای نیز کولین کلراید به‌عنوان بهترین ترکیب هیدروژن دهنده، بالاترین راندمان استخراج را حاصل نمود. به‌کارگیری حلال‌های یوتکتیک متشکل از کولین کلراید و گلیسرول، بالاترین عملکرد در استخراج محتوای ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدها را دارا بودند. بیشترین قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره مستخرج، با استفاده از حلال دارای کولین کلراید - مالیک اسید حاصل آمد (Jurić et al., 2021). استفاده از DES های حاوی اگزولیتول-کولین کلراید و ۱- پروپانیدول -کولین کلراید نیز نشان داد که این حلال‌ها جایگزین مناسب و کارآمدی برای محلول متانولی جهت استخراج ترکیبات فعال زیستی روغن زیتون شامل اولاسین^۶ و اولیوکانتال^۷ می‌باشد (García, Rodríguez-Juan, Rodríguez-Gutiérrez, Julian Rios, & Fernández-Bolaños, 2018).

بررسی منابع در خصوص استخراج ترکیبات مؤثره گیاهان نشان می‌دهد که بعضاً اعمال تیمارهای کمکی بر نمونه یا ترکیب نمونه و حلال درحین فرآیند استخراج می‌تواند موجبات بهبود عملکرد فرآیند استخراج را فراهم آورد. استفاده از امواج فراصوت با ایجاد نیروی برشی، اختلال در انسجام دیواره‌ی سلول و نفوذ بهتر حلال به درون بافت، امکان استخراج بهتری را فراهم می‌کند. مطالعات انجام گرفته در این خصوص بر نمونه‌های مختلف ازجمله روغن زیتون، نشان از تأثیر مناسب امواج در شرایط مطلوب بر افزایش راندمان استخراج ترکیبات فنولیک دارد (García et al., 2018). امواج الکتریکی پالسی نیز با ایجاد منافذ در غشاء سلول و بدون اعمال کمترین آسیب به قسمت‌های

5- Hydrogen bond acceptor

6- Oleacein

7- Oleocanthol

1- Cirsimaritin

2- Myrtenol

3- Natural deep eutectic solvents

4- Hydrogen bond donor

مواد مورد نیاز

زرین گیاه با نام علمی *Dracocephalum kotschy* Boiss مرکز گیاهان دارویی اصفهان تهیه و در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد در سایه خشک گردید، سپس آسیاب و از الک دارای مش ۶۰ عبور داده شد. کولین کلراید، معرف فولین و ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) از شرکت سیگما^۱ (آمریکا)، گلیسرول، اتیلن گلیکول، سیتریک اسید، مالیک اسید، ساکارز، فروکتوز از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. دیگر مواد شیمیایی مورد نیاز از جمله اتانول از شرکت پارس الکل (ایران) و کربنات سدیم از شرکت ساکو (ایران) خریداری شدند.

آماده سازی NADES

مطابق جدول ۱، ۶ حلال با استفاده از ترکیبات مختلف تهیه گردید. نسبت ترکیبات گیرنده پیوند هیدروژنی به اهداکنندگان پیوند هیدروژنی ۱:۱ (مولار) در نظر گرفته شد. آب به عنوان رقیق کننده برابر وزن مجموع ترکیبات افزوده گردید. ساخت حلال های یوتکتیک در حمام فراصوت مدل PARSONIC 15s (شرکت مهندسی پارس نهند، ایران)، دارای توان ۲۰۰ W در ۷۰ درجه سانتی گراد تا تشکیل یک مایع شفاف انجام گرفت.

استخراج زرین گیاه با NADES و ارزیابی عصاره

مستخرج

جهت انجام استخراج، ۰/۲ گرم پودر زرین گیاه با ۴ میلی لیتر حلال ترکیب و در حمام آب دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفت. سپس ترکیب حلال و نمونه با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید (Zhou et al., 2018).

محتوای کل ترکیبات فنولیک عصاره مستخرج با روش رنگ سنجی و در مجاورت معرف فولین-سیوکالتیو^۲ ارزیابی شد (Santos, Pinto, Silvestre, & Pascoal Neto, 2010). برای این منظور، ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین-سیوکالتیو ۰/۱٪، ۲ میلی لیتر کربنات سدیم ۵٪ با ۰/۵ میلی لیتر عصاره استخراج شده مخلوط و پس از ۳۰ دقیقه، میزان جذب نمونه ها در ۷۶۰ نانومتر با استفاده از طیف سنج اندازه گیری شد. غلظت ترکیبات فنولیک موجود در عصاره ها بر مبنی میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک نمونه و با استفاده از منحنی استاندارد آن محاسبه شد.

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده از زرین گیاه با استفاده از روش رنگ سنجی و با به کارگیری معرف DPPH اندازه گیری شد

دیگر، با حفظ قوام و ساختمان، نفوذپذیری و انتقال آب و مواد محلول از غشا سلولی را سرعت می بخشد و امکان استخراج مواد مؤثره را در شرایط بهتری فراهم می کند (Aghaei Shalmani & Salehi, 2014). در استخراج قند از چغندر قند مشاهده شد که با اعمال امواج الکتریکی پالسی، کارایی استخراج تا ۸۲٪ و خلوص عصاره مستخرج تا ۹۵-۹۸٪ افزایش می یابد. لذا پس از اعمال امواج الکتریکی پالسی، محتوای قند بالاتر و رنگ بهتری در نمونه های تحت تیمار مشاهده گردید (Aghaei Shalmani & Salehi, 2014). بررسی اثر میدان الکتریکی پالسی همزمان با اعمال فشار در استخراج آب سیب نیز نشان داد که افزایش فشار، همزمان با اعمال امواج الکتریکی پالسی در تولید مقادیر بالاتر آبمیوه و افزایش کیفیت آن تأثیر معنی داری دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که با اعمال امواج الکتریکی پالسی، تولید آبمیوه از ۱/۷ به ۷/۷٪ افزایش می یابد. همچنین این روش سبب غیرفعال شدن میکروارگانیسم ها با حفظ محتوی ترکیبات فنولیک و بدون تغییر در خصوصیات ارگانولپتیک و تغذیه ای محصول می گردد (Aghaei Shalmani & Salehi, 2014). اعمال امواج الکتریکی پالسی با افزایش قابلیت نفوذ حلال در سلول های گیاهی و جانوری، موجبات سهولت استخراج مواد درون سلولی را فراهم می کند. لذا از این فرآیند می توان به عنوان یک پیش فرآوری در استخراج مواد با ارزش نظیر آنزیم ها، قندها و سایر ترکیبات استفاده نمود (Aghaei Shalmani & Salehi, 2014).

این مطالعه با هدف استخراج ترکیبات فنولیک زرین گیاه با استفاده از حلال های یوتکتیک عمیق طبیعی در ۳ بخش انجام گرفت. در قسمت اول با هدف انتخاب بهترین ترکیب حلال، بررسی استفاده از کربوکسیلیک اسیدها (سیتریک اسید و مالیک اسید)، قندها (گلوکز و فروکتوز) و قند الک ها (اتیلن گلیکول و گلیسرول) به عنوان ترکیبات هیدروژن گیرنده در کنار کولین کلراید به عنوان هیدروژن دهنده بر کیفیت عصاره مستخرج مورد ارزیابی قرار گرفت. در فاز دوم به منظور بهبود امکان استخراج ماده مؤثره این گیاه، نمونه تحت تیمار با امواج الکتریکی پالسی با ولتاژهای مختلف قرار گرفت و در مرحله سوم استخراج ترکیبات فنولیک نمونه با حلال منتخب از مرحله اول در شرایط اعمال و عدم اعمال امواج فراصوت در دو بازه زمانی صورت پذیرفت. اثر متغیرهای اعمال شده به صورت مستقل و متقابل ارزیابی و در نهایت قابلیت بازیابی ترکیبات استخراج شده از بهترین نمونه انجام گرفت.

مواد و روش ها

(Li, Du, Jin, & Du, 2012). برای این منظور ۰/۰۰۲ گرم DPPH

با ۴۰ میلی لیتر متانول برای تهیه محلول DPPH مخلوط گردید.

جدول ۱- ترکیبات مورد استفاده در تولید حلال‌های یوتکتیک جهت استخراج زرین گیاه

Table 1- Compounds of eutectic solvents for the extraction of *D. kotschy*

نمونه	اهداننده پیوند هیدروژنی	گیرنده پیوند هیدروژنی
Sample	Hydrogen bond donor	Hydrogen bond acceptor
1	Choline chloride (Chcl)	Glycerol (Gly)
2	Choline chloride (Chcl)	Ethylene glycol (Eg)
3	Choline chloride (Chcl)	Malic acid (Ma)
4	Choline chloride (Chcl)	Citric acid (Ca)
5	Choline chloride (Chcl)	Sucrose (Su)
6	Choline chloride (Chcl)	Fructose (Fr)

خنک‌کننده، سیستم کنترل و مانیتورینگ هستند (Aghaei Shalmani & Salehi, 2014). در اعمال پیش تیمار پالس، ۵ گرم زرین گیاه با ۵۰ میلی لیتر آب مخلوط و در ظرف مخصوص دستگاه (۴۰۰ سانتی متر مکعب) قرار گرفت. اعمال امواج الکتریکی پالسی توسط دو الکترود فولادی ضد زنگ (۵۰ سانتی متر مربع) به فاصله ۴ سانتی متر انجام گرفت. این فرآیند در دو شدت میدان ۲۰۰۰ و ۵۰۰۰ ولت، تعداد پالس ۱۲۰، فرکانس ۱ هرتز، دمای ۲۰ درجه سانتی گراد، عرض ۱۰ میکروثانیه انجام گردید. در نهایت نمونه‌ها توسط خشک کن انجمادی، خشک شدند (Aghaei Shalmani & Salehi, 2014).

۰/۱ میلی لیتر از عصاره‌ها با ۴ میلی لیتر محلول DPPH مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای محیط قرار داده شدند، سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد. میزان مهار رادیکال موجود با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید.

$$\% \text{ DPPH inhibition} = ((A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}) \times 100 \quad (1)$$

در رابطه بالا A control عدد جذب کنترل و A sample عدد جذب نمونه می باشد.

استخراج زرین گیاه با حلال منتخب تحت اعمال امواج

فراصوت

جهت بررسی تأثیر فراصوت بر کیفیت عصاره مستخرج از زرین گیاه با NADES منتخب، حلال یوتکتیک تهیه و استخراج نمونه در صفر، ۱۵ و ۳۰ دقیقه تحت اعمال امواج فراصوت انجام گرفت. در زمان صفر، استخراج بدون اعمال امواج فراصوت به مدت ۱ ساعت در حمام آب ۷۰ درجه سانتی گراد انجام شد. در زمان ۱۵ دقیقه، استخراج نمونه به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب و ۱۵ دقیقه در حمام فراصوت انجام شد و در زمان ۳۰ دقیقه، نمونه مورد نظر به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب و سپس ۳۰ دقیقه در حمام فراصوت انجام شد. دما در همه فرآیندهای ذکر شده ۷۰ درجه سانتی گراد تنظیم شد. محتوای فنل، میزان فعالیت آنتی اکسیدان و پروفایل ترکیبات نمونه منتخب ارزیابی گردید (Wu, Li, Chen, Wang, & Lin, 2020).

بازیابی ترکیبات فنولیک عصاره مستخرج منتخب

به منظور بازیابی ترکیبات فنولیک از حلال یوتکتیک، از روش رسوب ضدحلال با استفاده از آب استفاده شد. به این منظور، محلول DES همراه نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. آب به آرامی به نسبت ۱:۲۰ به مواد رویی افزوده و مخلوط شد و

ارزیابی کمی و کیفی ترکیبات استخراج شده

پروفایل ترکیبات عصاره استخراج شده با محلول یوتکتیک دارای بالاترین محتوای ترکیبات فنولیک و خصوصیات آنتی اکسیدانی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با راندمان بالا (HPLC) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای انجام HPLC، نمونه را با بیست برابر آب مقطر رقیق و سپس از فیلتر سلولزی با اندازه منافذ ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد. در این دستگاه، ستون مورد استفاده C-18 (۲×۱۵۰ میلی متر)، دمای ستون ۴۰ درجه سانتی گراد، حجم تزریق ۵ میکرولیتر و آشکارساز مورد استفاده فتودیودی بود. فاز مایع شامل محلول ۱٪ اسید فرمیک در متانول بود که با سرعت جریان ۰/۲۵ میلی لیتر در دقیقه وارد ستون گردید. طول موج شناسایی فلاوانون‌ها و فلاوان‌ها ۲۸۰ نانومتر، اسید هیدروکسی سینامیک ۳۲۰ نانومتر، و فلاونوئیدها ۳۵۰ نانومتر در نظر گرفته شد (Juric et al., 2021).

اعمال پیش تیمار امواج الکتریکی پالسی

اجزای سیستم شامل منبع انرژی و محفظه تیمار (دو الکترود و مواد عایق دی الکتریک) است. الکترودها از جنس فولاد ضد زنگ و عایق مورد استفاده پلی سولفونی است. دیگر اجزای سیستم شامل پمپ برای رساندن مواد خام به محفظه تیمار، مولد تولید پالس ولتاژ بالا،

SeguraCarretero, 2020). حلال‌های یوتکتیک حاوی مالیک اسید و سیتریک اسید نیز کارایی قابل توجهی در استخراج ترکیبات فنولیک از گیاه نعناع را نشان دادند (Jurić et al., 2021). در استخراج ترکیبات فنولیک از برگ گیاه نعناع نیز حلال یوتکتیک متشکل از کولین کلرید و گلیسرول بازده استخراج بالاتری نسبت به اتانول به عنوان حلال متعارف نشان داد.

خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده با استفاده از حلال‌های یوتکتیک در شکل ۲ نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری از این حیث میان عصاره‌های استخراج شده مشاهده می‌شود ($p \leq 0.05$). در این میان نمونه استخراج شده با حلال دارای اتیلن گلیکول خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتر و هم‌تراز با عصاره استخراج شده با اتانول ۵۰٪ دارد. با بررسی تأثیر ترکیبات HBD مورد استفاده در این پژوهش بر خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده از زرین گیاه، مشاهده می‌شود که در گروه قندها، عصاره مستخرج با حلال دارای فروکتوز در مقایسه با ساکارز، در گروه قند الکلی‌ها، عصاره مستخرج با حلال دارای اتیلن گلیکول در مقایسه با گلیسرول و در گروه کربوکسیلیک اسیدها، عصاره مستخرج با حلال دارای مالیک اسید در مقایسه با سیتریک اسید خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتری دارند.

تأثیر تغییر ترکیبات حلال بر ویژگی‌های کیفی و خواص آنتی اکسیدانی عصاره مستخرج از منابع مختلف در دیگر پژوهش‌ها نیز گزارش شده است. از جنبه امکان استخراج ترکیبات دارای فعالیت آنتی اکسیدانی، گزارش شده است که حلال یوتکتیک حاوی اتیلن گلیکول به دلیل برهمکنش‌های بین ملکولی مناسب با اتانول برابری می‌کند (Jeong et al., 2018). در نتایج بدست آمده از استخراج عصاره‌ی نعناع با حلال یوتکتیک نیز، بالاترین قابلیت مهارکنندگی DPPH در عصاره مستخرج با حلال دارای مالیک اسید و کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره‌های استخراج شده با دو حلال یوتکتیک حاوی فروکتوز و سیتریک اسید گزارش شد (2018). با استفاده از حلال‌های یوتکتیک حاوی ساکارز و لاکتیک اسید نیز، عصاره‌ای با فعالیت آنتی اکسیدان بالا از زردچوبه استخراج گردید (Doldolova et al., 2021). با توجه به نتایج حاصل از این بخش، عصاره مستخرج با استفاده از حلال یوتکتیک حاوی مالیک اسید حاوی بالاترین محتوای ترکیبات فنولیک و عصاره‌ی استخراج شده از حلال یوتکتیک حاوی اتیلن گلیکول بیشترین فعالیت آنتی اکسیدان را نشان دادند. از این رو، ارزیابی شناسایی ترکیبات این دو نمونه انجام شد.

نمونه در دمای صفر درجه به مدت ۸ ساعت انکوبه‌گذاری شد. رسوب حاصل در خشک‌کن انجمادی خشک و توزین شد (Doldolova et al., 2021).

تجزیه و تحلیل آماری

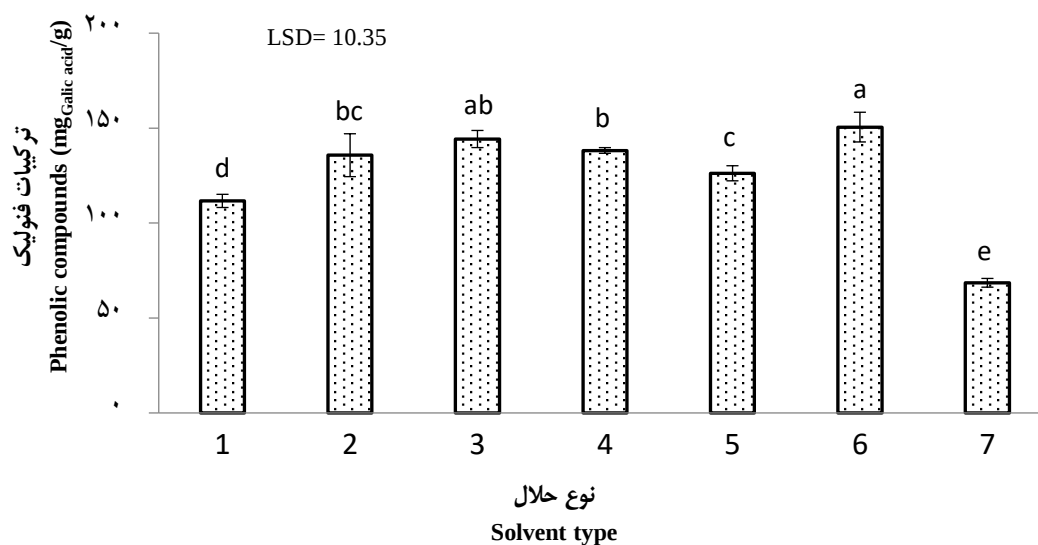
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها بر اساس طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین نتایج بر مبنی حداقل اختلاف معنادار^۱ (LSD) برای متغیرهای وابسته با استفاده از نرم‌افزار SAS version 9 (Cary, NC, USA) انجام شد. همه اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شدند. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 ترسیم شدند.

نتایج

تأثیر ترکیبات حلال بر محتوای فنلی و فعالیت

آنتی اکسیدانی عصاره مستخرج

مطابق نتایج ارائه شده در شکل ۱، تفاوت معنی‌داری میان حلال‌های یوتکتیک مختلف از نظر توانایی استخراج ترکیبات فنولیک از زرین گیاه وجود دارد ($p \leq 0.05$). عصاره استخراج شده با حلال یوتکتیک حاوی مالیک اسید دارای ترکیبات فنولیک بالاتری در مقایسه با سایر عصاره‌های مستخرج است ولی تفاوت معنی‌داری با عصاره استخراج شده با حلال یوتکتیک حاوی گلیسرول از این نظر ندارد ($p \leq 0.05$). اتانول به عنوان حلال شاهد نسبت به سایرین قدرت استخراج ترکیبات فنولیک پایین‌تری را نشان داد. در مقایسه انواع HBD مورد استفاده در این پژوهش در سه دسته کربوهیدرات‌ها، قند الکلی‌ها و کربوکسیلیک اسیدها، با استفاده از فروکتوز نسبت به ساکارز، گلیسرول نسبت به اتیلن گلیکول و مالیک اسید نسبت به سیتریک اسید، محتوای ترکیبات فنولیک عصاره مستخرج افزایش یافت. فاکتورهای مختلفی از جمله قطبیت و pH حلال، نوع و نسبت مولی اجزای تشکیل‌دهنده حلال و ویژگی‌های فیزیکی آن از جمله ویسکوزیته با تأثیر بر حلالیت و سرعت انتقال جرم ترکیبات، بر کارایی استخراج حلال‌های یوتکتیک مؤثر هستند (Wei et al., 2015; Nam, Zhao, Lee, Jeong, & Lee, 2015). بررسی نتایج پژوهش‌های انجام گرفته در این زمینه نیز نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار نوع ترکیبات مورد استفاده در NADES بر عملکرد آنها در استخراج است. در این راستا گزارش شده است که NADES‌های حاوی ترکیبات اسیدی به عنوان HBD، به واسطه دارا بودن قطبیت بالاتر نسبت به حلال‌های یوتکتیک حاوی قندها و الکلی‌ها مانند اتانول یا متانول، توانایی بیشتری در استخراج ترکیبات فنولیک دارند (Alanon, Ivanović, Gomez-Caravaca, Arraez-Roman, &

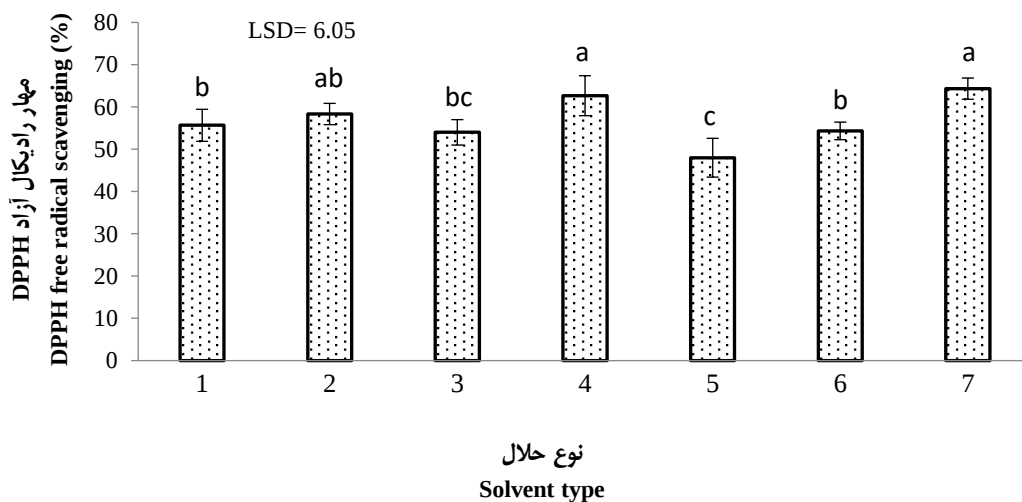


شکل ۱- تأثیر حلال‌ها بر مقدار استخراج شده ترکیبات فنولیک

(نوع حلال شامل حلال‌های یوتکتیک دارای ۱: کولین کلراید-ساکارز؛ ۲: کولین کلراید-فروکتوز؛ ۳: کولین کلراید-گلیسرول؛ ۴: کولین کلراید-اتیلن گلیکول؛ ۵: کولین کلراید-سیتریک اسید؛ ۶: کولین کلراید-مالیک اسید؛ و ۷: اتانول ۵۰٪ است)

Fig. 1. Effect of solvents on the extracted phenolic compounds

(Solvent type includes eutectic solvents with 1: choline chloride-sucrose; 2: choline chloride-fructose; 3: choline chloride-glycerol; 4: choline chloride-ethylene glycol; 5: choline chloride-citric acid; 6: choline chloride-maleic acid; 7: 50% ethanol)



شکل ۲- تأثیر نوع حلال بر فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره مستخرج

(نوع حلال شامل حلال‌های یوتکتیک دارای ۱: کولین کلراید-ساکارز؛ ۲: کولین کلراید-فروکتوز؛ ۳: کولین کلراید-گلیسرول؛ ۴: کولین کلراید-اتیلن گلیکول؛ ۵: کولین کلراید-سیتریک اسید؛ ۶: کولین کلراید-مالیک اسید؛ و ۷: اتانول ۵۰٪ است)

Fig. 2. Effect of solvent type on the antioxidant properties of extracts

(Solvent type includes eutectic solvents with 1: choline chloride-sucrose; 2: choline chloride-fructose; 3: choline chloride-glycerol; 4: choline chloride-ethylene glycol; 5: choline chloride-citric acid; 6: choline chloride-maleic acid; 7: 50% ethanol)

گیاه *Dracocephalum kotschy* Boiss. محتوای ترکیبات فنولیک و فلاونوئید متنوعی از جمله لیمونن، رزمارینیک اسید،

ارزیابی کمی و کیفی ترکیبات عصاره‌های استخراج شده با حلال یوتکتیک منتخب

که شناسایی و تعیین غلظت ترکیبات مختلف با به کارگیری استانداردهای خارجی در سطوح متفاوت و تعیین منحنی استاندارد آنها انجام گرفت. ترکیبات مختلفی شامل لیمونن، رزمارینیک اسید، پندولیتول، اگزانتومیکرول، میرتنول، ژرانیال، نرال، متیل گرانت، آپیزنین و لوتولین که جزئیات آنها در **جدول ۲** آمده است در عصاره‌های مستخرج شناسایی شدند.

پندولیتول، اگزانتومیکرول، میرتنول، ژرانیال، نرال، متیل گرانت، آپیزنین و لوتولین است و از آنجائی که ترکیبات فنولیک ساختار شیمیایی مناسبی برای حذف رادیکال‌های آزاد دارند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی برای عصاره و اسانس مستخرج از این گیاه گزارش شده است. همچنین گزارشاتی مبنی بر وجود ترکیبات ضد اسپاسم و دارای خواص ضدسرطانی و ضد ویروسی برای مواد مؤثره موجود در این گیاه وجود دارد (Foroozandeh & Asadi-Gharneh, 2021). قابل ذکر است

جدول ۲- ترکیبات عصاره‌های استخراج شده از زرین گیاه

Table 2- Compounds of *Dracocephalum kotschyi* extracts

ترکیبات	زمان بازداری RT (min)	عصاره استخراج شده با حلال حاوی اتیلن گلیکول Extract using ethylene glycol-ChCl		عصاره استخراج شده با حلال حاوی مالیک اسید Extract using maleic acid-ChCl	
		سطح زیرپیک Peak area (%)	غلظت Concentration (µg/g)	سطح زیرپیک (%) Peak area (%)	غلظت Concentration (µg/g)
لیمونن Limonene	15.3	435.5	45.429	565.8	36.621
رزمارینیک اسید Rosmarinic acid	04.6	18.83	4379.15	17.276	2147.17
پندولیتول Penduletin	91.6	10.238	1616.09	7.66	527.05
زانتومیکرول Xanthomicrol	21.7	4.612	317.78	-	ND
سیرسیماریتین Cirsimaritin	37.8	4.966	333.48	5.977	281.31
میرتنول Myrtenol	13.9	-	ND	-	ND
جرینیال Geranial	02.10	8.743	987.38	12.709	1215.18
نرال Neral	46.10	10.378	1576.1	10.08	866.19
متیل گرانت Methyl geranat	17.12	6.128	515.98	5.532	272.2
آپیزنین Apigenin	23.15	11.46	1853.34	16.12	2136.13
لوتولین Luteolin	94.15	19.21	4991.3	15.782	1962.51
کل Total		100	17000.05	99.701	10029.1

نعنائیان از جمله *M. longifolia* نیز گزارش شده است (Bahadori, Zengin, Bahadori, Dinparast, & Movahhedin, 2018). با در نظر گرفتن مجموع ترکیبات شناسایی شده، محتوای ترکیبات شناسایی شده در عصاره استخراج شده با حلال یوتکتیک حاوی اتیلن گلیکول، ۱۷۰۰۰/۰۵ میکروگرم در هر گرم از وزن خشک عصاره و در عصاره استخراج شده با حلال یوتکتیک حاوی مالیک اسید، ۱۰۰۲۹/۱ میکروگرم در هر گرم از وزن خشک عصاره می‌باشد. لذا، محتوای ترکیبات فنولیک عصاره استخراج شده با حلال یوتکتیک

در این میان لوتولین (میکروگرم بر گرم ۴۹۹۱/۳) و رزمارینیک اسید (میکروگرم بر گرم ۴۳۷۹/۱۵)، بیشترین سهم ترکیبات مستخرج با حلال یوتکتیک حاوی اتیلن گلیکول-کولین کلراید و رزمارینیک اسید (میکروگرم بر گرم ۲۱۴۷/۱۷) و آپیزنین (میکروگرم بر گرم ۲۱۳۶/۱۳) بیشترین سهم ترکیبات مستخرج با حلال یوتکتیک حاوی مالیک اسید-کولین کلراید را به خود اختصاص می‌دهند. وجود ترکیبات مشابهی از جمله رزمارینیک اسید با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تأثیر مثبت آن در کنترل اختلالاتی مانند سرطان و دیابت در سایر گونه‌های خانواده

تنها عامل تأثیرگذار بر فعالیت آنتی‌اکسیدان عصاره محسوب گردد
(Aghaei Shalmani & Salehi, 2014).

جدول ۳- اثر اعمال امواج الکتریکی پالسی و به کارگیری امواج فراصوت بر محتوای ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدان عصاره زین گیاه
Table 3- Effect of electric pulses and ultrasonic waves on the phenolic content and antioxidant activity of *Dracocephalum kotschyi* extract

	LSD	زمان فراصوت Ultrasonic time (min)			شدت امواج الکتریکی پالسی Electrical pulse intensity (V)		
		30	15	0	5000	2000	0
ترکیبات فنولیک Polyphenolic content (mgGallic acid/g)	1.97	105.3±4.01 ^a	103.1±5.83 ^b	94.28±2.79 ^c	105.7±6.89 ^a	100.3±4.86 ^b	96.79±4.33 ^c
مهار رادیکال آزاد DPPH DPPH free radical scavenging (%)	0.67	30.62±2.78 ^c	40.81±9.76 ^b	49.70±11.00 ^a	31.71±3.31 ^c	40.60±11.06 ^b	48.83±11.41 ^a

میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک در سطح احتمال ۵٪ تفاوت آماری معنی‌دار دارند.

Means with different letters are statistically significantly different at the 5% probability level.

حاوی اتیلن گلیکول ۶۹/۵٪ بیشتر از محتوای ترکیبات فنولیک استخراج شده با حلال یوتکتیک حاوی مالیک اسید است و این حلال برای مطالعات بیشتر انتخاب گردید. در پژوهشی با هدف استخراج ترکیبات فنولیک از برگ توت، گزارش شد که در میان ۲۰ حلال یوتکتیک مورد بررسی با ترکیبات متفاوت، حلال دارای کولین کلراید و سیتریک اسید به‌عنوان هیدروژن‌دهنده و هیدروژن‌گیرنده، بالاترین قابلیت استخراج را دارد (Zhou et al., 2018). در استخراج ترکیبات فنلی از نعنای وحشی با استفاده از حلال‌های یوتکتیک مشخص شد که مخلوط یوتکتیک متشکل از کولین کلراید و گلیسرول عملکرد بالاتری در استخراج فنل‌ها و فلاونوئیدها دارد و بیشترین قدرت آنتی‌اکسیدانی نیز در عصاره مستخرج با استفاده از کولین کلراید و مالیک اسید حاصل آمد. قدرت آنتی‌اکسیدانی این عصاره از عصاره مستخرج با اتانول به‌عنوان حلال رایج نیز بالاتر ارزیابی شد (Jurić et al., 2021). در استخراج کورکومین و عصاره دارای فعالیت آنتی‌اکسیدان از زردچوبه NADES، های حاوی کولین کلراید، ساکارز و لاکتیک اسید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نشان دادند (Doldolova et al., 2021). استفاده از NADES های حاوی کولین کلراید و اگزولیتول، در مقایسه با آب و متانول با افزایش عملکرد ۳۲-۲۰٪ در استخراج ترکیبات فعال زیستی از روغن زیتون به‌عنوان جایگزین سبز و کارآمدتر نسبت به حلال‌های آلی پیشنهاد شدند (García et al., 2016).

بررسی تأثیر پیش تیمار امواج الکتریکی پالسی و

استخراج با امواج فراصوت

بررسی تأثیر اعمال امواج الکتریکی پالسی و امواج فراصوت بر استخراج نشان می‌دهد که اثرات مستقل و متقابل این دو فاکتور بر تغییرات محتوای ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره مستخرج با حلال یوتکتیک دارای اتیلن گلیکول معنی‌دار است. مقایسه میانگین اثرات مستقل این متغیرها در جدول ۳ بیانگر آن است که با افزایش ولتاژ امواج الکتریکی پالسی و مدت زمان اعمال امواج فراصوت، محتوای ترکیبات فنولیک موجود در عصاره افزایش می‌یابد. مقایسه میانگین اثر متقابل متغیرها در شکل ۳ نیز نشان می‌دهد که با افزایش اعمال زمان فراصوت و سطح ولتاژ امواج الکتریکی پالسی، افزایش استخراج ترکیبات فنولیک در عصاره معنی‌دار است. بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مستخرج از زین گیاه نشان می‌دهد که اثرات متقابل این دو پیش تیمار موجب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره می‌گردد (شکل ۴). تغییر در ساختار شیمیایی ترکیبات مؤثره در اثر اعمال امواج فراصوت و الکتریکی پالسی در مرحله استخراج، به نحوی که سطح فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها را تحت تأثیر قرار دهد، دلیل اصلی این مشاهده است. بنابراین محتوای ترکیبات فنولیک، نمی‌تواند

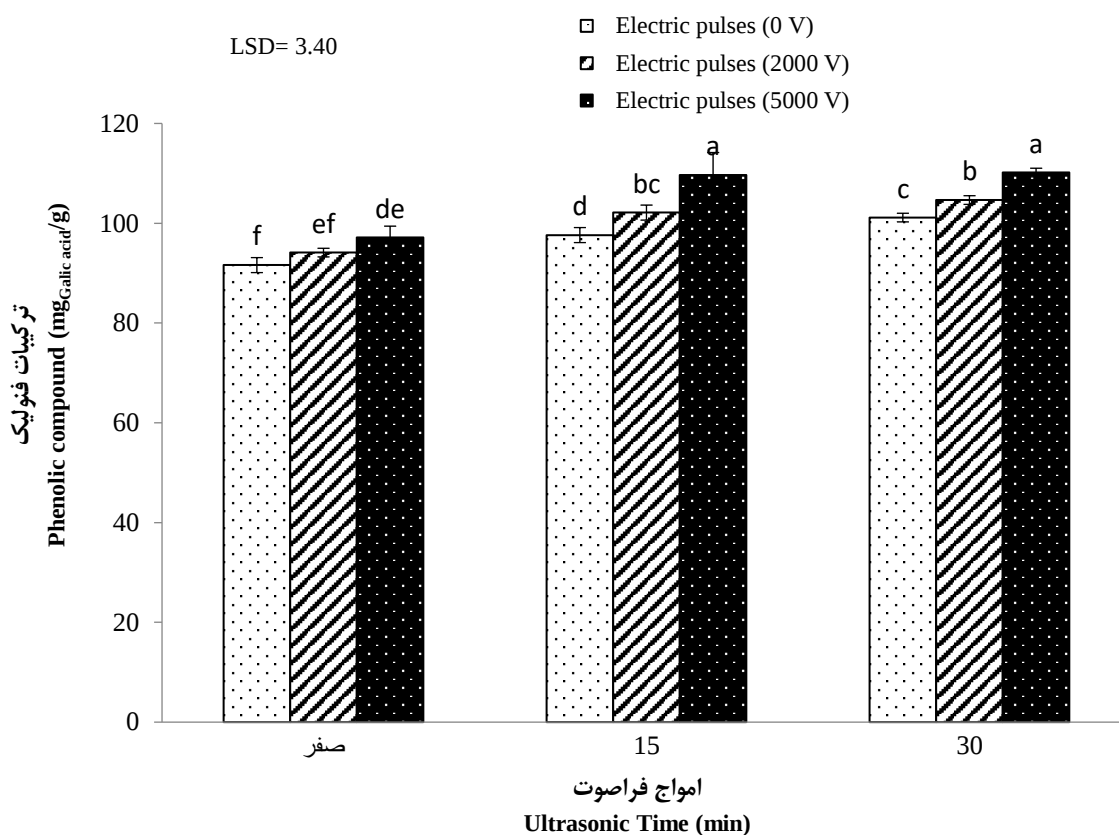
مقایسه و ارزیابی پروفایل ترکیبات عصاره مستخرج از

زرین گیاه در شرایط بهینه با نمونه شاهد

در جدول ۴ ترکیبات شناسایی شده در عصاره استخراج شده با حلال های یوتکتیک منتخب با و بدون اعمال پیش تیمار امواج الکتریکی پالسی و استفاده از امواج فراصوت آمده است. ترکیبات موجود در عصاره مستخرج با استفاده از حلال اتانول نیز به عنوان شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت.

بر اساس نتایج حاصل، عصاره مستخرج با حلال یوتکتیک دارای اتیلن گلیکول، بدون اعمال امواج الکتریکی پالسی و امواج فراصوت به عنوان عصاره دارای بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی و عصاره مستخرج با این حلال به همراه اعمال پیش تیمار امواج الکتریکی پالسی ۵۰۰۰ ولت و استفاده از امواج فراصوت با توان ۲۰۰ وات و فرکانس ۲۸ کیلوهرتز به مدت ۳۰ دقیقه در مرحله استخراج به عنوان عصاره دارای بالاترین محتوای ترکیبات فنولیک منتخب و از نظر پروفایل ترکیبات مورد ارزیابی قرار گرفتند.

اثر متقابل اعمال امواج الکتریکی پالسی بر نمونه و امواج فراصوت در مرحله استخراج در شکل های ۳ و ۴ زیر مشاهده می شود.

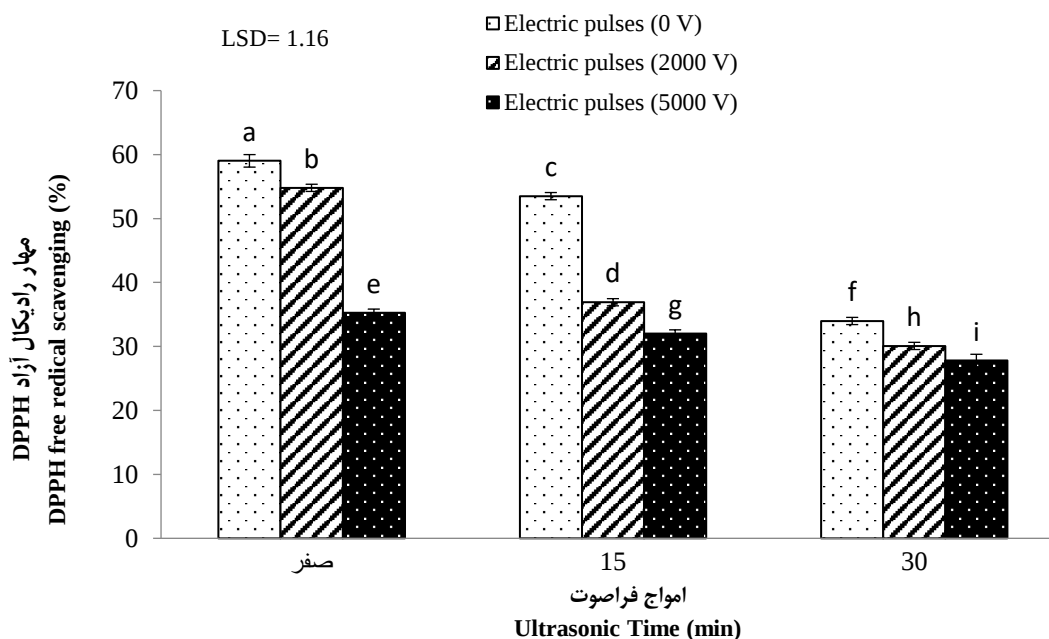


شکل ۳- اثر متقابل امواج الکتریکی پالسی و زمان اعمال امواج فراصوت بر استخراج ترکیبات فنولیک از زرین گیاه با استفاده از حلال یوتکتیک منتخب

میانگین های دارای حروف غیر مشترک در سطح احتمال ۵٪ تفاوت آماری معنی دار دارند.

Fig. 3. Effect of electric pulses and ultrasonic time on the extraction of phenolic compounds from *Dracocephalum kotschy* using the selected eutectic solvent

Means with different letters are statistically significantly different at the 5% probability level.



شکل ۴- اثر متقابل اعمال امواج الکتریکی پالسی و امواج فراصوت بر خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده از زیرین گیاه با حلال یوتکتیک منتخب

میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک در سطح احتمال ۵٪ تفاوت آماری معنی‌دار دارند.

Fig. 4. Effect of applying electric pulses and ultrasonic time on antioxidant activity of *Dracocephalum kotschy* extract using the selected eutectic solvent

Means with different letters are statistically significantly different at the 5% probability level.

می‌شود (Aghaei Shalmani & Salehi, 2014). بررسی اثر اعمال همزمان میدان الکتریکی پالسی و فشار در استخراج آب سیب نیز نشان داد که استفاده از این تیمار کمکی در افزایش معنی‌دار کمیت و کیفیت فرآورده تولید شده مؤثر است. با اعمال امواج الکتریکی پالسی، بازده تولید آبمیوه از ۱/۷ به ۷/۷٪ افزایش یافت و آب میوه‌های تولید شده با اعمال امواج الکتریکی پالسی محتوای قند بالاتر و رنگ بهتری داشتند (Aghaei Shalmani & Salehi, 2014). امواج الکتریکی پالسی سرعت فشردگی را افزایش و امکان استخراج پلی‌فنل‌ها از انگور را افزایش می‌دهد. به عبارتی تأثیر پالس بر شدت رنگ، محتوای آنتوسیانین، پلی‌فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش‌دهنده ارزیابی شد (Vorobiev & Lebovka, 2010). مطابق نتایج پژوهش حاضر، مجموع وزنی ترکیبات فنولیک شناسایی شده در عصاره استخراج شده با حلال یوتکتیک حاوی اتیلن گلیکول با اعمال تیمارهای کمکی برابر با (۲۵۲۷۵/۴۱) میکروگرم بر گرم، بدون اعمال تیمارهای کمکی (۱۷۰۰۰/۰۵) میکروگرم بر گرم و در نمونه استخراج شده با اتانول (۲۱۶۵۲/۸۹) میکروگرم بر گرم ارزیابی شد. بنابراین اعمال تیمارهای کمکی در افزایش استخراج ترکیبات مؤثر از زیرین گیاه تأثیرگذار و برتر از حلال اتانول ارزیابی شد.

مطابق نتایج بدست آمده، در عصاره استخراج شده با حلال یوتکتیک منتخب به همراه تیمارهای کمکی، لوتولین (۶۶۸۳/۹۴) میکروگرم بر گرم و آپیزین (۵۸۷۴/۶۴) میکروگرم بر گرم بیشترین و متیل‌گرانث (۳۰۴/۴۷) میکروگرم بر گرم و زانتومیکرول (۳۲۵/۴۳) میکروگرم بر گرم کمترین ترکیبات شناسایی شده در عصاره هستند. در عصاره مستخرج بدون تیمارهای کمکی، لوتولین (۴۹۹۱/۳) میکروگرم بر گرم و رزمارینیک اسید (۴۳۷۹/۱۵) میکروگرم بر گرم بیشترین و زانتومیکرول (۴/۶۱۲) میکروگرم بر گرم کمترین ترکیب شناسایی شده در عصاره بود و میرتنول در این عصاره قابل شناسایی نبود. در نمونه استخراج شده با اتانول که به‌عنوان حلال رایج جهت استخراج می‌باشد، نیز لوتولین (۶۶۵۱/۰۱) میکروگرم بر گرم و آپیزین (۵۰۴/۲) میکروگرم بر گرم بیشترین ترکیبات شناسایی شده در عصاره بودند. امواج الکتریکی پالسی با ایجاد منافذ در غشا سلول، نفوذپذیری و انتقال آب و مواد محلول از آن را سرعت می‌بخشد. تغییر در خصوصیات غشا دیواره‌ی سلولی به‌نحوی که مواد درون سلول با سرعت و سهولت از سلول خارج شوند، موجب می‌گردد که استخراج در حداقل زمان و انرژی مورد نیاز صورت پذیرد. بررسی منابع نشان می‌دهد که در فرآیند استخراج ساکارز از چغندر قند با اعمال امواج الکتریکی پالسی، افزایش تعداد پالس، هدایت شربت را افزایش می‌دهد و به این صورت اعمال امواج الکتریکی پالسی منجر به افزایش ۸۲٪ بازده استخراج

جدول ۴- مقادیر کمی ترکیبات شناسایی شده در عصاره استخراج شده از زرین گیاه با اتانول و حلال بوتنیک منتخب با و بدون اعمال تیمارهای کمکی
Table 4- Compounds of *Dracocephalum kotschyi* extracts using ethanol and selected eutectic solvent with and without auxiliary treatments

تو کبیات Concentration	زمان باز داری (دقیقه) Retention Time	عصاره مستخرج با اتانول ۵۰٪ Extract with ethanol			عصاره مستخرج با حلال یو تکنیک با اعمال تیمارهای کمکی Extract with eutectic solvent with auxiliary treatments			عصاره مستخرج با حلال یو تکنیک بدون اعمال تیمارهای کمکی Extract with eutectic solvent without auxiliary treatments		
		سطح زیر پیک (%) Peak area	غلظت (میکرو گرم بر گرم) Concentration	غلظت (%) Peak area	سطح زیر پیک (%) Peak area	غلظت (میکرو گرم بر گرم) Concentration	غلظت (%) Peak area	سطح زیر پیک (%) Peak area	غلظت (میکرو گرم بر گرم) Concentration	
لیمونن Limonene	3.15	5.736	629.64	5.777	732.41	5.435	429.45			
رزمارینیک اسید Rosmarinic acid	6.04	13.912	3146.57	12.447	2887.88	18.83	4379.15			
پندولیتول Penduletin	6.91	7.144	1035.8	4.294	429.01	10.238	1616.09			
زانثومیکرول Xanthomicrol	7.21	4.388	370.04	3.799	325.43	4.612	317.78			
سیرسیمارین Cirsimaritin	8.37	4.328	333.33	5.115	533.79	4.966	333.48			
میرتول Myrtenol	9.13	3.926	311.74	4.337	436.18	-	ND			
جرینال Geranial	10.02	8.811	1320.1	11.302	2490.18	8.743	987.38			
نرال Neral	10.46	11.222	2426.06	14.396	4577.48	10.378	1576.1			
متیل گرانت Methyl geranat	12.17	4.844	424.4	3.832	304.47	6.128	515.98			
آپیژنین Apigenin	15.23	16.413	5004.2	16.608	5874.64	11.46	1853.34			
لوتولین Luteolin	15.94	19.327	6651.01	18.094	6683.94	19.21	4991.3			
کل Total		100.051	21652.89	100.00	25275.41	100	17000.05			

بازیابی نمونه بهینه

محتوای پلی فنلی عصاره ایتلین گلیکول-کولین کلراید با و بدون استفاده از تیمارهای کمکی به ترتیب ۵۳ و ۴۵ درصد کل ترکیبات فنولیک استخراج شده بازیابی شد. بازیابی پلی فنولها از NADES در تحقیقات دیگر نیز گزارش شده است. بنابراین، NADES را می توان چندین بار دیگر به عنوان حلال برای استخراج استفاده کرد که به دلیل هزینه کم، سمیت، انحطاط و همچنین قابلیت استفاده مجدد، این حلالها در مقایسه با حلالهای معمولی ارجحیت دارند (Paiva et al., 2014). در این راستا، استخراج بهینه کورکومینوئیدها در NADES توضیح داده شد و بازیابی کورکومینوئیدها از NADES مختلف ۳۷/۵٪ - ۴۱/۱٪ گزارش شد (Patil, Pathak, & Rathod, 2020). مهم ترین فنولهای بازیابی شده در عصاره برگ مرس آلبا (*Morus alba* L.) به ترتیب اسید کلروژنیک (۷۰/۵٪)، اسید کاتچین (۸۰/۸٪) اسید بنزوئیک (۷۲/۶٪) و استراگالین (۶۰/۷٪) گزارش شد (Huang et al., 2017).

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که حلال یوتکتیک حاوی ایتلین گلیکول-کولین کلراید به دلیل بالا بودن فعالیت آنتی اکسیدانی و بالاترین محتوای ترکیبات شناسایی شده در عصاره استخراج شده (۱۷۰۰۰/۰۵ میکروگرم در هر گرم از وزن خشک عصاره) بهترین شرایط را برای استخراج این گیاه دارا بود. اعمال پیش تیمار امواج الکتریکی پالسی ۵۰۰۰ ولت و تعداد پالس ۱۲۰ و استفاده از امواج فراصوت با توان ۲۰۰ وات و فرکانس ۱۲ کیلوهرتز به مدت ۳۰ دقیقه در مرحله استخراج، تأثیر

معنی داری در افزایش قابلیت استخراج ترکیبات مؤثره زین گیاه نشان دادند. درواقع تغییر در خصوصیات سلولی به نحوی که مواد درون سلول با سرعت و سهولت از سلول خارج شوند، موجب می گردد که استخراج در حداقل زمان و انرژی مورد نیاز صورت پذیرد. مجموع وزنی ترکیبات مؤثره شناسایی شده در عصاره استخراج شده با حلال یوتکتیک حاوی ایتلین گلیکول با اعمال تیمارهای کمکی برابر با (۲۵۲۷۵/۴۱ میکروگرم بر گرم) بدون اعمال تیمارهای کمکی (۱۷۰۰۰/۰۵ میکروگرم بر گرم) و در نمونه استخراج شده با اتانول (۲۱۶۵۲/۸۹ میکروگرم بر گرم) ارزیابی شد. بنابراین اعمال تیمارهای کمکی در افزایش استخراج ترکیبات مؤثر از زین گیاه تأثیرگذار و برتر از حلال اتانول ارزیابی شد. با استفاده از روش رسوب ضد حلال (آب)، ۵۳٪ کل ترکیبات فنولیک استخراج شده بازیابی و حلال یوتکتیک به سیستم بازگردانده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از حلالهای سبز و به کارگیری تیمارهای کمکی در بهبود عملکرد آنها می تواند در استخراج ترکیبات ارزشمند از گیاهان دارویی مفید باشد. اگرچه لازم است مطالعات اختصاصی در هر مورد برای انتخاب شرایط مناسب استخراج انجام گیرد و البته نیاز به بهینه سازی هزینه ها در بخش انرژی و تجهیزات وجود دارد.

میزان مشارکت و منابع تأمین مالی

این پژوهش نتایج حاصل از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم سحر کیانی است که تحت راهنمایی دکتر هاجر عباسی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) و با هزینه شخصی انجام شده است.

References

1. Aghaei Shalmani, M., & Salehi, M.A. (2014). Effect of pulsed electric field extraction efficiency, University of Guilan, Faculty of Technology and Engineering, Department of Chemistry, 02_061. <https://civilica.com/doc/343270>.
2. Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., & Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
3. Aydin, F., Yilmaz, E., & Soylak, M. (2018). Vortex assisted deep eutectic solvent (DES) emulsification liquid microextraction of trace curcumin in food and herbal tea sample. *Food Chemistry*, 243, 442-447. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.154>
4. Alanon, M.E., Ivanović, M., Gomez-Caravaca, A.M., Arraez-Roman, D., & Segura-Carretero, A. (2020). Choline chloride derivative-based deep eutectic liquids as novel green alternative solvents for extraction of phenolic compounds from olive leaf. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 1685-1701. <https://doi.org/10.1016/j.arabjch.2018.01.003>
5. Bahadori, M.B., Zengin, G., Bahadori, Sh., Dinparast, L., & Movahhedine, N. (2018). Phenolic composition and functional properties of wild mint (*Mentha longifolia* var. *calliantha* (Stapf) Briq.). *International Journal of Food Properties*, 21, 183-193. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1440238>
6. Doldolova, Kh., Bener, M., Lalikoglu, M., Selim Asçı, Y., Arat, R., & Apak, R. (2021). Optimization and modeling of microwave-assisted extraction of curcumin and antioxidant compounds from turmeric by using natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 353, 129337. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129337>

7. Dai, Y., Spronsenb, J., Witkampb, G., Verpoortea, R., & Hae Choi, Y. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
8. Delos Angeles Fernandez, M., Espino, M., Gomez, F.J.V., & Silva, M.F. (2018). Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products. *Food Chemistry*, 239, 671–678. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.150>
9. Foroozandeh, E., & Asadi-Gharneh, H. (2021). *Dracocephalum kotschy* Boiss.: An Iranian endemic medicinal plant; A review. *Journal of Medicinal Herbs*, 12, 9-17.
10. Florindo, C., Oliveira, F.S., Rebelo, L.P.N., Fernandes, A.M., & Marrucho, I.M. (2014). Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on choline chloride and carboxylic acids. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(10), 2416–2425. <https://doi.org/10.1021/sc500439w>
11. García, A., Rodríguez-Juan, E., Rodríguez-Gutiérrez, G., Julian Rios, J., & Fernández-Bolaños, J. (2016). Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). *Food Chemistry*, 197, 554-561. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.131>
12. Huang, Y., Feng, F., Jiang, J., Qiao, Y., Wu, T., Voglmeir, J., & Chen, Z.G. (2017). Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 221, 1400–1405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.013>
13. Jeong, K.M., Jin, Y., Yoo, D.E., Han, S.Y., Kim, E.M., & Lee, J. (2018). One-step sample preparation for convenient examination of volatile monoterpenes and phenolic compounds in peppermint leaves using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 251, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.079>
14. Jurić, T., Mićić, N., Potkonjak, A., Milanov, D., Dodić, J., Trivunović, Z., & Popović, B. (2021). The evaluation of phenolic content, in vitro antioxidant and antibacterial activity of *Mentha piperita* extracts obtained by natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 362, 130226. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130226>
15. Li, B., Du, W., Jin, J., & Du, Q. (2012). Preservation of epigallocatechin-3-gallate antioxidant properties loaded in heat treated -lactoglobulin nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3477–3484. <https://doi.org/10.1021/jf300307t>
16. Mozaffarian, V. (2008). A dictionary of Iranian plant names. Latin, English, Persian, FarhangMo'aser. 740.
17. Nam, M.W., Zhao, J., Lee, M.S., Jeong, J.H., & Lee, J. (2015). Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: Application to flavonoid extraction from *Flos sophorae*. *Green Chemistry*, 17(3), 1718–1727. <https://doi.org/10.1039/c4gc01556h>
18. Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R.L., & Duar, A.R.C. (2014). Natural deep eutectic solvents-solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1063-1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>
19. Patil, S.S., Pathak, A., & Rathod, V.K. (2020). Optimization and kinetic study of ultrasound assisted deep eutectic solvent based extraction: A greener route for extraction of curcuminoids from *Curcuma longa*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105267. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105267>
20. Smith, E.L., Abbott, A.P., & Ryder, K.S. (2014). Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemistry*, 114, 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>
21. Santos, S., Pinto, P., Silvestre, A., & Pascoal Neto, C. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Industrial Crops and Products*, 31, 521-526. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.02.001>
22. Vorobiev, E., & Lebovka, N. (2010). Enhanced extraction from solid foods and biosuspensions by pulsed electrical energy. *Food Engineering*, 2, 95–108. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9021-5>
23. Wu, L., Li, L., Chen, Sh., Wang, L., & Lin, X. (2020). Deep eutectic solvent-based ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from *Moringa oleifera* L. leaves: Optimization, comparison and antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, 247, 117014. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117014>
24. Wei, Z.F., Wang, X.Q., Peng, X., Wang, W., Zhao, C.J., Zu, Y.G., & Fu, Y.J. (2015). Fast and green extraction and separation of main bioactive flavonoids from *Radix scutellariae*. *Industrial Crops and Products*, 63, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.013>
25. Zhang, Q., De Oliveira-Vigier, K., Royer, S., & Jérôme, F. (2012). Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*, 41, 7108–7146. <https://doi.org/10.1039/c2cs35178a>
26. Zhou, P., Wanga, X., Liub, P., Huang, J., Wanga, Ch., Pana, M., & Kuanga, Z. (2018). Enhanced phenolic compounds extraction from *Morus alba* L. leaves by deep eutectic solvents combined with ultrasonic-assisted extraction. *Industrial Crops & Products*, 120, 147-154. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.071>