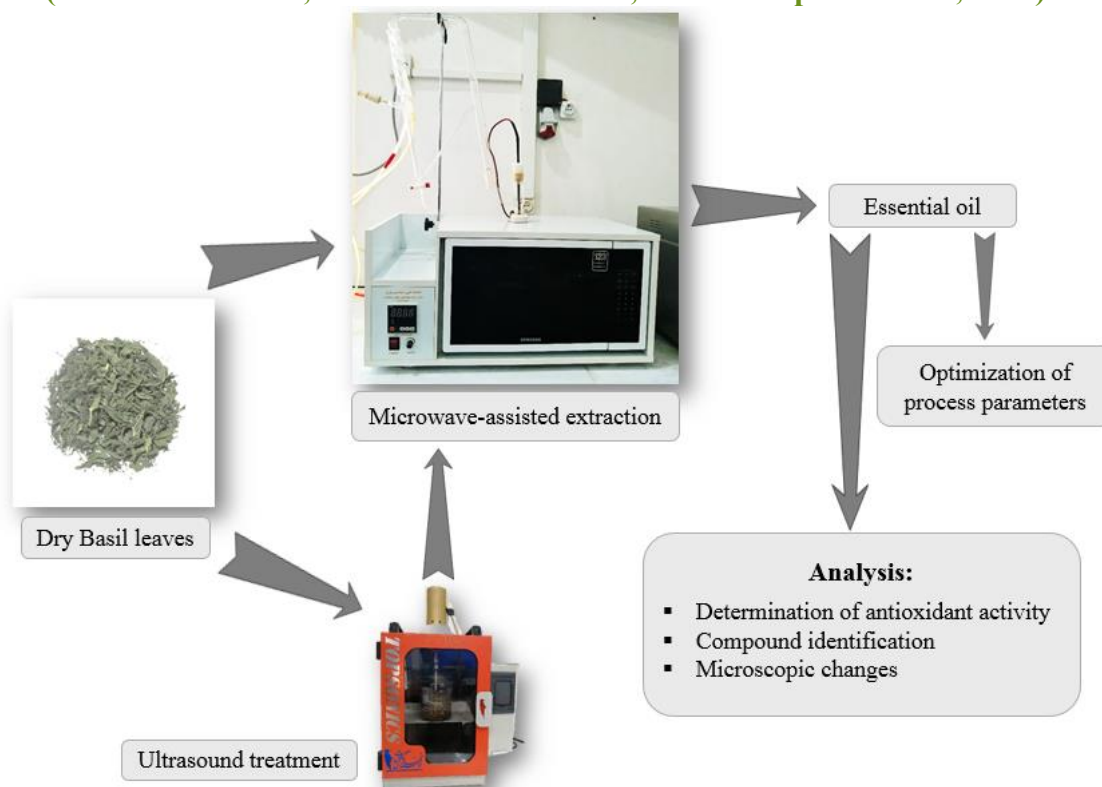


Comparison of Essential Oil from *Ocimum Basilicum* Obtained via Sequential Ultrasound-Microwave Extraction with Microwave Method

Habib Abbasi¹, Shady Sharifzadeh¹, Safoora Karimi^{1,*}

¹ Department of Chemical Engineering, Jundi-Shapur University of Technology, Dezful, Iran

(Received: June 12, 2021- Revised: Nov. 22, 2021- Accepted: Jan. 8, 2022)



Abstract: Determining the best extraction method to obtain high yield of essential oils from medicinal plants has been identified as one of the challenges in scientific research. The sequential ultrasound-microwave method is a new extraction method that in this research has been applied to extraction of essential oil from basil. In order to investigate the effect of this approach on enhancing extraction yield, the microwave method was examined as a base method. To optimize the extraction conditions of the sequential method, ultrasonic power, microwave power, and extraction time were determined as independent variables and essential oil yield as response. Experiments were modeled by central composite design (CCD) of response surface methodology (RSM). The highest yield (2.3% w/w) was obtained at 300 W of ultrasonic power, 600 W of microwave power, and 40 min of extraction time. While the base method yield was 0.74% w/w. The chemical composition analysis of the active compounds showed that the number of compounds in the sequential approach is higher than those in the microwave method. Furthermore, by comparing the antioxidant properties obtained by DPPH and FRAP methods, the sequential method was better in preserving the antioxidant properties of basil essential oil. Scanning electron microscopy images also showed more damage to the glands containing the active ingredients by the sequential process than the base method. Generally, the sequential ultrasound-microwave method can be introduced as an efficient method for the extraction of essential oils from *Ocimum basilicum*.

Keywords: Optimization, Basil, Gas chromatography, Scanning electron microscope

مقایسه فرایند استخراج اسانس ریحان به روش ترتیبی فراصوت- مایکروویو با روش مایکروویو

حبیب اله عباسی^۱، شادی شریف زاده^۱، صفورا کریمی^{۱*}

۱. گروه مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی جندی شاپور دزفول، دزفول، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۲۲- تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۹/۱- تاریخ تصویب: ۱۴۰۰/۱۰/۱۸)

چکیده: انتخاب روش استخراج مناسب به منظور رسیدن به بازده بالاتر استخراج اسانس از گیاهان دارویی یکی از چالش‌های پیش رو در تحقیقات علمی است. روش ترتیبی فراصوت-مایکروویو یکی از روش‌های نوین استخراج است که در این پژوهش برای استخراج اسانس از گیاه ریحان استفاده شد. به منظور بررسی تأثیر این روش در افزایش بازده استخراج، روش مایکروویو به عنوان روش مبنا مورد مقایسه قرار گرفت. برای بهینه‌سازی شرایط استخراج به روش ترکیبی، توان فراصوت، توان مایکروویو و زمان استخراج به عنوان متغیرهای مستقل و بازده استخراج اسانس به عنوان پاسخ در نظر گرفته شد. طراحی آزمایشات به روش سطح پاسخ (RSM) با استفاده از طرح مرکب مرکزی (CCD) انجام شد. بیشترین بازده به دست آمده در شرایط ۳۰۰ وات توان فراصوت، ۶۰۰ وات توان مایکروویو و ۴۰ دقیقه زمان استخراج به دست آمد که معادل (۲/۳٪ وزنی/وزنی) بود. این در حالی است که بازده روش استخراج مبنا ۰/۷۴ درصد وزنی/وزنی به دست آمد. نتایج به دست آمده از بررسی ترکیبات شیمیایی مواد مؤثره حاصل نشان داد که تعداد ترکیبات موجود در روش ترتیبی بالاتر از تعداد آن‌ها در روش مایکروویو است. علاوه بر این، با مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش‌های DPPH و FRAP ثابت شد که روش ترتیبی در حفظ خواص اسانس حاصل از گیاه ریحان بهتر عمل کرده است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز نشان داد که غدد حاوی مواد مؤثره در اثر فرآیند استخراج ترتیبی نسبت به روش مبنا بیشتر تخریب شده‌اند. به طور کلی، روش ترتیبی فراصوت-مایکروویو می‌تواند به عنوان روش کارآمدی برای استخراج اسانس از گیاه دارویی ریحان معرفی شود.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌سازی، گیاه دارویی ریحان، کروماتوگرافی گازی، میکروسکوپ الکترونی روبشی

مقدمه

گیاهان دارویی از دیرباز نقش اساسی در فرهنگ جوامع گوناگون داشته‌اند و به‌عنوان منبع دارویی در همه تمدن‌ها پیشتاز بوده‌اند. علیرغم پیشرفت‌های فراوان در زمینه‌ی داروسازی به روش‌های نوین و استفاده از مواد شیمیایی غیرطبیعی، گیاهان دارویی همچنان از پرکاربردترین مواد به‌کاررفته در صنایع دارویی محسوب می‌شوند (Dar et al., 2017; Singh et al., 2013). تاکنون با تحقیقاتی که بر روی داروهای حاصل از این گیاهان و یا مشتقات آن‌ها صورت گرفته است، عملکرد بسیار مؤثر آن‌ها در درمان بیماری‌هایی چون سرطان، دیابت، پارکینسون و آلزایمر به اثبات رسیده است (Gezici & Şekeroğlu, 2019; Nazarian-Samani et al., 2018). تحقیقات نشان می‌دهند که منشأ این تأثیرات مثبت، وجود ترکیبات شیمیایی مؤثره در گیاهان است. این ترکیبات شامل ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و دیگر ترکیبات شیمیایی است که اغلب موجب خواص آنتی‌اکسیدانی و یا دیگر خواص این گیاهان می‌شوند. با توجه به گوناگونی گیاهان دارویی و انواع مختلف خانواده‌ها و زیرمجموعه‌های آن‌ها، میزان و تعداد این ترکیبات اساسی در هرگونه از این گیاهان متفاوت است (Croteau et al., 2000; Farnsworth et al., 1985).

ریحان گونه‌ای از گیاهان دارویی مفید و پرکاربرد با نام علمی عمومی (Basil) یا (*Ocimum basilicum*) از خانواده نعنائیان است که در گذشته منحصراً متعلق به هند و قاره آسیا بوده است، اما امروزه به دلیل کاربرد فراوان در تمام نقاط جهان نیز به‌وفور کشت می‌شود (Ahmed et al., 2019; Simon et al., 1999). در طب سنتی از این گیاه برای درمان بیماری‌های متفاوتی از جمله تشنج، اسهال، صرع، نقرس، حالت تهوع، گلودرد، دندان‌درد، و برونشیت استفاده شده است (Ahmed et al., 2019). این فواید و عملکردهای مختلف گیاه ریحان با تعدادی از اجزای آن مرتبط است. ترکیبات شیمیایی

مفید زیادی در ریحان وجود دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به پلی ساکاریدها، نفتا، استروئیدها، فلاون، کومارین‌ها و ویتامین‌ها اشاره کرد (Zhan et al., 2020). همچنین با توجه به رایحه قوی این گیاه، از برگ‌های آن به‌عنوان عطر و طعم‌دهنده در صنایع غذایی و نوشیدنی‌ها نیز استفاده می‌شود. ریحان منبع اسانس روغنی است که حاوی ترکیبات شیمیایی پیچیده و گوناگون است و این گیاه را در دسته‌ی گیاهان ارزشمند به‌خصوص از نظر ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی قرار داده است (Al Abbasy et al., 2015). برای استخراج این ترکیبات به همراه اسانس روغنی روش‌های متعددی وجود دارد که با توجه به بافت گیاه، مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ollanketo et al., 2002).

استخراج، اولین و مهم‌ترین قدم در به دست آوردن مواد مؤثره گیاهان دارویی محسوب می‌شود. انتخاب روش مناسب برای استخراج، تأثیر مستقیم بر کمیت و کیفیت ترکیبات حاصله دارد. در دهه‌های اخیر با توجه به کاربرد روزافزون گیاهان دارویی در صنایع مختلف، انتخاب روش‌های مؤثر در استخراج این ترکیبات و بالا بردن بازده استخراج یکی از چالش‌های پیش روی محققان است (Azmir et al., 2013; Gupta et al., 2012). روش‌های کلاسیک از جمله اولین روش‌ها و قدیمی‌ترین روش‌های استخراج بوده‌اند که پرکاربردترین آن‌ها بر پایه تقطیر با آب می‌باشند. با توجه به معایب زیاد از جمله زمان بسیار طولانی استخراج، بازده نسبتاً پایین، مصرف حلال زیاد، انرژی مصرفی بالا و از دست رفتن خواص دارویی مواد مؤثره به دلیل گرمای بالا در بسیاری از روش‌های کلاسیک، روش‌های نوین جایگزین این روش‌ها شده‌اند (Azmir et al., 2013). از جمله روش‌های نوین می‌توان به روش‌های استخراج با مایکروویو^۱ (MAE)، استخراج فراصوت^۲ (UAE)، استخراج مایعات فوق بحرانی^۳ (SFE) و میکرو استخراج فاز جامد^۴ (SPME) اشاره کرد (Gupta et al., 2012). روش‌های استخراج نوین

خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی این گیاه بررسی شدند. در این پژوهش بیشترین ترکیبات شیمیایی این اسانس به ترتیب لینالول، گرانیلول، ۸۱-سینئول، آلفا-برگاموتن و گرانیل استات بودند و بازده استخراج در این روش ۰/۱۷ درصد به دست آمد. بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس در برابر باکتری‌های مختلف نیز نشان داد که این گیاه دارای خاصیت ضد میکروبی بالایی است و پیشنهاد می‌شود که از آن در صنایع غذایی بهره گرفته شود (Hanif et al., 2011). در پژوهش دیگری، بررسی نتایج آنالیز ترکیبات شیمیایی چند نوع ریحان نشان داد که ترکیب کمی و کیفی اسانس‌های روغنی حاصل از این گونه‌ها کاملاً متفاوت بوده است. با این حال، نتایج خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی برای همه گونه‌ها نشان داد می‌توان از آن‌ها در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی بهداشتی استفاده کرد (Avetisyan et al., 2017). همچنین از روش مایکروویو برای استخراج اسانس ریحان استفاده شد. در این تحقیق علاوه بر بهینه‌سازی شرایط استخراج، نتایج کروماتوگرافی گازی نیز نشان داد که بیشترین ترکیبات شیمیایی برای این گیاه به ترتیب استراگول، آلفا-برگاموتن، تاو-کادینول و لینالول هستند (T. H. Tran et al., 2018).

با توجه به خواص فراوان ریحان به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان درمانی، در این پژوهش اسانس این گیاه با استفاده از روش ترکیبی فراصوت-مایکروویو استخراج شد. تاکنون از این روش ترکیبی برای به دست آوردن اسانس ریحان استفاده نشده است. به همین علت بهینه‌سازی شرایط استخراج و بررسی تأثیر پارامترهای عملیات (توان فراصوت، توان مایکروویو و زمان مایکروویو) بر میزان بازده با استفاده از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت و روش سطح پاسخ مطالعه شده است. به منظور بررسی و مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس حاصل از روش‌های ترکیبی و مایکروویو از دو آزمون DPPH و FRAP استفاده شد. همچنین شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها از دیگر اهداف این پژوهش است.

با توجه به میزان اتلاف وقت و انرژی که روش‌های سنتی دارند، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. از طرفی نتایج قابل قبول در حفظ و افزایش میزان خواص مورد نظر از دیگر مزایای بهره‌گیری از این روش‌ها می‌باشد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده ترکیب کردن روش‌های نوین علاوه بر حفظ مزایا و تقویت آن‌ها در روش ترکیبی، به کم کردن معایب هر کدام از آن‌ها نیز کمک می‌کند. روش‌های ترکیبی متعددی تا به امروز برای استخراج مواد مؤثره از گیاهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند. از جمله این روش‌ها استفاده از امواج فراصوت و مایکروویو است. در تحقیقی که بر روی استخراج اسانس از گیاه آویشن شیرازی به این روش انجام شد، با مقایسه بازده اسانس به‌دست‌آمده از این روش ترکیبی و روش مایکروویو تأثیر مثبت این روش بر بازده و خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس این گیاه مشهود بود (Karimi et al., 2020). در پژوهش دیگری نیز که برای استخراج اسانس گیاه *Perilla frutescens* (L.) Britt از این روش ترکیبی استفاده شد، بازده بالاتر اسانس و خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد قارچی بهتر برای این اسانس به دست آمد (Chen et al., 2020). همچنین در پژوهشی با استخراج الیگوساکارید از گیاه نیلوفر آبی با استفاده از این روش نتایج بالاتری برای بازده این ترکیب شیمیایی گزارش شد (Lu et al., 2017). بر این اساس در پژوهش حاضر روش نوین ترکیبی فراصوت و مایکروویو برای استخراج مواد مؤثره گیاه ریحان انتخاب شده است. تحقیقات نشان می‌دهد که در این روش با ترکیب کردن اثر تابش امواج فراصوت و امواج مایکروویو فرآیند استخراج تسریع یافته و علاوه بر آن با کنترل توان و دما می‌توان برای مواد حساس به حرارت نیز شرایط بهینه‌ی استخراج را به دست آورد (Chan et al., 2011; Lu et al., 2017; Wen et al., 2020).

از طرفی تاکنون پژوهش‌های زیادی بر روی گیاه ریحان صورت گرفته است. در تحقیقی استخراج اسانس گونه‌ای از ریحان عمانی به روش کلونجر انجام شد و

توان بین ۲۰ تا ۴۰۰ وات را دارد. همان‌طور که گفته شد در مطالعه‌ی حاضر این مرحله به‌عنوان پیش‌تیمار در نظر شده است. مدت‌زمان قرارگیری در هموژنایزر اولتراسونیک با توجه به پژوهش‌های گذشته که بر روی گیاهان هم‌خانواده ریحان یعنی نعناعیان صورت گرفته است، ۲۰ دقیقه معین گردید (Karimi et al., 2020). پس از آن، به‌منظور شروع فرایند اسانس‌گیری محلول به میکروویو (سامسونگ، ME341، ۲۴۵۰ مگاهرتز، کره جنوبی) منتقل شد. دستگاه میکروویو مجهز به یک کلونجر است که دقیقاً در بالای بشر حاوی مواد تعبیه شده است. پس از گذشت زمان و توان مشخص، اسانس حاصل از هر آزمایش از چگالنده جمع‌آوری شد و آب اضافی آن توسط نمک سدیم سولفات گرفته شد. اسانس حاصله توزین شده و برای انجام آزمایشات آتی در میکروتیوب‌های جداگانه و در پوشش تاریک در دمای ۴ درجه سلسیوس یخچال نگهداری شد.

به‌منظور مقایسه و بررسی دقیق‌تر کیفیت و کمیت ترکیبات شیمیایی و بازده اسانس حاصل از استخراج به روش ترکیبی، از روش استخراج میکروویو به‌عنوان روش مینا استفاده شد. در این آزمایشات از شرایط بهینه بدون اعمال فراصوت برای به دست آوردن مواد مؤثره گیاه ریحان استفاده شد. برای این منظور با همان نسبت ۱ به ۱۰ گیاه به حلال و در توان بهینه به‌دست‌آمده از آزمایشات قبل فرایند استخراج میکروویو انجام شد. اسانس‌گیری در این آزمایش تا زمانی ادامه پیدا کرد که اسانس دیگری به‌دست نیامد.

طراحی آزمایش

در آزمایشات حاضر از روش سطح پاسخ^۱ (RSM) با استفاده از طرح مرکب مرکزی^۲ (CCD) در نرم‌افزار دیزاین اکسپرت ۱۱ محصول کشور آمریکا برای طراحی آزمایش‌ها، تجزیه و تحلیل آماری و رسم نمودارها در سطح اطمینان ۹۵٪ به کار گرفته شد. متغیرهای مورد بررسی در این تحقیق توان فراصوت (X_1)، توان

تأثیر روش استخراج بر روی ساختار سلولی گیاه نیز برای هر دو روش مطالعه شده است. روش کار و نتایج به دست آمده در ادامه آورده شده است.

مواد و روش‌ها

مواد

گیاه ریحان استفاده‌شده در این تحقیق از گونه *Ocimum basilicum* L. ریحان سبز بود. این گیاه از منطقه دزفول در استان خوزستان جمع‌آوری و خشک کردن برگ‌های آن با استفاده از پنکه در دمای اتاق و در سایه انجام شد. در این مطالعه اسید اسکوربیک، DPPH، $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، و TPTZ همگی از شرکت سیگما-آلدریج (ایالات متحده آمریکا) و متانول، سدیم سولفات و اسید کلریدریک از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند. در تمامی آزمایشات از آب دیونایز استفاده شد.

استخراج اسانس گیاه ریحان به روش ترکیبی فراصوت میکروویو

روش انتخابی در مطالعه‌ی حاضر روش ترکیبی فراصوت-میکروویو است. در این روش ابتدا گیاه تحت تشعشعات فراصوت در مدت‌زمان مشخصی قرار گرفت. این مرحله نقش پیش‌تیمار در فرآیند استخراج را ایفا می‌کند. سپس فرآیند اسانس‌گیری در دستگاه میکروویو مجهز به کلونجر انجام شد. گیاه با استفاده از پنکه در سایه و در دمای اتاق خشک گردید. سپس ۱۰ گرم برگ خشک گیاه به نسبت ۱ به ۱۰ (گرم به میلی‌لیتر) در آب دیونایز به‌عنوان حلال خیسانده شد. این ترکیب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد تا محلول یکنواخت گردد. سپس محلول حاصله در هموژنایزر اولتراسونیک آزمایشگاهی ۴۰۰ وات از شرکت توسعه فناوری مافوق صوت (Topsonic, UHP-400, Iran) قرار داده شد. هموژنایزر مورد استفاده مجهز به سر با قطر ۱۲ میلی‌متر با فرکانس تولیدی 1 ± 20 کیلوهرتز است. بیشترین توان تولیدی آن ۴۰۰ وات بوده و قابلیت تغییر

است بازده استخراج اسانس می‌باشد. برای محاسبه‌ی بازده مربوط به هر آزمایش از فرمول زیر استفاده شد:

$$R = \frac{M_e}{M_p} \times 100 \quad (\text{رابطه ۱})$$

که در آن M_e ، وزن اسانس حاصله، M_p وزن گیاه خشک قبل از استخراج و R بازده استخراج است.

مایکروویو (X2) و زمان استخراج مایکروویو (X3) می‌باشند. توان فراصوت بین ۱۵۰ تا ۳۵۰ وات، توان مایکروویو در بازه‌ی ۳۰۰ تا ۶۰۰ وات و همچنین مدت‌زمان مایکروویو بین ۲۰ تا ۴۰ دقیقه در نظر گرفته شد (جدول ۱). طراحی آزمایش مذکور شامل ۲۰ آزمایش و ۶ نقطه‌ی مرکزی است. مهم‌ترین پارامتر در آزمایشات حاضر که به‌عنوان پاسخ در نظر گرفته شده

جدول ۱- سطوح متغیرهای مستقل به‌کاررفته در طرح مرکب مرکزی

Table 1. Levels of independent variables used in the central composite design

سطوح متغیر					نماد ریاضی		متغیر مستقل
-۱/۶۸	-۱	۰	۱	۱/۶۸	واقعی	کد شده	
۱۰۰	۱۵۰	۲۲۵	۳۰۰	۳۵۰	X_1	x_1	توان فراصوت (وات)
۲۰۰	۳۰۰	۴۵۰	۶۰۰	۷۰۰	X_2	x_2	توان مایکروویو (وات)
۱۳	۲۰	۳۰	۴۰	۴۶	X_3	x_3	زمان استخراج (دقیقه)

۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS بود. هلیوم به‌عنوان گاز حامل با جریان ثابت ۰/۸ میلی‌لیتر بر دقیقه، حجم تزریقی ۱ میکرولیتر و دمای تزریق ۲۹۰ درجه سلسیوس مورد استفاده قرار گرفت. برنامه‌ی دمایی ستون به این نحو تنظیم گردید که دمای منبع یون ۲۸۰ درجه سلسیوس، دمای آون از ۵۰ درجه سلسیوس (به مدت ۵ دقیقه ایزوترمال)، با افزایش ۳ درجه سلسیوس در دقیقه، به ۲۴۰ درجه سلسیوس و با افزایش ۱۵ درجه سلسیوس در دقیقه، به ۲۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه برنامه‌ریزی شد. کل زمان اجرای GC، ۷۵ دقیقه بود. طیف نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5975 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سلسیوس بود. شناسایی ترکیبات اسانس بر پایه‌ی مقایسه‌ی زمان بازداری و طیف‌های جرمی آن‌ها با اطلاعات منتشر شده و مطابقت رایانه‌ای با کتابخانه وایلی (Wiley 7n) موسسه ملی استاندارد و فناوری (NIST5.0) انجام شد.

در آزمایشات حاضر بازده تجربی با استفاده از رگرسیون چندگانه متناسب با مدل چندجمله‌ای درجه دوم زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (\text{رابطه ۲})$$

که در آن Y پاسخ و $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$ ضرایب رگرسیون برای نقطه‌ی مرکزی هستند که به ترتیب ضریب ثابت و ضرایب خطی، درجه‌دو و برهمکنش را نمایش می‌دهند. x_i و x_j نشان‌دهنده‌ی متغیرهای مستقل کدگذاری شده هستند. در اینجا از تحلیل واریانس (ANOVA) برای بررسی تأثیر متغیرها استفاده شده است. علاوه بر آن دقت رابطه‌ی مدل شده در پیش‌بینی پاسخ بهینه با استفاده از نتایج آزمایش اعتبار سنجی شده است.

شناسایی ترکیبات موجود در محصول حاصل از استخراج به‌منظور شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس حاصله، از روش کروماتوگرافی گازی با شناساگر طیف‌سنج جرمی (GC-MS) استفاده شد. برای این منظور از دستگاه Agilent سری GC۷۸۹۰ مجهز به آشکارساز انتخابی انبوه (MSD)، سری ۵۹۷۵ ساخت آمریکا استفاده شد. ستون مورد استفاده به طول

اندازه‌گیری خواص آنتی‌اکسیدانی

آزمون تعیین خاصیت احیاکنندگی رادیکال DPPH برای بررسی فعالیت پاداکسندگی آزمون^۱ DPPH توسط اسپکتوفتومتر و در حضور DPPH به روش Hosu و همکاران (۲۰۱۴) با اندکی تغییرات انجام شد (Hosu et al., 2014). بر اساس این روش برای تهیه محلول استوک ۰/۰۹ میلی‌مولار از DPPH، مقدار ۱۷/۷ میلی‌گرم از DPPH توزین شد و پس از حل کردن در متانول، در بالن ژوژه ۵۰۰ میلی‌لیتری با متانول به حجم رسانده شد. محلول حاصله به رنگ بنفش تیره، برای جلوگیری از قرار گرفتن در معرض تابش نور، با فویل آلومینیومی پوشانده شد. در این مرحله از اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس، غلظت‌های (۰/۱۵، ۰/۴۵، ۰/۷۵ و ۰/۹۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از هر کدام از اسانس‌ها (بدست آمده به روش ترتیبی و مایکروویو) ساخته شد. سپس ۳ میکرولیتر از محلول DPPH به ۰/۲۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف تهیه‌شده از اسانس اضافه شد. جذب هر کدام از محلول‌ها پس از ۳۰ دقیقه در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. همچنین از محلول ۱ میلی‌لیتر استوک DPPH ساخته‌شده و ۴ میلی‌لیتر متانول به‌عنوان کنترل استفاده شد. نتایج آزمون DPPH بر پایه IC₅₀ بیان می‌شوند. این شاخص بیانگر غلظت مؤثر از نمونه است که ظرفیت مهار ۵۰٪ از DPPH را دارد و از طریق شیب خط منحنی محاسبه می‌شود. به‌منظور محاسبه درصد مهار DPPH از رابطه زیر استفاده شد.

$$I(\%) = 100 \times \left[\frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \right] \quad (\text{رابطه ۳})$$

که در آن $A_{control}$ میزان جذب نمونه‌ی کنترلی و A_{sample} میزان جذب نمونه‌ی موردنظر است.

آزمون احیاء آهن^۲

در این تحقیق از روشی که توسط Boudiaf et al., (2010) انجام شده است با اندکی تغییر استفاده شد

(Boudiaf et al., 2010). در این آزمایش، واکنشگر FRAP به‌صورت تازه از طریق مخلوط کردن ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول TPTZ (۱۰ میلی‌مولار در ۴۰ میلی‌مولار HCl) با ۲/۵ میلی‌لیتر از $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (۲۰ میلی‌مولار) و ۲۵ میلی‌لیتر از بافر استات با غلظت ۳۰۰ میلی‌مولار و $pH=3/6$ (۳/۱ گرم سدیم استات تری هیدرات به اضافه ۱۶ میلی‌لیتر گلاسیال استیک اسید با آب دیونایز به حجم ۱ لیتر رسانده شد) آماده شد. این واکنشگر همواره به‌صورت تازه تهیه شد. غلظت‌های متفاوت از اسانس تهیه گردید. ۹۰۰ میکرولیتر از واکنشگر FRAP تا دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم شد و با ۹۰ میکرولیتر از آب مقطر و ۳۰ میکرولیتر از هر نمونه مخلوط شد. و پس از هم زدن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از گذشت زمان میزان جذب نمونه در اسپکتروفتومتر در مقایسه با نمونه شاهد (واکنشگر FRAP بدون محلول اسانس) در طول موج ۵۹۳ نانومتر قرائت گردید. منحنی استاندارد با غلظت‌های مختلف سولفات آهن $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ترسیم گردید. نتایج بر اساس میکرومول هم‌ارز $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ در میلی‌گرم اسانس محاسبه و گزارش گردید.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

از تصاویر به‌دست‌آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM) ساخت شرکت TE-SCAN کشور جمهوری چک برای مطالعه ساختار سلولی نمونه‌های گیاهی استفاده شد. برگ گیاه ریحان قبل و بعد از اعمال فرایند استخراج ترکیبی و همچنین استخراج مایکروویو مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور هر کدام از نمونه‌ها با استفاده از یک لایه نازک از طلا پالادیوم در دمای اتاق قبل از تصویربرداری، به‌صورت نازک پوشیده شدند. سپس با بزرگنمایی ۲۰۰ هزار برابر عکس‌برداری انجام گرفت.

نتایج و بحث

بهبودسازی بازده استخراج اسانس با استفاده از روش سطح پاسخ

در این پژوهش تعیین شرایط بهینه‌ی عملیاتی برای رسیدن به بهترین بازده ماده‌ی مؤثره حاصل از استخراج گیاه ریحان توسط روش‌شناسی سطح پاسخ بر مبنای طرح مرکب مرکزی انجام شد. شماره هر آزمایش و مقدار

هر کدام از متغیرهای عملیاتی برای آن آزمایش به همراه نتایج آزمایشگاهی در جدول ۲ آورده شده است. همانطور که در جدول نشان داده شده است، بازده استخراج بین ۰/۷۱ تا ۲/۳ درصد (وزنی/وزنی) بسته به شرایط عملیاتی مربوط به هر آزمایش، متغیر است. همچنین به منظور بررسی میزان شایستگی مدل درجه دوم و تعیین اثر هر کدام از پارامترها بر روی بازده استخراج، آنالیز واریانس (ANOVA) بر روی داده‌ها انجام شد (جدول ۳).

جدول ۲- ماتریس طرح مرکب و نتایج به دست آمده از بازده استخراج در روش ترکیبی فراصوت-مایکروویو

Table 2. Composite design matrix and the results obtained from the extraction efficiency in the combined ultrasonic-microwave method

پاسخ	شماره آزمایش					
Y%	X ₃ (دقیقه)	x ₃	X ₂ (وات)	x ₂	X ₁ (وات)	x ₁
۱/۴	۳۰	۰	۴۵۰	۰	۲۲۵	۰
۰/۷۲	۲۰	-۱	۳۰۰	-۱	۳۰۰	۱
۲/۱۲	۴۰	۱	۶۰۰	۱	۱۵۰	-۱
۲/۲	۳۰	۰	۷۰۰	۱/۶۸	۲۲۵	۰
۰/۷۹	۱۳	-۱/۶۸	۴۵۰	۰	۲۲۵	۰
۲/۳	۴۰	۱	۶۰۰	۱	۳۰۰	۱
۱/۲	۴۰	۱	۳۰۰	-۱	۳۰۰	۱
۱/۶۲	۳۰	۰	۴۵۰	۰	۲۲۵	۰
۰/۸۱	۲۰	-۱	۳۰۰	-۱	۱۵۰	-۱
۱/۶۱	۳۰	۰	۴۵۰	۰	۲۲۵	۰
۱/۶۱	۳۰	۰	۴۵۰	۰	۲۲۵	۰
۱/۷	۴۶	۱/۶۸	۴۵۰	۰	۲۲۵	۰
۰/۹	۴۰	۱	۳۰۰	-۱	۱۵۰	-۱
۱/۹	۲۰	-۱	۶۰۰	۱	۳۰۰	۱
۱/۶۲	۳۰	۰	۴۵۰	۰	۲۲۵	۰
۱/۸	۳۰	۰	۴۵۰	۰	۳۵۰	۱/۶۸
۱/۳	۳۰	۰	۴۵۰	۰	۱۰۰	-۱/۶۸
۱/۶	۳۰	۰	۴۵۰	۰	۲۲۵	۰
۱/۵۴	۲۰	-۱	۶۰۰	۱	۱۵۰	-۱
۰/۷۱	۳۰	۰	۲۰۰	-۱/۶۸	۲۲۵	۰

x₁ = کد مربوط به توان فراصوت

X₁ = مقدار واقعی توان فراصوت (وات)

x₂ = کد مربوط به توان مایکروویو

X₂ = مقدار واقعی مربوط به توان مایکروویو (وات)

x₃ = کد مربوط به زمان استخراج

X₃ = مقدار واقعی مربوط به زمان استخراج (دقیقه)

Y = بازده استخراج (درصد وزنی/وزنی)

جدول ۳- نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) در برازش مدل مربوط به بازده استخراج در روش ترتیبی فراصوت-مایکروویو

Table 3. Results of analysis of variance (ANOVA) in fitting the model related to extraction efficiency in the sequential ultrasonic-microwave method

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش p
مدل	۴/۴۵	۹	**۰/۴۹	۳۷/۴۲	< ۰/۰۰۰۱
X ₁ -توان فراصوت	۰/۱۸	۱	**۰/۱۸	۱۳/۸۳	۰/۰۰۴۰
X ₂ -توان مایکروویو	۳/۳۳	۱	**۳/۳۳	۲۵۲/۵۲	< ۰/۰۰۰۱
X ₃ -زمان مایکروویو	۰/۶۷	۱	**۰/۶۷	۵۰/۶۲	< ۰/۰۰۰۱
X ₁ X ₂	۰/۰۱۳	۱	۰/۰۱۳	۰/۹۷	۰/۳۵
X ₁ X ₃	۰/۰۰۵	۱	۰/۰۰۵	۰/۳۸	۰/۵۵
X ₂ X ₃	۰/۰۲۲	۱	۰/۰۲۲	۱/۶۷	۰/۲۳
X ₁ ²	۰/۰۰۰۱	۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۹	۰/۹۳
X ₂ ²	۰/۰۱۹	۱	۰/۰۱۹	۱/۴۶	۰/۲۵
X ₃ ²	۰/۱۷	۱	**۰/۱۷	۱۲/۹۷	۰/۰۰۵
باقی مانده	۰/۱۳	۱۰	۰/۰۱۳		
عدم برازش	۰/۰۹۴	۵	^{ns} ۰/۰۱۹	۲/۵۰	۰/۱۷
خطای خالص	۰/۰۳۸	۵	۰/۰۰۷		
کل	۴/۵۸	۱۹			
	<i>p</i> < ۰/۰۵ معنادار در	<i>p</i> < ۰/۰۱ معنادار در	**غیر معنادار		

تغییرات (C.V.) بررسی شد. ضریب تغییرات (C.V.) شاخصی است که برای اندازه‌گیری توزیع پراکندگی داده‌های آماری به کار می‌رود. ضریب تغییرات برای این تحقیق ۷/۸۰ درصد گزارش شد. با توجه به تجزیه و تحلیل داده‌ها ضرایب هم‌بستگی مدل $R^2 = ۰/۹۷۱۲$ و $R^2_{adjusted} = ۰/۹۴۵۲$ به دست آمد. نزدیک شدن ضریب تعیین به عدد یک به معنی انطباق مدل تجربی با داده‌های واقعی است (Bimakr et al., 2012).

به منظور بهینه‌سازی آزمایش‌ها با توجه به مدل به دست آمده از تجزیه و تحلیل نتایج ۲۰ آزمایش پیشنهاد شده برای فرایند استخراج توسط نرم‌افزار مورد مطالعه، چندین شرایط بهینه برای فرایند استخراج به دست آمد. در جدول ۴ شرایط بهینه پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار ارائه شده است.

به منظور بررسی و راستی آزمایی مدل انتخاب شده توسط نرم‌افزار، مقادیر تجربی بازده استخراج اسانس با مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل مقایسه شد. با توجه به شکل ۱ می‌توان دریافت که بین نتایج تجربی به دست آمده و مقادیر پیش‌بینی شده از نظر آماری هم‌بستگی بالایی وجود دارد.

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که مقدار F مدل برای تمامی متغیرها معنادار بوده و شانس آنکه این مقدار F بالا ناشی از اختلالات باشد کمتر از ۱ صدم درصد است. مقدار عدم برازش ۲/۵۰ نشان می‌دهد که این عدم برازش نسبت به خطاهای خالص قابل توجه نیست. این معنادار نبودن عدم برازش مطلوب بوده و تأییدکننده‌ی آن است که مدل ارائه شده برای پیش‌بینی پاسخ مناسب است.

معادله ۴، مدل درجه دوم حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده است که به منظور پیش‌بینی میزان بازده استخراج ترکیبات مؤثره از گیاه ریحان توسط روش ترکیبی فراصوت-مایکروویو به عنوان تابعی از سه متغیر مستقل توان امواج فراصوت، توان امواج مایکروویو، و زمان استخراج ارائه شده است. بزرگی ضرایب متغیرها در این رابطه چندجمله‌ای صرف‌نظر از مثبت یا منفی بودنشان بیانگر اهمیت ضرایب مربوطه در تغییرات پاسخ است.

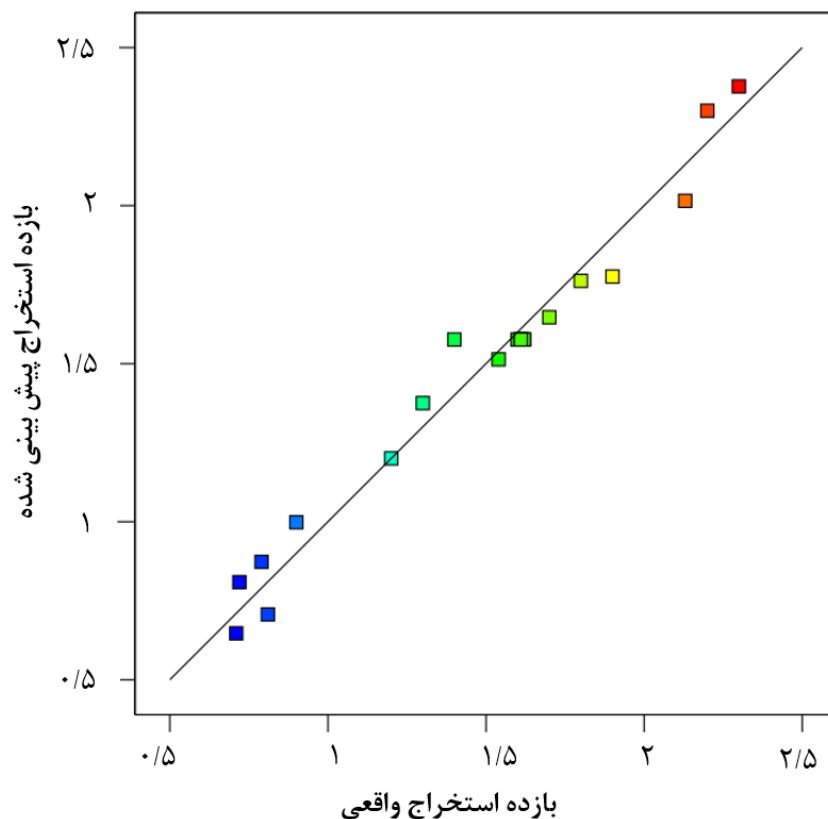
$$Y = +1.58 + 0.1161X_1 + 0.4960X_2 + 0.2233X_3 - 0.1121X_1^2 \quad (\text{رابطه ۴})$$

کیفیت روش برازش با استفاده از ضریب تعیین (R^2) تنظیم و پیش‌بینی شده، دقت کافی و ضریب

جدول ۴- شرایط بهینه در روش ترتیبی

Table 4. Optimal conditions in sequential method

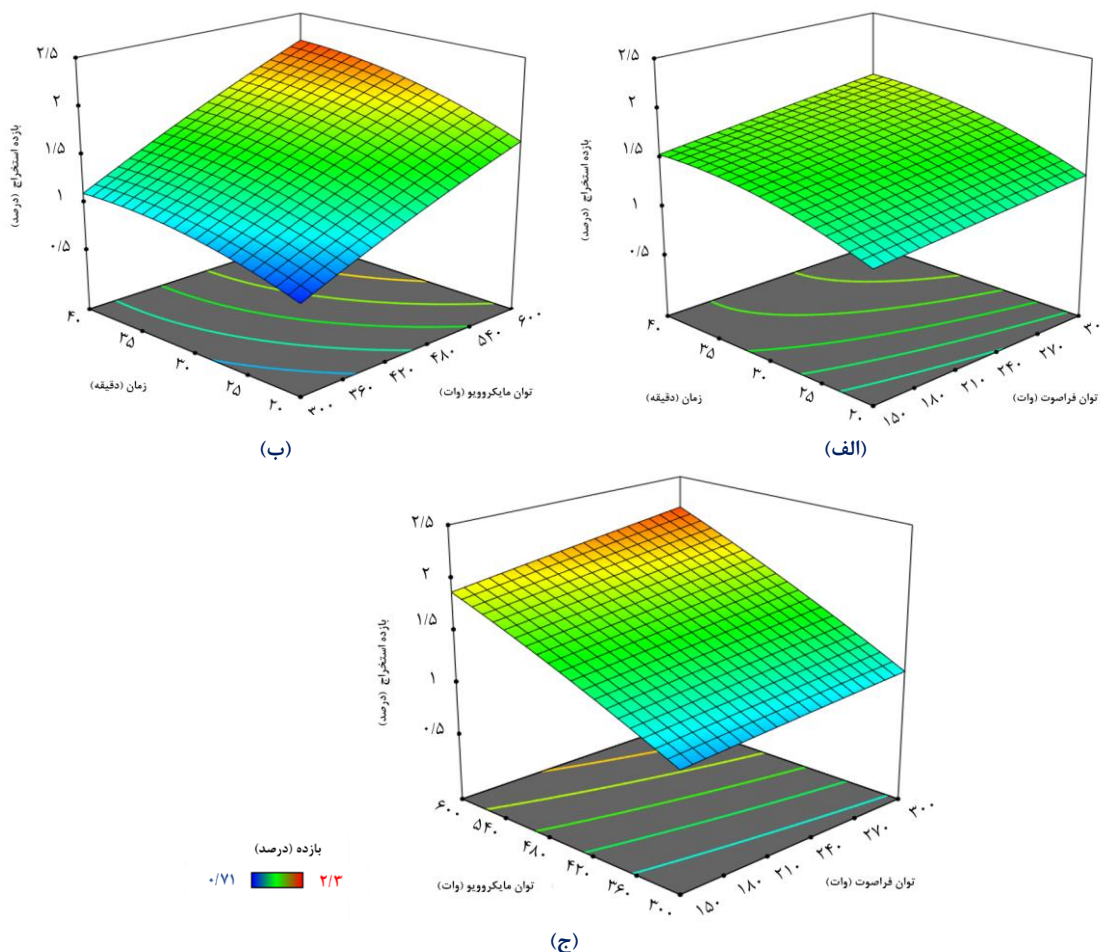
بازده (درصد)	زمان (دقیقه)	توان مایکروویو (وات)	توان فراصوت (وات)	پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار
۲/۳۷	۴۰	۶۰۰	۳۰۰	آزمایشگاهی
۲/۳	۴۰	۶۰۰	۳۰۰	



شکل ۱- نتایج اعتبارسنجی مدل پیشنهادی به منظور پیش‌بینی میزان بازده استخراج
Figure 1. Validation results of the proposed model in order to predict the extraction efficiency

از طرفی توان مایکروویو بیشترین تأثیر را بر روی میزان بازده استخراج داشته است. انرژی مایکروویو اثر مستقیمی بر روی مواد گیاهی محلول در آب به‌عنوان یک حلال قطبی دارد بنابراین با افزایش توان مایکروویو تا سطح مشخصی بازده استخراج افزایش می‌یابد. مشابه این نتیجه را می‌توان در تحقیقاتی که بر روی استخراج مواد مؤثره از دانه‌های گیاهان Bark و Annatto با استفاده از این روش انجام شده است، مشاهده کرد (Bachtler & Bart, 2021). همچنین این نتیجه برای استخراج اسانس از فلفل نیز به‌دست آمد (Tran et al., 2020).

همان‌طور که شکل ۲ و نتایج مدل‌سازی ارائه‌شده نشان می‌دهند، می‌توان گفت که توان فراصوت، توان مایکروویو و زمان استخراج مایکروویو تأثیر مستقیمی بر روی بازده استخراج دارند. در پژوهش حاضر مدت زمان اعمال این امواج ثابت در نظر گرفته شد و در نتیجه تنها اثر توان امواج فراصوت مورد بررسی قرار گرفته است. همان‌طور که از تجزیه و تحلیل نتایج نیز پیداست با افزایش توان امواج فراصوت میزان بازده استخراج افزایش می‌یابد. هرچند این تغییر در مقایسه با اثر توان مایکروویو بسیار کم است ولی در ترکیب با تأثیر مایکروویو میزان تأثیرگذاری آن مشهودتر می‌شود.



شکل ۲- نمودارهای سطح پاسخ برای تأثیر متغیرهای مستقل بر عملکرد استخراج (الف) تأثیر توان فراصوت و زمان استخراج بر بازده استخراج (ب) تأثیر توان مایکروویو و زمان استخراج (ج) تأثیر توان فراصوت و توان مایکروویو بر بازده استخراج

Figure 2. Response level diagrams for the effect of independent variables on extraction performance; A) Effect of ultrasound power and extraction time on extraction efficiency; B) Effect of microwave power and extraction time on extraction efficiency; C) Effect of ultrasound power and microwave power on extraction efficiency

کاهش می‌دهد. این زمان در روش استخراج مایکروویو مدت زمانی در نظر گرفته شد که پس از آن استخراج اسانس مشاهده نشد که معادل ۵۵ دقیقه بود و به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای بیشتر از زمان بهینه در روش ترکیبی (۴۰ دقیقه) است. این اختلاف به دلیل اعمال امواج فراصوت و پدیده‌ی کاویتاسیون است که در روش ترکیبی باعث افزایش انتقال جرم شده است. به عبارتی در روش ترکیبی اثرات هم‌افزایی فراصوت و مایکروویو بر دیواره سلولی گیاه موجب بهبود عملکرد استخراج در زمان کوتاه‌تر شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که روش ترکیبی حاضر می‌تواند یک روش استخراج مناسب برای استخراج از گیاه ریحان باشد چراکه حداکثر عملکرد استخراج را در کوتاه‌ترین زمان استخراج نسبت به استخراج به روش مایکروویو فراهم می‌کند. در تحقیق

مقایسه بازده استخراج به روش ترکیبی و مایکروویو همان‌طور که از نتایج ارائه‌شده در جدول ۲ مشخص است، در روش ترکیبی در آزمایش شماره ۶ بیشترین بازده استخراج حاصل شد. بر همین اساس و به‌منظور مقایسه‌ی عملکرد روش پیشنهادی، استخراج به روش مایکروویو در شرایط آزمایش شماره ۶ یعنی توان مایکروویو ۶۰۰ وات انجام شد. هدف از این کار یکسان‌سازی تقریبی شرایط برای هر دو روش استخراج به‌منظور ایجاد امکان مقایسه بین آن‌ها بوده است. میزان بازده در این شرایط برای استخراج به روش مایکروویو و بدون اعمال امواج فراصوت ۰/۷۴ درصد به دست آمد که نشان‌دهنده‌ی تأثیر مستقیم و مثبت پیش تیمار فراصوت می‌باشد. علاوه بر آن نتایج نشان داد که استفاده از روش فراصوت زمان بهینه‌ی استخراج را نیز به‌شدت

دیگری نیز که اثر پیش تیمار فراصوت بر استخراج اسانس از گیاه دارویی جاشیر بررسی شد، نتایج نشان داد که این تکنیک می‌تواند باعث کاهش زمان استخراج، حفظ ترکیبات شیمیایی مورد نظر و همچنین حفظ خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه شود (Damyeh et al., 2016). نتایج تحقیق حاضر همچنین با نتایجی که از پیش تیمار فراصوت در استخراج اسانس از پوست لیمو با استفاده از روش مایکروویو صورت گرفت، هم‌خوانی دارد. نتایج این تحقیق نشان داد که پیش تیمار فراصوت تا حد زیادی موجب افزایش بازدهی شده است (Arafat et al., 2020).

بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس

اسانس‌های حاصل از استخراج به دو روش ترکیبی و مایکروویو به‌وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی-

طیف‌سنجی جرمی مورد ارزیابی قرار گرفتند. همان‌طور که در جدول ۵ مشخص است نتایج نشان داد که فراوان-ترین ترکیبات موجود در اسانس حاصل از روش مایکروویو دو دکا متیل پنتاسیلوکسان (۴۲٪/۲۱)، بنزوئیک اسید ۵و۲-بیس تری متیل سیللیکس (۲۲/۵۴)٪ و دو دکا متیل سیکلو هگزاسیلوکسان (۱۸٪/۳۵) هستند. این ترکیبات برای روش ترکیبی نیز به ترتیب فراوانی شامل دو دکا متیل سیکلو هگزاسیلوکسان (۳۸٪/۸۱)، بنزوئیک اسید ۵و۲-بیس تری متیل سیللیکس (۱۵٪/۷۵) و استراگول (۶/۷۲)٪ می‌شوند. نکته قابل‌ملاحظه در این نتایج تعداد ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس حاصل از روش ترکیبی (۱۹ ترکیب شیمیایی) است که در مقایسه با تعداد این ترکیبات در روش مایکروویو (۷ ترکیب شیمیایی) بسیار بیشتر است.

جدول ۵: مقایسه ترکیبات موجود در اسانس ریحان استخراج شده به دو روش ترتیبی و مایکروویو

Table 5. Comparison of compounds in basil essential oil extracted by two methods: sequential and microwave

ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)	
	روش ترتیبی	سطح %
استراگول	۲۲/۸	۶/۷۲
آلفا-سیترال	۲۶/۱۵	-
دو دکا متیل سیکلو هگزاسیلوکسان	۲۸/۶۵	۳۸/۸۱
بنزوئیک اسید ۵و۲-بیس تری متیل سیللیکس	۴۲/۲۳	۱۵/۷۵
تتراکاسا متیل-سیکلو دو دکا سیلوکسان	۴۷/۸۴	۶/۲۱
دو دکا متیل پنتاسیلوکسان	۵۲/۸۵	۳/۷۹
هکسامتیل سیکلو تری سیلوکسان	۵۲/۹۹	۳/۳۳
ان و ان پریم-دیزل ۲-متیل-ز و ز-۳و۳-اوکتادکانول	۵۵/۷۹	۲/۳۹
ز و ز-۱۶و۵-اوکتادکادین-۱-اول استات	۵۶/۰۱	۱/۳۹
ان و ان پریم-دیسالی سیلیدن-۱و۲-دی امینو پروپان	۵۶/۶۰	۱/۴۸
ترنس-۳و۲-متیل اندونکسی-ب-متیل ب-نیترو ستیرن	۵۷/۴۴	۱/۸۹
۱۲و۹-اوکتادکادینوئیک اسید و متیل استر	۵۷/۹۹	۶/۳۴
لینولیک اسید اتیل استر	۵۸/۰۵	۰/۹۸
سیکلواکتان ۳-اتنیل	۵۸/۱۲	۳/۰۷
سیکلو هپتون اکسیم	۵۸/۲۳	۰/۹۳
۴-سیکلو هپتن-۱-یک و اکسیم	۵۸/۳۹	۱/۳۴
۲-میرستینوئیل-گلیسینامید	۶۶/۷۶	۱/۱۹
ان و ان پریم-بیس(سالیسیلیدن)-۱و۲-دی امینو پروپان	۶۶/۸۷	۱/۸۶
۲-اتیل اکریلین	۶۶/۹۶	۱/۳۴
ان-سیانو-ان پریم و ان دبل پریم و ان دبل پریم-ترامتیل-۱و۳و۳-تری ازیترامین	۶۷/۵۳	۱/۰۵
ان-اتیل-۱و۳-دیدیتیبوسوین دولین	۶۸/۰۲	-
جمع درصد ترکیبات	۹۹/۸۵	۹۹/۸۶

Politeo et al., 2007). همچنین تفاوت در خاصیت آنتی-اکسیدانی برای گونه‌های ریحان نیز می‌تواند به میزان نوع ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس به دست آمده بستگی داشته باشد (Li et al., 2017).

روش FRAP

در بررسی نمونه‌های اسانس حاصل از گیاه ریحان از روش FRAP که به دو روش ترکیبی و میکروویو استخراج شده بودند، شاخص این روش برای نمونه‌ها محاسبه و گزارش شد. این میزان برای اسانس حاصل از روش استخراج ترکیبی و میکروویو به ترتیب ۰/۲۲ و ۰/۱۴ میکرومول فرو بر گرم به دست آمد. با توجه به مقادیر گزارش شده، می‌توان گفت که در روش ترکیبی اسانس حاصله دارای شاخص آنتی‌اکسیدانی بالاتری است. در تحقیقات متعددی نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس ریحان با استفاده از روش FRAP مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن‌ها نشان داد که این اسانس دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. همچنین می‌توان به وجود ترکیب شیمیایی استراگول که در آنالیز شیمیایی اسانس‌های حاصله حضور داشته است به عنوان عامل ایجاد خاصیت آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد (da Silva Gündel et al., 2018; Lee et al., 2005; Politeo et al., 2007).

بررسی تأثیر روش استخراج بر ریزساختار گیاه ریحان در شکل ۳ قسمت الف میکروگرافی از ریزساختار برگ-های ریحان قبل از اعمال فرایند استخراج را نشان می‌دهد، که می‌توان با ساختار برگ‌های این گیاه پس از اعمال استخراج به روش‌های ترکیبی و میکروویو مقایسه کرد. با توجه به شکل‌ها می‌توان دریافت که هرکدام از دو روش استخراج مورد استفاده، منجر به تغییرات فیزیکی در ریزساختار موجود در این گیاه شده است. در قسمت ب ساختار گیاه پس از استخراج به روش میکروویو را نشان می‌دهد. همان‌طور که از تصاویر پیداست سلول پس از اعمال امواج میکروویو نسبت به قبل تخریب شده، اما هنوز یکپارچگی آن حفظ شده

در پژوهش‌های دیگری که بر روی ریحان صورت گرفته‌اند ترکیبات دیگری نسبت به پژوهش حاضر به دست آمدند. در پژوهشی بر روی ریحان صربستانی صورت گرفت بیشترین ترکیب شیمیایی لینالول و متیل-کاویکول بودند (Stanojevic et al., 2019). در تحقیقی روی ۷ گونه ریحان ترکیبات شیمیایی آن‌ها تعیین شد. این پژوهش نیز با نتایج متفاوت برای هرگونه نشان داد که گونه گیاه و عوامل فصلی در تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس ریحان به‌طور مستقیم تأثیر زیادی دارند (Muráriková et al., 2017). با توجه به گزارش‌های دیگری که بر روی گونه‌های ریحان از سراسر جهان صورت گرفت، ترکیبات متفاوتی به عنوان ترکیبات اصلی مشاهده شد و همچنین ترکیبات مشترک با این مطالعه وجود داشته است (Li et al., 2017; Tran et al., 2018).

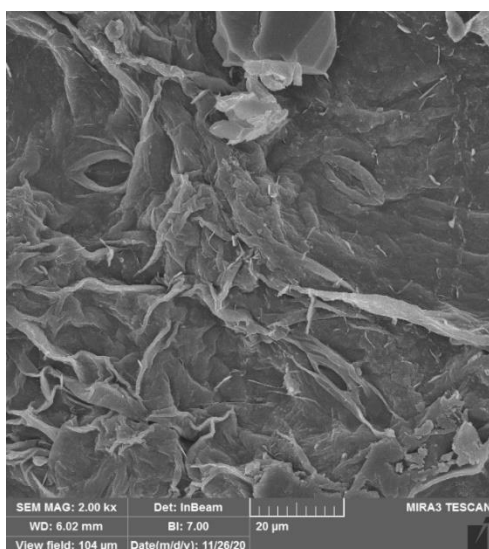
بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس

روش DPPH

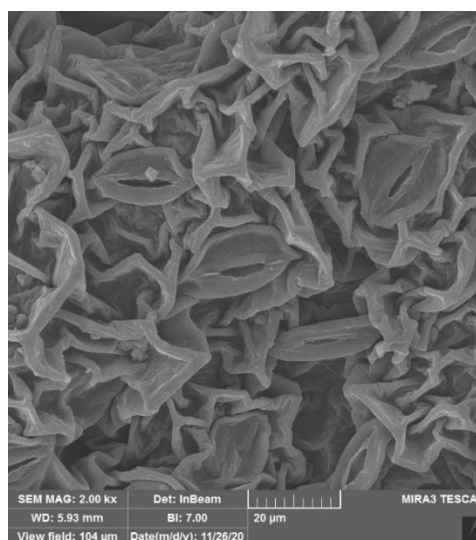
خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس گیاه ریحان با مهار و به دام انداختن رادیکال‌های DPPH و مقایسه با اسکوربیک اسید مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش فاکتور IC50 از آزمایش‌ها به دست آمد که این شاخص نسبت معکوسی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس دارد. این فاکتور به ترتیب برای اسانس حاصل از روش ترکیبی و میکروویو ۱/۰۴ و ۱/۲۲ به دست آمد که در مقایسه با مقدار ۹/۳۵ برای اسکوربیک اسید مقادیر کمتری داشته و در نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی خوبی از خود نشان دادند. همچنین با مقایسه این شاخص برای اسانس‌های حاصل از روش‌های متفاوت می‌توان دریافت که خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانسی که از روش ترکیبی به دست آمده نسبت به روش میکروویو برتری دارد. تحقیقات صورت گرفته بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس ریحان از این روش در مطالعات دیگر نیز نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای این گیاه است (Li et al., 2017;)

سلول و آزادسازی مقادیر بیشتر مواد مؤثره شده است. در مقایسه با نمونه مایکروویو، تخریب کامل غدد در روش ترکیبی بارز است. همان‌طور که در شکل مشخص شده است، در نمونه استخراج فراصوت و مایکروویو، تخریب کامل غدد رخ داده است.

است. در مورد استخراج به روش ترکیبی در قسمت ج تخریب قابل توجهی را همراه با پخش‌شدگی برخی مواد سلولی مشاهده می‌کنیم. این امر حاکی از آن است که اثر تخریب توسط امواج فراصوت نیز به همراه امواج مایکروویو در روش استخراج ترکیبی باعث تخریب بیشتر



ب



الف



ج

شکل ۳- میکرو گراف‌های الکترونی روبشی از برگه‌ای گیاه ریحان الف) قبل از انجام فرایند ب) پس از انجام فرایند استخراج مایکروویو ج) پس از انجام فرایند استخراج ترکیبی

Figure 3. Scanning electron micrographs of basil leaves; A) Before the process; B) After the microwave extraction process; C) After the combined extraction process

فراوان آن‌ها در صنایع یک امر مهم است. در این تحقیق تاثیر پارامترهای عملیات در فرایند استخراج به روش ترتیبی فراصوت مایکروویو مورد بررسی قرار گرفتند. با

نتیجه‌گیری کلی

ضرورت استفاده از روش‌های نوین برای به‌دست آوردن اسانس باکیفیت‌تر از گیاهان دارویی به دلیل استفاده

ترتیبی به صورت چشم‌گیری نسبت به روش مایکروویو افزایش می‌یابد. به طور کلی با توجه به نتایجی که از این تحقیق و تحقیقات مشابه با استفاده از روش ترتیبی فراصوت-مایکروویو حاصل شده است، می‌توان این روش را یکی از روش‌های کارآمد در زمینه استخراج اسانس از گیاهان دارویی دانست. هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

توجه به نتایج حاصل از این تحقیق برای گیاه دارویی ریحان می‌توان نتیجه گرفت که در روش ترکیبی فراصوت-مایکروویو اسانس باکیفیت بهتری از نظر ترکیبات شیمیایی در مقایسه با روش مایکروویو حاصل می‌شود. همچنین حفظ خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس در روش استخراج ترکیبی بیشتر از روش مایکروویو بوده است. علاوه بر این، بازده استخراج اسانس در روش

REFERENCES

- Ahmed, A. F., Attia, F. A., Liu, Z., Li, C., Wei, J., & Kang, W. (2019). Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. *Food Science Human Wellness*, 8(3), 299-305.
- Al Abbasy, D. W., Pathare, N., Al-Sabahi, J. N., & Khan, S. A. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil isolated from Omani basil (*Ocimum basilicum* Linn.). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(8), 645-649.
- Arafat, Y., Altemimi, A., Ibrahim, S. A., & Badwaik, L. S. (2020). Valorization of Sweet Lime Peel for the Extraction of Essential Oil by Solvent Free Microwave Extraction Enhanced with Ultrasound Pretreatment. *Molecules*, 25(18), 4072.
- Avetisyan, A., Markosian, A., Petrosyan, M., Sahakyan, N., Babayan, A., Aloyan, S., & Trchounian, A. (2017). Chemical composition and some biological activities of the essential oils from basil *Ocimum* different cultivars. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1-8.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., . . . Omar, A. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436.
- Bachtler, S., & Bart, H.-J. (2021). Increase the yield of bioactive compounds from elder bark and annatto seeds using ultrasound and microwave assisted extraction technologies. *Food Bioproducts Processing*, 125, 1-13.
- Bimakr, M., Rahman, R. A., Taip, F. S., Adzahan, N. M., Sarker, M., Islam, Z., & Ganjloo, A. (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction of crude oil from winter melon (*Benincasa hispida*) seed using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity, total phenolic content and fatty acid composition. *Molecules*, 17(10), 11748-11762.
- Boudiaf, K., Houcher, Z., Sobhi, W., & Benboubetra, M. (2010). Evaluation of antioxidant and anti-xanthine oxidoreductase activities of *Nigella sativa* Linn seeds' extracts. *Journal of Applied Biological Sciences*, 4(1), 7-16.
- Chan, C.-H., Yusoff, R., Ngoh, G.-C., & Kung, F. W.-L. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6213-6225.
- Chen, F., Liu, S., Zhao, Z., Gao, W., Ma, Y., Wang, X., . . . Luo, D. (2020). Ultrasound pre-treatment combined with microwave-assisted hydrodistillation of essential oils from *Perilla frutescens* (L.) Britt. leaves and its chemical composition and biological activity. *Industrial Crops Products*, 143, 111908.
- Croteau, R., Kutchan, T., & Lewis, N. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry Molecular Biology of Plants American Society of Plant Biologists*, 1250-1318.
- da Silva Gündel, S., Velho, M. C., Diefenthaler, M. K., Favarin, F. R., Copetti, P. M., de Oliveira Fogaça, A., . . . Sagrillo, M. R. (2018). Basil oil-nanoemulsions: Development, cytotoxicity and evaluation of antioxidant and antimicrobial potential. *Journal of Drug Delivery Science Technology*, 46, 378-383.
- Damyeh, M. S., Niakousari, M., & Saharkhiz, M. J. (2016). Ultrasound pretreatment impact on Prangos ferulacea Lindl. and *Satureja macrosiphonia* Bornm. essential oil extraction and comparing their physicochemical and biological properties. *Industrial Crops Products*, 87, 105-115.
- Dar, R. A., Shah Nawaz, M., & Qazi, P. H. (2017). General overview of medicinal plants: A review. *The Journal of Phytopharmacology*, 6(6), 349-351.
- Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., & Guo, Z. (1985). Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*, 63(6), 965-981.
- Gezici, S., & Şekeroğlu, N. (2019). Current perspectives in the application of medicinal plants against cancer: novel therapeutic agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 19(1), 101-111.
- Gupta, A., Naranawal, M., & Kothari, V. (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International Journal of Applied and Natural Sciences*, 1(1), 8-26.
- Hanif, M. A., Al-Maskari, M. Y., Al-Maskari, A., Al-Shukaili, A., Al-Maskari, A. Y., & Al-Sabahi, J. N. (2011). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of unexplored Omani basil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(5), 751-757.
- Hosu, A., Cristea, V.-M., & Cimpoi, C. (2014). Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content

- in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. *Food Chemistry*, 150, 113-118.
- Karimi, S., Sharifzadeh, S., & Abbasi, H. (2020). Sequential ultrasound-microwave assisted extraction as a green method to extract essential oil from *Zataria multiflora*. *Journal of Food Bioprocess Engineering*.
- Lee, S.-J., Umano, K., Shibamoto, T., & Lee, K.-G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91(1), 131-137.
- Li, H., Ge, Y., Luo, Z., Zhou, Y., Zhang, X., Zhang, J., & Fu, Q. (2017). Evaluation of the chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of distillate and residue fractions of sweet basil essential oil. *Journal of Food Science and Technology*, 54(7), 1882-1890.
- Lu, X., Zheng, Z., Li, H., Cao, R., Zheng, Y., Yu, H., . . . Zheng, B. (2017). Optimization of ultrasonic-microwave assisted extraction of oligosaccharides from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) seeds. *Industrial Crops Products*, 107, 546-557.
- Muráriková, A., Ťažký, A., Neugebauerová, J., Planková, A., Jampílek, J., Mučaji, P., & Mikuš, P. (2017). Characterization of essential oil composition in different basil species and pot cultures by a GC-MS method. *Molecules*, 22(7), 1221.
- Nazarian-Samani, Z., Sewell, R. D., Lorigooini, Z., & Rafieian-Kopaei, M. (2018). Medicinal plants with multiple effects on diabetes mellitus and its complications: A systematic review. *Current diabetes reports*, 18(10), 1-13.
- Ollanketo, M., Peltoketo, A., Hartonen, K., Hiltunen, R., & Riekkola, M.-L. (2002). Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts. *European Food Research Technology*, 215(2), 158-163.
- Politeo, O., Jukic, M., & Milos, M. (2007). Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food chemistry*, 101(1), 379-385.
- Simon, J. E., Morales, M. R., Phippen, W. B., Vieira, R. F., & Hao, Z. (1999). Basil: a source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. *Perspectives on new crops new uses*, 16, 499-505.
- Singh, S., Singh, S. K., & Yadav, A. (2013). A review on Cassia species: Pharmacological, traditional and medicinal aspects in various countries. *American Journal of Phytomedicine Clinical Therapeutics*, 1(3), 291-312.
- Stanojevic, L. P., Stanojevic, J. S., Savic, V. L., Cvetkovic, D. J., Kolarevic, A., Marjanovic-Balaban, Z., & Nikolic, L. B. (2019). Peppermint and basil essential oils: chemical composition, in vitro antioxidant activity and in vivo estimation of skin irritation. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22(4), 979-993.
- Tran, T., Ngo, T., Dao, T., Nguyen, P., Pham, T., Le, X., . . . Linh, H. (2020). Effect of microwaves energy on volatile compounds in Pepper (*Piper nigrum* L.) leaves essential oil. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 736(3), 032013.
- Tran, T. H., Nguyen, H. H. H., Nguyen, D. C., Nguyen, T. Q., Tan, H., Nhan, L. T. H., . . . Nguyen, T. D. (2018). Optimization of microwave-assisted extraction of essential oil from vietnamese basil (*Ocimum basilicum* L.) using response surface methodology. *Processes*, 6(11), 206.
- Wen, L., Zhang, Z., Sun, D.-W., Sivagnanam, S. P., & Tiwari, B. K. (2020). Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 60(11), 1826-1841.
- Zhan, Y., An, X., Wang, S., Sun, M., & Zhou, H. (2020). Basil polysaccharides: A review on extraction, bioactivities and pharmacological applications. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 28(1), 115179.