

Enhancing the extraction yield of bioactive compounds from *Mentha mozaffarianii* Jamzad under ultrasound pre-treatment

Pages
87-106

S. Mohtashami*

Department of Horticultural Science, Jahrom University, Jahrom, Iran.

*Corresponding author: s.mohtashami@jahromu.ac.ir

Received date: 2024.03.18

Accepted date: 2024.06.12

Abstract

Bioactive compounds have led to a continuous increase in demand due to their potential benefits for human health. Traditional extraction methods have disadvantages including low extraction efficiency and use of significant amounts of solvents. Ultrasound-assisted extraction is recognized as an environmentally friendly and highly efficient extraction technology that has the potential to minimize the need for organic solvents and significantly increase the production of target bioactive components. For this reason, in this study, to investigate the effect of ultrasound pretreatment on the extraction of active substances from *Mentha mozaffarianii* Jamzad, which is one of the important and endemic plants of Iran, a factorial experiment was conducted based on a completely randomized design with three replications. The first factor included the duration of ultrasound pretreatment at three levels (0, 10 and 20 minutes) and the second factor was type of sample (dry sample without solvent and with solvent). The traits measured in this study included flavones and flavonols, total flavonoids, total carbohydrates, tannin content, total phenolic compounds and antioxidant activity. The results of this study showed positive effect of ultrasound on extraction of active substances of *Mentha mozaffarianii*; so that applying ultrasound for 20 minutes and using a solvent on the plant samples during ultrasound had a positive and significant effect on increasing the extraction efficiency for all active substances measured in *Mentha mozaffarianii*.

Keywords: Endemic plants, Narrow-leaf mint, Phenol, Solvent and Ultrasound.

افزایش میزان استخراج مواد موثره گیاه دارویی پونه کوهی (*Mentha mozaffarianii* Jamzad) تحت

تأثیر پیش‌تیمار فراصوت

شماره صفحات

۸۷-۱۰۶

سعیده محتشمی*

گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم، ایران.

* نویسنده مسئول: s.mohtashami@jahromu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۲۸

چکیده

ترکیبات زیست‌فعال به دلیل فواید بالقوه‌ای که برای سلامتی انسان دارند منجر به افزایش مستمر تقاضا برای این ترکیبات شده است. روش‌های استخراج سنتی دارای معایبی از جمله راندمان استخراج پایین و استفاده از مقادیر قابل توجهی از حلال‌ها هستند. استخراج با کمک امواج فراصوت به عنوان یک فناوری استخراج سازگار با محیط‌زیست و بسیار کارآمد شناخته شده است که این پتانسیل را دارد که نیاز به حلال‌های آلی را به حداقل برساند و به‌طور قابل توجهی تولید اجزای زیست‌فعال هدف را افزایش می‌دهد. به همین دلیل در این تحقیق جهت بررسی تأثیر پیش‌تیمار امواج فراصوت بر استخراج مواد موثره گیاه دارویی پونه کوهی (*Mentha mozaffarianii* Jamzad) که یکی از گیاهان مهم و اندمیک ایران می‌باشد، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول، شامل مدت زمان اعمال پیش‌تیمار فراصوت در سه سطح (صفر، ۱۰ دقیقه و ۲۰ دقیقه) و فاکتور دوم نوع نمونه (نمونه خشک بدون حلال و با حلال) بود. صفات اندازه‌گیری شده در این تحقیق شامل فلاون‌ها و فلاونول‌ها، فلاونوئید کل، کربوهیدرات کل، میزان تانن، ترکیبات فنلی کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود. نتایج این تحقیق نشان دهنده تأثیر مثبت پیش‌تیمار فراصوت بر استخراج مواد موثره گیاه پونه کوهی بود؛ به‌طوری که اعمال مدت زمان ۲۰ دقیقه امواج فراصوت و استفاده از حلال بر روی نمونه‌ها در طی اعمال فراصوت تأثیر مثبت و معنی‌داری در افزایش بازده استخراج برای همه مواد موثره اندازه‌گیری شده در پونه کوهی داشت.

واژه‌های کلیدی: پونه برگ‌باریک، ترکیبات فنلی، حلال، فراصوت و گیاهان اندمیک.

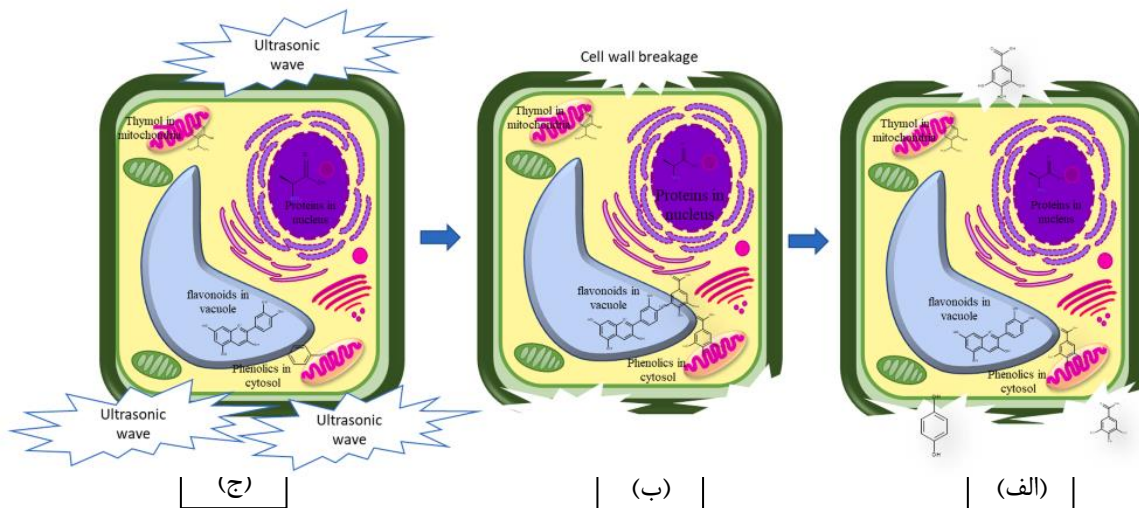
مقدمه

پونه کوهی یا پونه برگ باریک با نام علمی *Mentha mozaffarianii* Jamzad یک گیاه اندمیک ایران از خانواده نعنائیان (Lamiaceae) می‌باشد. گیاهی چند ساله، کرکی، پرشاخه، بسیار معطر، ساقه به ارتفاع حداکثر ۶۰ سانتی‌متر، برگهای ریز مستطیلی-سرنیزه ای با لبه کامل، کرکی نمدی کوتاه، با سطح فوقانی و تحتانی هم‌رنگ، بدون دم‌برگ یا با دم‌برگی کوتاه است. چرخه‌های گل پرگل، سنبله‌ها به طول ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متر و به عرض چهار میلی‌متر است (Mozaffarian, 2012; Ghani & Rowshan, 2017). بر اساس بررسی‌های انجام شده این گونه در جهان، فقط در ایران در استان‌های هرمزگان و جنوب فارس (مخصوصاً جهرم) رویش دارد. در این مناطق، این گیاه بیشتر در مناطق خنک و مرطوب به صورت پراکنده و لکه‌ای رویش دارد (Mozaffarian, 2012, Ghani & Rowshan, 2017). گیاهان اندمیک به نوعی از گیاهان اطلاق می‌شود که به‌طور ویژه و منحصر به فرد تنها در یک منطقه خاص جغرافیایی رشد می‌کنند و به صورت خودرو در هیچ منطقه دیگری یافت نمی‌شوند. توجه به این نوع از گیاهان می‌تواند زمینه‌ساز توسعه پایدار در آن منطقه باشد. گیاهان اندمیک به دلیل پراکنش جغرافیایی محدود، آسیب‌پذیری بیشتری نسبت به بقیه گیاهان دارند و از آنجایی که در ایران چرای بیش از حد، جاده‌سازی، آتش‌سوزی و آفات باعث تخریب و از بین رفتن پوشش گیاهی بسیاری از مناطق شده است، مطالعه این گیاهان برای تشخیص اولویت حفاظتی بسیار حائز اهمیت هستند (Shahi Shavoon, 2022). پونه برگ‌باریک در سال‌های اخیر از استان هرمزگان شناسایی و معرفی شده است، جایی که مردم محلی بصورت سنتی از آن به عنوان گیاه دارویی استفاده می‌کنند. این گیاه چندساله و دارای عطر دل‌انگیز می‌باشد. گرچه در سال‌های اخیر اطلاعاتی در مورد ترکیبات موجود در اسانس گیاه بدست آمده است اما مصارف دارویی آن بخوبی شناخته شده نیست و نیازمند تحقیق بیشتر می‌باشد (Mozaffarian, 2012; Ghani & Rowshan, 2017). با این حال از پیکر رویشی این گیاه در طب سنتی ایران به عنوان ضد عفونی کننده، مسکن و برای درمان قاعدگی دردناک، سوء هاضمه، درد مفاصل، تب، سردرد، سرماخوردگی و التیام زخم استفاده می‌شده است (Tavakkoli-Khaledi & Asgarpanah, 2016). اخیراً از مواد گیاهی به‌طور گسترده‌ای برای استخراج و تهیه ترکیبات زیست‌فعال آن‌ها با خاصیت دارویی استفاده می‌شود. ترکیبات زیست‌فعال در گیاهان دارای خواص عملکردی متنوعی هستند. به دلیل کاربرد گسترده و خواص مفید آن‌ها، عصاره‌های گیاهی غنی از ترکیبات زیست‌فعال به مواد تشکیل‌دهنده تجاری در صنایع غذایی و داروسازی تبدیل شده‌اند. امروزه عصاره‌های گیاهی به صورت غذای آماده، مکمل گیاهی، چای فراسودمند، قوام‌دهنده، طعم‌دهنده و رنگ‌دهنده غذا فرموله می‌شوند، همچنین کاربرد آن‌ها در سایر صنایع برای فرآوری محصولات آرایشی و بهداشتی و دارویی نیز گسترش یافته است (Agregan et al., 2021). استخراج ترکیبات زیست‌فعال را می‌توان به تکنیک‌های متعارف (معمولی) و غیرمتعارف طبقه‌بندی کرد. استخراج معمولی برای چندین دهه مورد استفاده قرار گرفته است، که از نظر زمان استخراج طولانی‌تر و مصرف حلال بیش‌تر، محدودیت‌هایی دارد (Agregan et al., 2021). عمدتاً، استخراج معمولی باعث تخریب ترکیبات حساس به حرارت

ناشی از زمان پردازش طولانی و دمای استخراج بالا می‌شود. از سوی دیگر، استخراج به کمک اولتراسوند یا امواج فراصوت که به عنوان فناوری غیرمتمعارف در نظر گرفته می‌شود، یکی از جایگزین‌های امیدوارکننده برای استخراج مواد موثره به صورت ترکیب با سایر روشها می‌باشد. اغلب، استخراج به کمک امواج فراصوت به حلال کمتر، زمان استخراج کوتاه‌تر نیاز دارد و بازده استخراج بالاتری را ایجاد می‌کند. علاوه بر آن، تخریب ترکیبات حساس به حرارت را به حداقل می‌رساند (Fu *et al.*, 2021). بر اساس گزارش Nie و همکاران (2021)، تکنیک فراصوت عمدتاً به دلیل کاهش هزینه، کاهش زمان عملیات، مصرف انرژی کمتر و عملکرد بالاتر تولید، به عنوان یک فناوری زیست‌پالایش‌سبز به اثبات رسیده‌است. تیمار فراصوت به عنوان یک روش موثر برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال گیاهی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌است. فرکانس امواج فراصوت می‌تواند با تشکیل کائوتاسیون^۱ (پدیده‌ای است که در آن، کاهش فشار باعث تبخیر موضعی مایع و ایجاد حباب‌هایی شود)، پیوندهای شیمیایی کم انرژی بافت گیاه را بشکند و در نتیجه امکان استخراج ترکیبات فعال زیستی را فراهم کند. استخراج به کمک امواج فراصوت به دلیل توانایی آن در افزایش بازده اسانس و در عین حال حفظ کیفیت اسانس، به‌طور گسترده برای استخراج اسانس استفاده شده است (Thilakarathna *et al.*, 2023). علاوه بر این، استخراج بر پایه امواج فراصوت امکان جایگزینی حلال‌های آلی سمی را که بیشتر در فرآیند استخراج مورد استفاده قرار می‌گیرند، با حلال‌های سبز فراهم می‌کند. اولتراسوند به راحتی با سایر تکنیک‌های استخراج مانند آنزیم، مایکروویو و فناوری فوق بحرانی برای افزایش بیشتر استخراج اسانس ادغام می‌شود. به‌طور کلی، اولتراسوند به عنوان امواج صوتی تعریف می‌شود که فرکانس‌هایی بالاتر از فرکانس‌های قابل شنیدن برای گوش انسان (تقریباً بیشتر از ۲۰ مگاهرتز) دارند. با این حال، فرکانس‌های موج صوتی پایین‌تر که معمولاً برای اهداف بالینی استفاده می‌شوند، فرکانس‌هایی بین دو تا ۱۲ مگاهرتز دارند که به عنوان اولتراسوند نیز در نظر گرفته می‌شوند. بسته به فرکانس آن، امواج فراصوت به روش‌های مختلفی قابل استفاده است. استخراج ترکیبات فعال زیستی یکی از فرآیندهای اصلی در صنایع غذایی است، روش‌های مرسوم مانند حلال، تقطیر با بخار آب یا استخراج با فشار مکانیکی به‌طور گسترده در فرآیند استخراج مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. تمام این تکنیک‌های استخراج وابسته به شکستن انرژی محدود بین مولکول‌ها و به دنبال آن ایجاد فضای آزاد بین مولکول‌ها هستند. استخراج به کمک حلال دارای اشکالات متعددی است؛ این تکنیک نیاز به حجم انبوهی از حلال‌های سمی دارد که منجر به تولید زباله می‌شود، از نظر فنی و علمی دشوار است، پیچیده و به زمان پردازش طولانی نیاز دارد و نیاز به یک فرآیند تصفیه برای حذف حلال و اطمینان از مصرف مطمئن محصول نهایی دارد (Rodrigues & Fernandes, 2017). امواج فراصوت القا شده توسط یک پروب ارتعاش یا حمام، ارتعاش را به ماتریکس پیچیده (مواد گیاهی) منتقل می‌کند که می‌تواند حفره ایجاد کند و ترکیبات خاصی را استخراج کند، که مکانیسم آن در شکل ۱ نشان داده شده‌است (Yusoff *et al.*, 2022). علاوه بر فرکانس فراصوت، بازده استخراج نیز توسط دامنه فراصوت تعیین می‌شود. دامنه بالاتر

^۱ - Cavitation

پیوندهای شیمیایی یا دیواره سلولی را مجبور به پارگی می‌کند (Senrayan & Venkatachalam, 2018). با توجه به اهمیت بالای گیاه دارویی پونه کوهی و با توجه به دسترس بودن میزان محدود از پیکره رویشی این گیاه جهت صنایع غذایی و دارویی، پژوهش حاضر با هدف تاثیر امواج فراصوت بر میزان مواد موثره موجود در عصاره این گیاه مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۱- مکانیسم استخراج به کمک امواج فراصوت: (الف) آزادسازی ترکیبات فعال زیستی از سلول‌های تخریب شده (ب) تخریب سلول‌های گیاهی به دلیل اثر اولتراسونیک (ج) تاثیر اولتراسوند بر سلول‌های گیاهی با ایجاد حباب‌های حفره‌ای (Yusoff *et al.*, 2022).

Figure 1. Mechanism of ultrasound-assisted extraction: (a) Release of bioactive compounds from the ruptured cells (b) Plant cells were ruptured because of ultrasonic effect (c) Effect of ultrasound on plant cells by creating cavitation bubbles (Yusoff *et al.*, 2022)

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های گیاهی

پیکره رویشی گیاهان پونه‌کوهی از کوه‌های اطراف جهرم به نام "دره نمی" جمع‌آوری گردید و سپس در سایه در دمای آزمایشگاه (آزمایشگاه گیاهان دارویی دانشگاه جهرم در شرایط دمایی $20 \pm 3^\circ\text{C}$) خشک گردید.

اعمال پیش تیمار فراصوت

در این پژوهش، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول مدت زمان اعمال امواج فراصوت در سه سطح (صفر یا بدون اعمال امواج فراصوت، ۱۰ دقیقه و ۲۰ دقیقه) و فاکتور دوم نوع نمونه جهت اعمال امواج فراصوت بود. نمونه‌های نوع اول شامل نمونه‌های پودر شده بدون حلال بود که درون دستگاه اولتراسوند قرار گرفتند و نوع دوم نمونه‌هایی بودند که حلال به آن‌ها اضافه شده بود و سپس درون دستگاه قرار داده شدند. توان دستگاه اولتراسوند ۴۰۰ وات و فرکانس ۳۰ کیلوهرتز بود. نحوه اعمال تیمارها به این صورت بود که ابتدا پیکره رویشی پونه‌کوهی به وسیله آسیاب برقی پودر شد و میزان پنج گرم از نمونه‌ها برای هر تکرار به‌طور جداگانه وزن گردید. سپس به نمونه‌های نوع دوم ۲۵ میلی‌لیتر

حلال متانول ۷۰ درصد اضافه شد و هر دو نوع نمونه (با حلال و بدون حلال) درون دستگاه اولتراسوند در زمان‌های متفاوت ۱۰ دقیقه و ۲۰ دقیقه قرار گرفتند.

عصاره‌گیری

نمونه‌های پونه کوهی پس از اعمال پیش تیمار فراصوت مورد عصاره‌گیری قرار گرفتند. برای عصاره‌گیری به نمونه‌های بدون حلال، ۵۰ میلی‌لیتر حلال متانول ۷۰ درصد و به نمونه‌های با حلال، ۲۵ میلی‌لیتر متانول ۷۰ درصد اضافه گردید تا غلظت عصاره برای هر دو نوع نمونه یکسان باشد (عصاره‌گیری کامل با نسبت ۱۰ به یک، نسبت حلال به نمونه بر اساس حجمی-وزنی انجام شد). سپس همه تیمارها به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر با دور ۲۵۰ دور در دقیقه قرار داده شدند و پس از آن با دور ۵۰۰۰ دور دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و روشناور یا همان عصاره برای اندازه‌گیری مواد موثره از سایر ترکیبات جدا شد (Wojdylo *et al.*, 2007).

اندازه‌گیری میزان فلاون‌ها و فلاونول‌ها

برای اندازه‌گیری فلاون‌ها و فلاونول‌ها ابتدا میزان ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره مربوط به هر نمونه برداشته و درون لوله‌های آزمایش ریخته شد. سپس دو میلی‌لیتر متانول و بعد از آن ۱۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم پنج درصد به آن اضافه شد و در نهایت با متانول به حجم پنج میلی‌لیتر رسانده شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای محیط نگهداری شدند و اعداد جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۵ نانومتر قرائت شد. اعداد جذب با استفاده از غلظت‌های مختلف کوئرستین و رسم منحنی استاندارد مربوط به آن، تبدیل به غلظت شد و به صورت معادل میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک ارائه شد (Popova *et al.*, 2004).

اندازه‌گیری فلاونوئیدها

برای اندازه‌گیری فلاونوئیدها، مقدار یک میلی‌لیتر از عصاره هر نمونه درون لوله آزمایش ریخته شد و سپس ۳۰۰ میکرولیتر نیتريت سدیم پنج درصد به آن اضافه شد. بعد از پنج دقیقه، ۶۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد اضافه شد و بعد از شش دقیقه، دو میلی‌لیتر سود یک نرمال اضافه شد و سپس به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده و اعداد جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت شد. اعداد جذب با استفاده از غلظت‌های مختلف کوئرستین و رسم منحنی استاندارد مربوط به آن، تبدیل به غلظت شد و به صورت معادل کوئرستین در گرم وزن خشک ارائه شد (Menichini *et al.*, 2009).

اندازه‌گیری کربوهیدرات کل

برای اندازه‌گیری کربوهیدرات کل، ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره هر نمونه درون لوله آزمایش ریخته شد و سپس سه میلی‌لیتر

معرف آنترون به نمونه‌ها اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آب جوش گذاشته شدند و بعد از آن داخل آب سرد گذاشته شدند. اعداد جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شد. اعداد جذب با استفاده از غلظت‌های مختلف گلوکز خالص و رسم منحنی استاندارد مربوط به آن، تبدیل به غلظت شد و به صورت میلی‌گرم معادل گلوکز در گرم وزن خشک ارائه شد (Yemm & Willis, 1954).

اندازه‌گیری میزان تانن

جهت اندازه‌گیری میزان تانن از معرف وانیلین-اسید کلریدریک (Vanillin-HCL) استفاده شد. ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره هر نمونه برداشته و درون لوله آزمایش ریخته شد و مقدار سه میلی‌لیتر از معرف وانیلین (۴ درصد) اضافه شد و کاملاً مخلوط شدند. سپس میزان ۱/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک به آن‌ها اضافه و به‌طور کامل مخلوط شدند. بعد از آن به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس اعداد جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۰۰ نانومتر قرائت شد. اعداد جذب با استفاده از غلظت‌های مختلف کاتکین (Catechin) و رسم منحنی استاندارد مربوط به آن، تبدیل به غلظت شد و به صورت میلی‌گرم معادل کاتکین در گرم وزن خشک ارائه شد (Broadhurst & Jones, 1987).

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل

ترکیبات فنلی کل با استفاده از معرف فولین سیوکالتئو (Folin-Ciocalteu) اندازه‌گیری شدند. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های مربوط به هر تیمار با فولین ۵۰ درصد مخلوط شدند. سپس دو میلی‌لیتر آب مقطر به محلول قبلی اضافه شد و بعد از سه دقیقه، یک میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد به آن‌ها اضافه شد. سپس جهت انجام کامل واکنش و جدا شدن ترکیبات فنلی به مدت ۱۰ ثانیه توسط دستگاه شیکر انگشتی به‌هم زده شدند. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق و شرایط تاریکی نگهداری شدند و پس از آن اعداد جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. اعداد جذب با استفاده از غلظت‌های مختلف گالیک اسید و رسم منحنی استاندارد مربوط به آن، تبدیل به غلظت شد و به صورت معادل میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک ارائه شد (Wojdylo *et al.*, 2007).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها با استفاده از آزمون DPPPH (2,2-diphenyl picrylhydrazyl) انجام شد. ابتدا ۱۰ میکرولیتر از عصاره‌های مربوط به هر نمونه داخل لوله‌های آزمایش ریخته شد و سپس سه میلی‌لیتر محلول DPPH با غلظت ۰/۰۰۴ درصد به آن‌ها اضافه شد. در محلول شاهد به جای ۱۰ میکرولیتر عصاره، ۱۰ میکرولیتر متانول استفاده شد. سپس به مدت پنج ثانیه به‌وسیله شیکر انگشتی به‌هم زده شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای محیط جهت انجام واکنش‌های شیمیایی نگهداری شدند و سپس اعداد جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها از طریق فرمول زیر محاسبه شد (Oke *et al.*, 2009):

رابطه ۱: $100 \times \text{عدد جذب شاهد} / (\text{عدد جذب نمونه} - \text{عدد جذب شاهد}) = \text{درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی}$

آنالیز آماری

داده‌های بدست آمده از اندازه‌گیری صفات مختلف در سه تکرار با استفاده از نرم افزار جامپ (JMP) نسخه ۸ و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی (Tukey) در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

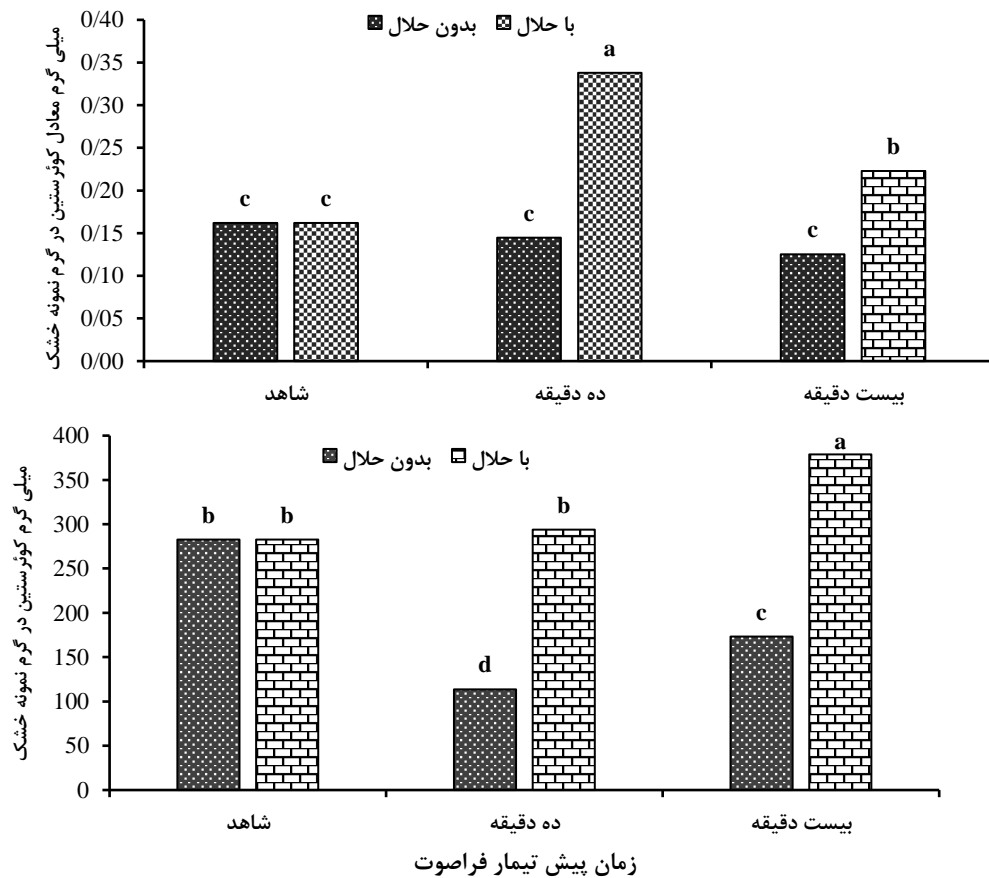
نتایج این تحقیق نشان‌دهنده تاثیر معنی‌دار و مثبت امواج فراصوت بر استخراج همه مواد موثره اندازه‌گیری شده بود. به طوری که اثرات ساده و متقابل در همه صفات به جز اثر ساده زمان بر میزان کربوهیدرات‌ها معنی‌دار ($p < 0.01$) بود (جدول ۱) که نتایج آن‌ها به تفصیل در زیر آمده است. با توجه به معنی‌دار شدن اثرات متقابل، نتایج مربوط به اثرات ساده ارائه نشده است.

میزان فلاون و فلاونول و فلاونوئیدهای کل

بیشترین میزان فلاون‌ها و فلاونول‌ها (۰/۳۴ میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک) در تیمار ۱۰ دقیقه فراصوت با حلال مشاهده شد، که بعد از آن تیمار ۲۰ دقیقه فراصوت با حلال قرار داشت. در حالی که بین سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. کمترین میزان (۰/۱۳ میلی‌گرم) در تیمار ۲۰ دقیقه فراصوت بدون حلال اندازه‌گیری شد. در بررسی اثر ساده زمان‌های مختلف تیمار فراصوت، تیمار ۱۰ دقیقه نسبت به ۲۰ دقیقه و شاهد از نظر استخراج فلاون‌ها و فلاونول‌ها برتری داشت. همچنین از بین نمونه‌های تیمار شده با حلال و بدون حلال، نمونه‌هایی که با حلال تحت تیمار فراصوت قرار گرفته بودند از این نظر برتری داشتند (شکل ۲). بیشترین میزان فلاونوئیدها (۳۷۸/۸۳ میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک) در تیمار ۲۰ دقیقه فراصوت با حلال اندازه‌گیری شد. کمترین میزان (۱۱۳/۵۸ میلی‌گرم) در تیمار ۱۰ دقیقه فراصوت بدون حلال یافت شد. در بررسی اثر ساده زمان‌های مختلف تیمار فراصوت، کمترین میزان فلاونوئیدها در تیمار ۱۰ دقیقه مشاهده شد در حالی که بین شاهد و ۲۰ دقیقه فراصوت اختلاف معنی‌داری از نظر آماری وجود نداشت. در نمونه‌های تیمار شده با حلال نیز در مقایسه با نمونه‌های تیمار شده بدون حلال، میزان فلاونوئیدهای بیشتری مشاهده شد (شکل ۲).

میزان کربوهیدرات کل

در بررسی تاثیر امواج فراصوت بر میزان استخراج کربوهیدرات‌ها، اثر ساده زمان معنی‌دار نبود در حالی که اثر ساده نوع نمونه (با حلال و بدون حلال) و اثر متقابل زمان و نوع نمونه معنی‌دار ($p < 0.01$) گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان کربوهیدرات‌ها (۶۹/۵۰ میلی‌گرم معادل گلوکز در گرم وزن خشک) در پونه‌کوهی در تیمار ۲۰ دقیقه فراصوت با حلال بدست می‌آید. البته این تیمار با تیمار ۱۰ دقیقه فراصوت با حلال (۶۱ میلی‌گرم) اختلاف معنی‌داری نداشت. در حالی که کمترین میزان کربوهیدرات‌ها (۴۴/۱۰ میلی‌گرم) در تیمار ۲۰ دقیقه فراصوت بدون حلال مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۲- تاثیر پیش تیمار مدت زمان فراصوت و کاربرد حلال بر میزان فلاون ها و فلاونول ها (شکل بالا) و فلاونوئید کل (شکل پایین) عصاره پونه کوهی (*Mentha mozaffarianii*)

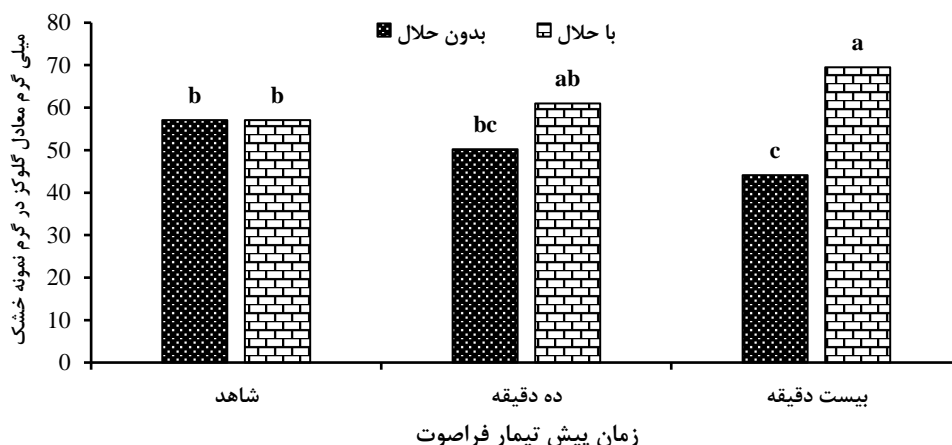
Figure 2- The effect of pretreatment of ultrasound duration and solvent application on the amount of total flavonoid (top figure) and flavones and flavonols (bottom figure) of *Mentha mozaffarianii* extract

جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تاثیر زمان پیش تیمار فراصوت و وجود حلال بر برخی از متابولیت های ثانویه عصاره گیاه پونه کوهی (*Mentha mozaffarianii*)

Table 2. Analysis of variance (mean squares) of the effect ultrasound duration pre-treatment and solvent application on the amount of some secondary metabolites of *Mentha mozaffarianii* extract

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	فلاون و فلاونول Flavone and flavonol	فلاونوئید کل Total flavonoid	کربوهیدرات کل Total carbohydrate	میزان تانن Tannin content	فنل کل Total phenol	فعالیت آنتی اکسیدانی Antioxidant activity
زمان Time	2	0.011**	11485**	3.78ns**	1.81**	403.75**	112.23**
حلال Extract	1	0.042**	74498**	655.22**	4.31**	2235.58**	1175.64**
زمان*حلال Time*Extract	2	0.014**	18868**	243.74**	1.09**	558.97**	335.70**
خطا Error	12	0.0003	128.80	18.00	0.04	28.56	2.41
ضریب تغییرات CV	-	39.03	35.30	15.87	24.15	17.09	13.45

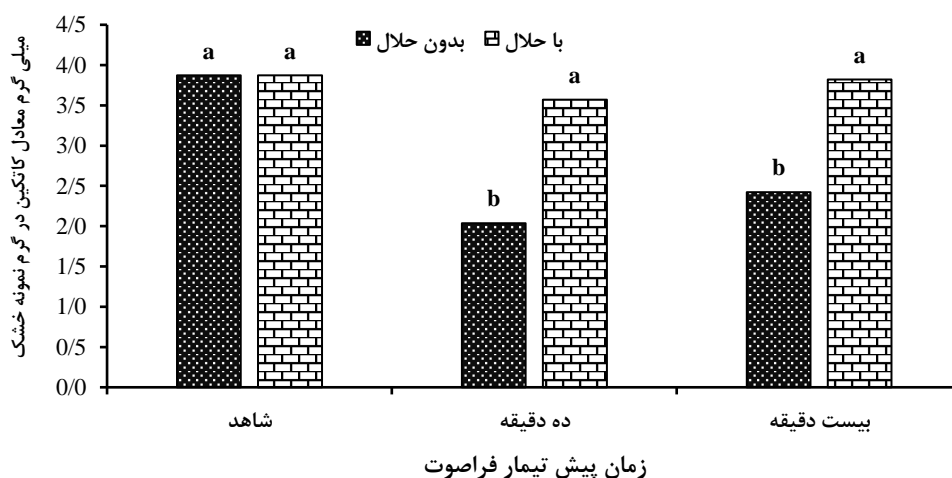
*, **, ns: Significant at 5% and 1% probability level and no significant, respectively.



شکل ۳- تغییر در میزان کربوهیدرات عصاره پونه کوهی (*Mentha mozaffarianii*) تحت تاثیر پیش تیمار زمان فراصوت و کاربرد حلال
 Figure 3- Changes in the amount of carbohydrates in *Mentha mozaffarianii* extract under the influence of ultrasound time pretreatment and solvent application

میزان تانن‌ها

بیشترین میزان تانن‌ها (۳/۸۷ میلی‌گرم معادل کاتکین بر گرم وزن خشک) در تیمار شاهد اندازه‌گیری شد که با تیمار ۲۰ دقیقه فراصوت با حلال (۳/۸۲ میلی‌گرم) در یک گروه قرار داشتند. کمترین میزان (۲/۰۴ میلی‌گرم) در تیمار ۱۰ دقیقه فراصوت بدون حلال اندازه‌گیری شد. در بررسی اثر ساده زمان‌های مختلف تیمار فراصوت، تیمار شاهد نسبت به تیمارهای ۱۰ و ۲۰ دقیقه موجب استخراج بیشتر تانن‌ها شد. به عبارت دیگر امواج فراصوت تاثیر مثبتی بر استخراج تانن‌ها نداشت، اما در مقایسه بین زمان‌های ۱۰ و ۲۰ دقیقه، ۲۰ دقیقه در استخراج تانن‌ها تاثیر بیشتری داشت. در نمونه‌های تیمار شده با حلال نیز در مقایسه با نمونه‌های تیمار شده بدون حلال، میزان تانن‌های بیشتری مشاهده شد (شکل ۴).



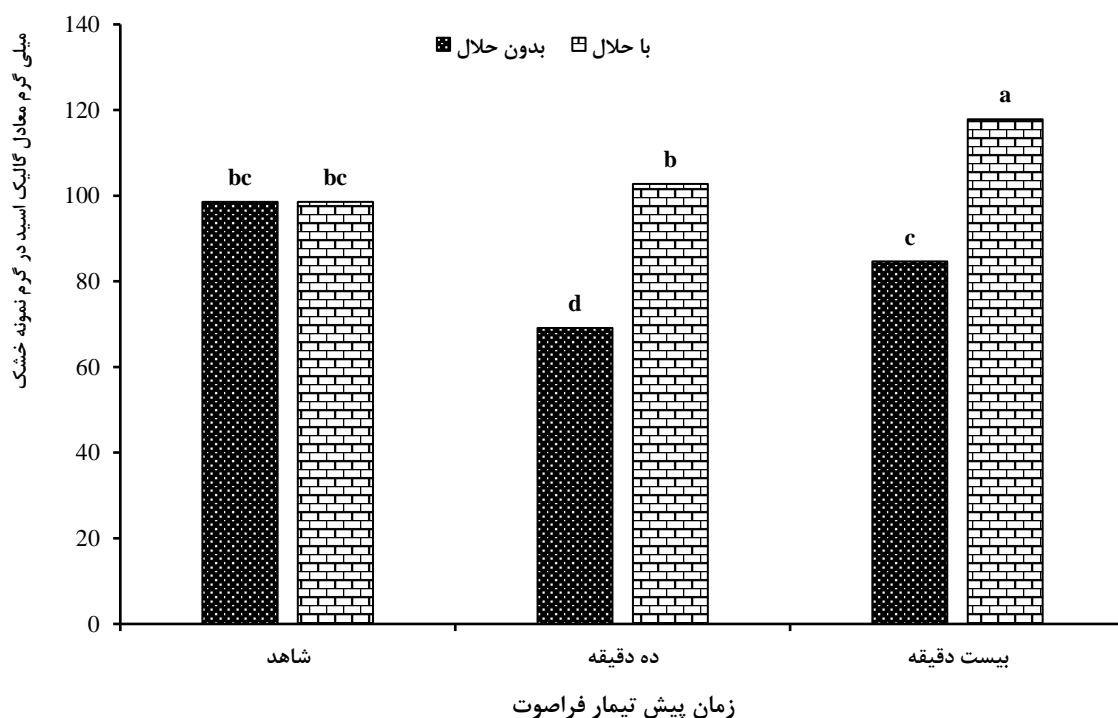
شکل ۴- تاثیر پیش تیمار مدت زمان فراصوت و کاربرد حلال بر میزان تانن عصاره گیاه دارویی پونه کوهی (*Mentha mozaffarianii*)
 Figure 4- The effect of pretreatment of ultrasound duration and solvent application on the amount of tannins in *Mentha mozaffarianii* extract

میزان ترکیبات فنلی کل

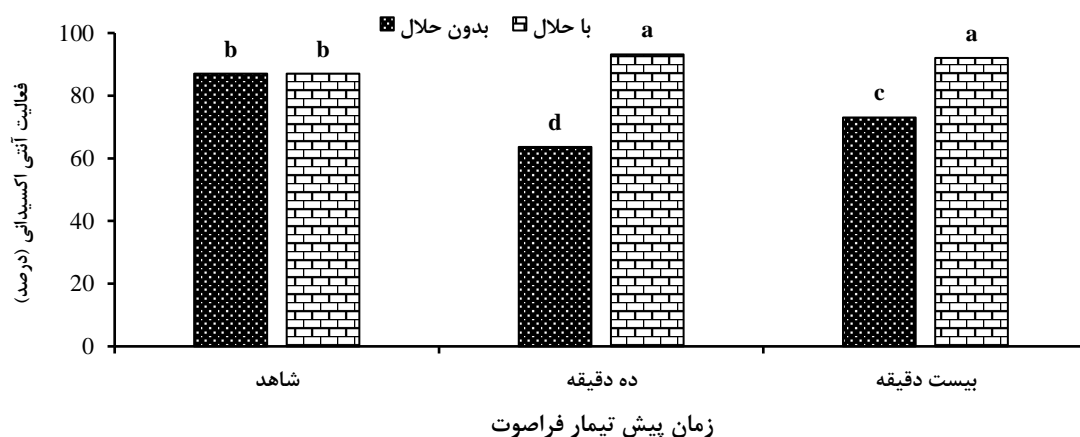
بیشترین میزان ترکیبات فنلی (۱۱۷/۸۵ میلی گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن خشک) در تیمار ۲۰ دقیقه فراصوت با حلال مشاهده شد، که بعد از آن تیمار ۱۰ دقیقه فراصوت با حلال قرار داشت. کمترین میزان (۶۹/۰۷ میلی گرم) در تیمار ۱۰ دقیقه فراصوت بدون حلال اندازه گیری شد. در بررسی اثر ساده زمان های مختلف تیمار فراصوت، تیمار ۲۰ دقیقه و شاهد نسبت به ۱۰ دقیقه از نظر استخراج میزان ترکیبات فنلی برتری داشتند. همچنین از بین نمونه های تیمار شده با حلال و بدون حلال، در نمونه هایی که با حلال تحت تیمار فراصوت قرار گرفته بودند، میزان ترکیبات فنلی بیشتری اندازه گیری شد (شکل ۵).

میزان فعالیت آنتی اکسیدانی

بیشترین فعالیت آنتی اکسیدان ها (۹۳/۱۳ درصد) در تیمار ۱۰ دقیقه فراصوت با حلال اندازه گیری شد که با تیمار ۲۰ دقیقه فراصوت با حلال (۹۲/۰۴ درصد) تفاوت معنی داری نداشتند. کمترین میزان (۶۳/۶۱ درصد) در تیمار ۱۰ دقیقه فراصوت بدون حلال یافت شد. بررسی اثرات ساده زمان های مختلف پیش تیمار فراصوت و نوع نمونه نشان داد که تاثیر نوع نمونه (با حلال و بدون حلال) در استخراج مواد موثره پونه کوهی بیشتر از مدت زمان فراصوت می باشد. به طوری که نمونه هایی که همراه با حلال در معرض امواج فراصوت قرار گرفته بودند فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری داشتند (شکل ۶).



شکل ۵- تغییر در میزان ترکیبات فنلی عصاره پونه کوهی (*Mentha mozaffarianii*) تحت تاثیر مدت زمان فراصوت و کاربرد حلال
Figure 5- Change in the amount of phenolic compounds of *Mentha mozaffarianii* extract under the influence of pre-treatment of ultrasound duration and solvent application



شکل ۶- تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پونه کوهی تحت تاثیر پیش تیمار مدت زمان فراصوت و کاربرد حلال

Figure 6 - Changes in antioxidant activity of *Mentha mozaffarianii* extract influenced by ultrasound duration and solvent application

محققان مکانیسم استخراج به کمک امواج فراصوت را برای مواد غذایی و محصولات طبیعی بررسی کرده‌اند. آن‌ها نشان داده‌اند که فرآیند استخراج به کمک امواج فراصوت ممکن است شامل مکانیسم‌های منفرد یا ترکیبی باشد. مکانیسم‌های احتمالی زیربنایی عبارتند از: تکه تکه شدن، فرسایش، مویستگی و بافت‌زدایی (Chemat *et al.*, 2017). اثرات ترکیبی مکانیسم‌ها ممکن است کارایی امواج فراصوت را از طریق اختلال سلولی و ترویج انتقال جرم افزایش دهد (Zahari *et al.*, 2020). این اثرات همچنین ممکن است به طور مستقیم یا غیرمستقیم ساختار داخلی ماتریس‌های نمونه را تغییر دهند که توسط Rahaman و همکاران (2019) گزارش شده است. این مسئله مطابق با یافته‌های Chen و همکاران (2020) بود که توضیح داد که انرژی مافوق صوت می‌تواند حفره‌ها و کانال میکروسکوپی برای کمک به حذف آب ایجاد کند. ایجاد حفره‌ها و میکروکانال‌ها احتمالاً سطح تماس ترکیبات زیست‌فعال و حلال را افزایش می‌دهد و در نتیجه پدیده انتقال جرم را تسریع می‌کند. این یافته‌ها بیشتر از نتایج Miano و همکاران (2016) پشتیبانی می‌کند که گزارش داد که فناوری فراصوت در مواد غذایی مرطوب با فعالیت آب بیشتر، مؤثرتر است. داده‌های تجربی اخیر نیز ثابت کرده است که پدیده کاپیتاسیون ایجاد شده توسط امواج فراصوت به استخراج پلی فنل‌ها از بادمجان کمک می‌کند (Agregan *et al.*, 2021). بسیاری از محققان ترجیح می‌دهند از انرژی مافوق صوت برای استخراج ترکیبات فنلی از مواد گیاهی استفاده کنند. علاوه بر راندمان استخراج بالاتر، تا حدی به دلیل فواید و زیست‌فعالی ترکیبات فنلی برای سلامت انسان است. ترکیبات فنلی، متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که از مسیر فنیل پروپانویید یا شیکیمات تولید می‌شوند (Sim *et al.*, 2019). آن‌ها ترکیبات متشکل از یک یا چند حلقه معطر هستند که به یک یا چند گروه هیدروکسیل متصل شده‌اند (Alara *et al.*, 2021). Bouafia و همکاران (2021) از انرژی مافوق صوت برای استخراج ترکیبات فنلی از گونه‌ای گل گندم (*Centaurea sp.*) استفاده کردند. آن‌ها تاکید کردند که استفاده از یک سیستم حلال مناسب، گام مهمی برای به دست آوردن عملکرد بالای ترکیبات فنلی در استخراج به کمک امواج فراصوت است. متانول به عنوان

مناسب‌ترین حلال و بعد از آن اتانول جهت استخراج ترکیبات فنلی از برگ این گیاه شده است. از سوی دیگر Ramos و همکاران (2020) نشان دادند که اتانول بهترین حلال برای استخراج فنل از پوست انبه است. با این وجود، مطالعات، اثربخشی حلال‌های الکلی را در استخراج ترکیبات فنلی نشان داد. به هر حال، عوامل دیگری مانند منشأ جغرافیایی، گونه‌ها یا ارقام مختلف گیاهان نیز ممکن است بر عملکرد ترکیبات فنلی استخراج شده با روش فراصوت تأثیر بگذارند. Zainol و همکاران (2020) محتوای کل فنلی را از سه نوع مختلف دانه قهوه با استفاده از فناوری فراصوت مورد مطالعه قرار دادند. این مطالعه نشان داد که دانه‌های قهوه روبوستا در مقایسه با دانه‌های قهوه عربیکا و لیبریکا بالاترین محتوای ترکیبات فنلی کل را نشان می‌دهند. Peanparkdee و همکاران (2019) همچنین مطالعاتی را بر روی ارقام مختلف برنج تایلندی گلوتینی و غیرگلوتین با رنگ‌های مختلف انجام دادند. برای انجام استخراج از دماها (۴۰، ۵۰ یا ۶۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان‌های (۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه) مختلف فراصوت استفاده شد. این مطالعه نشان داد که رقم گلوتینی ارغوانی بیشترین میزان فنل کل را در مقایسه با سایر ارقام نشان داد. Arruda و همکاران (2019) شدت کم تا زیاد امواج فراصوت را در بازیابی ترکیبات فنلی از پوست آراتیکوم (*Annona crassiflora* Mart.) بررسی کردند. در این مطالعه، پوست آراتیکوم به مدت ۵ تا ۵۰/۵ دقیقه در معرض ۱۶۰ تا ۶۴۰ وات قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که فناوری مافوق صوت با شدت بالا، روشی ساده، کارآمد و سریع برای استخراج ترکیبات فنلی از پوست آراتیکوم است. نتایج Lim و همکاران (2019) نیز تایید کرد که شدت بالای امواج فراصوت در ۷۰۰ وات می‌تواند منگیفرین را به‌طور موثر از میوه‌های *Macrocarpa phaleria* استخراج کند. این همچنین با یافته‌های Lohani و Muthukumarappan (2021) مطابقت داشت که گزارش کردند فراصوت می‌تواند محتوای فنلی کل آرد سورگوم را بهبود بخشد. نمونه آرد در معرض یک دستگاه مافوق صوت با انرژی بالا در ۱۰۰۰ وات و یک پردازشگر فراصوت در ۵۰۰ وات قرار گرفت. آن‌ها نشان دادند که افزایش محتوای فنلی آزاد به دلیل آزادسازی فنل‌های باندشده (پیوند شده) در فراصوت با انرژی بالا بود. Wang و همکاران (2019) همچنین استخراج فنل‌های متصل از برگ و دانه گونه‌ای رازبری (*Rubus idaeus* L.) را انجام داد. آن‌ها گزارش کردند که اسید همراه با استخراج مافوق صوت قادر است کارایی استخراج اسیدهای فنولیک متصل را افزایش دهد، این در حالی است که فراصوت فقط در ۳۲۰ وات انجام شد. علاوه بر این، فنل‌های متصل به مغز دانه میوه جمبو (*Syzygium cumini*) نیز می‌توانند به‌طور موثر با استفاده از استخراج آبی به کمک فراصوت استخراج شوند (Mahindrakar and Rathod, 2020). فلاونوئیدهای گیاهی یکی از زیرشاخه‌های ترکیبات فنلی در تنظیم عملکرد فیزیولوژیکی گیاهان هستند. فلاونوئیدها گروه بزرگی از پلی‌فنل‌ها را تشکیل می‌دهند که با ساختار benzo-y-pyrone مشخص می‌شوند و به‌طور گسترده در سبزیجات و میوه‌ها یافت می‌شوند. فلاونوئیدهای گیاهی عمدتاً مسئول رنگ، طعم، جلوگیری از اکسیداسیون چربی، محافظت از آنزیم و خواص فیزیولوژیکی ضد تنش هستند (Kopustinskiene et al., 2020). علاوه بر این، فلاونوئیدها اجزای اصلی رنگ گیاهان گلدار هستند. خواص شیمیایی فلاونوئیدها تا حد زیادی به ساختار و درجه پلیمریزاسیون آن‌ها بستگی دارد. توزیع

فلاونوئیدها در گیاهان به عوامل مختلفی از جمله تنوع و درجه قرار گرفتن در معرض نور بستگی دارد. تا به امروز بیش از ۵۰۰۰ فلاونوئید شناسایی شده است (Bakoyiannis *et al.*, 2019). فلاونوئیدها به وفور در گیاهان یافت می‌شوند و به عنوان ترکیبات گیاهی با وزن مولکولی کم طبقه‌بندی می‌شوند (Rengarajan *et al.*, 2020). فلاونوئیدها همچنین مواد شیمیایی گیاهی اصلی هستند که به عنوان مکمل برای سلامت انسان مصرف می‌شوند (Alara *et al.*, 2021). فلاونوئیدها اغلب فعالیت‌های ارتقا دهنده سلامت را در مطالعات *in vivo* و *in vitro* نشان می‌دهند. فعالیت‌هایی مانند آنتی‌اکسیدان‌ها (Chen *et al.*, 2021; Dong *et al.*, 2021; Nurcholis *et al.*, 2021)، ضد التهابی (Silva *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2021)، فعالیت‌های ضد میکروبی (Derouich *et al.*, 2020; Othman *et al.*, 2021) در مقالات منتشر شده مختلف گزارش شده‌اند. علاوه بر این، فلاونوئیدها می‌توانند از نظر شیمیایی توسط گلیکوزیلاسیون، متیلاسیون و آسیلاسیون تغییر داده شوند و در نتیجه عملکردهای بیولوژیکی متفاوتی ایجاد کنند (Yu *et al.*, 2020). به منظور افزایش بازیابی فلاونوئیدهای مفید و مشتقات آن‌ها، مطالعات زیادی با استفاده از استخراج به کمک امواج فراصوت انجام شده است. Lin و همکاران (2021) استخراج فلاونوئیدها به کمک امواج فراصوت از برگ‌های گیاه مورینگا (*Moringa oleifera* L.) را مطالعه کردند. Mai و همکاران (2020) همچنین استخراج فلاونوئیدها را از *Euonymus alatus* با استفاده از استخراج مبتنی بر پلی اتیلن گلیکول به کمک فراصوت انجام دادند. گزارشاتی در زمینه تشدید فرآیند و مطالعات جنبشی در استخراج به کمک فراصوت برای بازیابی فلاونوئیدها از پوسته بادام زمینی وجود دارد. پارامترهایی مانند دمای استخراج و قدرت مافوق صوت حلالیت فلاونوئیدها را با افزایش انتقال جرم و کاهش ویسکوزیته حلال افزایش دادند. علاوه بر این، قدرت مافوق صوت با دامنه بزرگتر، از طریق اتانول عبور می‌کند که منجر به فروپاشی شدید حفره‌ها از جمله افزایش انتشار املاح، اتلاف انرژی موضعی، ترک خوردگی یا آسیب دیدگی دیواره سلولی و آشفتگی سطحی می‌شود (Liao *et al.*, 2021). طیف وسیعی از زمان قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت در فناوری اولتراسونیک گزارش شده است. چندین محقق زمان استخراج را بین ۰ تا ۳۶۰ دقیقه اعمال کردند. مطالعه Wang و همکاران (2019) نشان دادند که عملکرد استخراج پلی‌ساکاریدها از ۱۰ دقیقه به ۴۰ دقیقه افزایش یافت، اما پس از گذشت بیش از ۴۰ دقیقه کاهش یافت. مطالعه‌ای که توسط Chew و همکاران (2021) انجام شد، اثرات زمان استخراج از ۱ تا ۹ دقیقه را بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد تیروزیناز عصاره برگ گونه‌ای کنف (*Hibiscus cannabinus*) گزارش کردند. نتایج نشان داد که مقدار فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی زمانی که نمونه‌های برگ تنها به مدت یک دقیقه استخراج شدند کاهش یافت. افزایش زمان استخراج به سه دقیقه باعث ارتقای فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد اما به تدریج با گذشت زمان به پنج و هفت دقیقه کاهش یافت. مطالعه دیگری نیز بر روی بهینه‌سازی استخراج آستاگزانتین (astaxanthin) به کمک امواج فراصوت از پوسته *Penaeus semisulcatus* با استفاده از زمان‌های مختلف استخراج از ۵، ۱۰ تا ۱۵ دقیقه انجام شد. با افزایش زمان استخراج از ۵ به ۱۵ دقیقه، راندمان استخراج آستاگزانتین افزایش یافت (Sharayei *et al.*, 2021). بنابراین، زمان استخراج بهینه به شدت بر اساس

نوع نمونه و ترکیب هدف پاسخ داده می شود. انتخاب حلال یکی دیگر از پارامترهای مهم در استخراج به کمک امواج فراصوت است. استفاده از آب به عنوان حلال سبز باید برای تولید محصولات ایمن ترجیح داده شود. حلال‌هایی مانند متانول، اتانول، n-هگزان و کلروفرم به‌طور گسترده در فعالیت‌های تحقیقاتی مرتبط با امواج فراصوت استفاده می‌شوند. متانول به عنوان موثرترین حلال در استخراج ترکیبات شناخته شده است که قادر به دستیابی به بالاترین بازده در مقایسه با سایر حلال‌ها است (Amiri *et al.*, 2019). با این حال، اتانول برای استخراج ترکیبات فعال زیستی به دلیل سمیت و زیست‌تخریب‌پذیری کمتر آن، ترجیح داده می‌شود (Shahata *et al.*, 2021). ترکیب مولکولی متفاوت سیستم حلال یا مخلوط حلال به راندمان استخراج کمک می‌کند. این به این دلیل است که ترکیب مولکولی می‌تواند بر ظرفیت انحلال حلال برای استخراج ترکیبات قطبی و یا غیر قطبی از مواد گیاهی تأثیر بگذارد (Sim *et al.*, 2019). حلال‌های قطبی می‌توانند ترکیبات آبدوست بیشتری مانند قندها و گلیکوزیدها را از مواد گیاهی استخراج کنند. اگر قطبیت حلال بر این اساس افزایش یابد، بازده استخراج آبی-اتانولی نیز افزایش می‌یابد. از طرفی حلال‌های الکلی در استخراج ترکیبات فنلی موثرتر از استون و آب هستند. این ممکن است به دلیل ساختار مولکولی الکلی باشد که اجازه دخالت در واکنش شیمیایی مرتبط با پیوندهای قطبی کربن-اکسیژن و اکسیژن-هیدروژن را می‌دهد. در حالی که آب فقط می‌تواند در واکنش‌های مربوط به پیوندهای اکسیژن-هیدروژن شرکت کند. جفت الکترون مشترک اتم اکسیژن در آب کمتر از حلال الکلی در دسترس است (Sim *et al.*, 2019). نتایج این تحقیق نیز نشان دهنده تأثیر مثبت امواج فراصوت بر استخراج مواد موثره گیاه پونه کوهی بود که در توافق با نتایج سایر محققین بود. نتایج این تحقیق نشان داد که بازده استخراج در همه ترکیبات اندازه‌گیری شده در نمونه‌هایی که با حلال تحت تأثیر امواج فراصوت قرار گرفته بودند بالاتر از نمونه‌های بدون حلال بود. همچنین افزایش مدت زمان تیمار فراصوت نیز موجب افزایش استخراج مواد موثره پونه کوهی شد.

نتیجه گیری نهایی

با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق، اعمال مدت زمان ۲۰ دقیقه امواج فراصوت و استفاده از حلال بر روی نمونه‌ها در طی اعمال فراصوت تأثیر مثبت و معنی‌داری در افزایش بازده استخراج مواد موثره پونه کوهی دارد.

منابع

Agregan, R., Munekata, P. E. S., Feng, X., Astray, G., Gullon, B., & Lorenzo, J. M. (2021). Recent advances in the extraction of polyphenols from eggplant and their application in foods. *LWT - Food Science and Technology*, 146: 111381.

Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds; A review. *Current Research in Food Science*, 4: 200–214.

Amiri, S., Shakeri, A., Sohrabi, M. R., Khalajzadeh, S., & Ghasemi, E. (2019). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of fatty acids from *Aesculus hippocastanum* fruit by response surface methodology. *Food Chemistry*, 271: 762–766.

Arruda, H. S., Silva, E. K., Pereira, G. A., Angolini, C. F. F., Eberlin, M. N., Miereles, M. A., & Pastore, G. M. (2019). Effects of high-intensity ultrasound process parameter on phenolic compounds recovery from araticum peel. *Ultrasonic Sonochemistry*, 50: 82–95.

Bakoyiannis, I., Daskalopoulou, A., Pergialiotis, V., & Perrea, D. (2019). Phytochemicals and cognitive health: Are flavonoids doing the trick? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109: 1488–1497.

Bouafia, M., Colak, N., Ayaz, F. A., Benarfa, A., Harrat, M., Gourine, N., & Yousfi, M. (2021). The optimization of ultrasonic-assisted extraction of *Centaurea* sp. antioxidative phenolic compounds using response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 25: 100330.

Broadhurst, R.B., & Jones, W.T. (1978). Analysis of condensed tannins using acidified vanillin, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29: 788-794.

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixer, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonic Sonochemistry*, 34: 540–560.

Chen, X. Q., Li, Z. H., Liu, L. L., Wang, H., Yang, S. H., & Zhang, J. S. (2021). Green extraction using deep eutectic solvents and antioxidant activities of flavonoids from two fruits of *Rubix* species. *LWT- Food Science and Technology*, 148: 111708.

Chen, Y., Li, M., Dharmasiri, T. S. K., Song, X., Liu, F., & Wang, X. (2020). Novel ultrasonic-assisted vacuum drying technique for dehydrating garlic slices and predicting the quality properties by low field nuclear magnetic resonance. *Food Chemistry*, 15(306): 125625.

Chew, S. Y., Teoh, S. Y., Sim, Y. Y., & Nyam, K. L. (2021). Optimisation of ultrasonic extraction condition for maximal antioxidant, antimicrobial, and antityrosinase activity from *Hibiscus cannabinus* L. leaves by using the single factor experiment. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 25: 100321.

Derouich, M., Bouhlali, E. D. T., Hmidani, A., Bammou, M., Bourkhis, B., Sellam, K., & Alem, C. (2020). Assesment of total polyphenol, flavonoids and anti-inflammatory potential of three Apiaceae species grown in the Southeast of Morocco. *Scientific African*, 9: e00507.

Dong, W., Chen, D., Chen, Z., Sun, H., & Xu, Z. (2021). Antioxidant capacity differences between the major flavonoids in cherry (*Prunus pseudocerasus*) *in vitro* and *in vivo* models. *LWT - Food Science and Technology*, 141: 110938.

Fu, X., Wang, D., Belwal, T., Xie, J., Xu, Y., Zou, L., Zhang, L., & Luo, Z. (2021). Natural deep eutectic solvent enhanced pulse-ultrasonication assisted extraction as a multi-stability protective and efficient green strategy to extract anthocyanin from blueberry pomace. *LWT - Food Science and Technology*, 144: 111220.

Ghani, A., & Rowshan, V. (2017). Comparative Study of Volatile Constituents from two Iranian Endemic Mint (*Mentha mozaffarianii* Jamzad) Ecotypes, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20:5, 1293-1301, DOI: 10.1080/0972060X.2017.1397552

Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as anti-cancer agents. *Nutrients*, 12(2): 457.

Liao, J., Guo, Z., & Yu, G. (2021). Process intensification and kinetic studies of ultrasound-assisted extraction of flavonoids from peanut shells. *Ultrasonic Sonochemistry*, 76: 105661.

Lim, Y. P., Pang, S. F., Yusoff, M. M., Mudalip, S. K. A., & Gim bun, J. (2019). Correlation between the extraction yield of mangiferin to the antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid content of *Phaleria macrocarpa* fruits, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 14: 100224.

Lin, X., Wu, L., Wang, X., Yao, L., & Wang, L. (2021). Ultrasonic-assisted extraction for flavonoid compounds content and antioxidant activities of India *Moringa oleifera* L. leaves: Simultaneous optimization, HPLC characterization and comparison with other methods. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 20: 100284.

Lohani, U. C., & Muthukumarappan, K. (2021). Study of continuous flow ultrasonication to improve total phenolic content and antioxidant activity in sorghum flour and its comparison with ultrasonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17: 105402.

Mahindrakar, K. V., & Rathod, V. K. (2020). Ultrasonic assisted aqueous extraction of catechin and gallic acid from *Syzygium cumini* seed kernel and evaluation of total phenolic, flavonoid contents and antioxidant activity. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, 149: 107841.

Mai, X., Liu, Y., Tang, X., Wang, L., Lin, Y., Zeng, H., Luo, L., Fan, H., & Li, P. (2020). Sequential extraction and enrichment of flavonoids from *Euonymus alatus* by ultrasonic-assisted polyethylene glycol-based extraction coupled to temperature-induced cloud point extraction. *Ultrasonic Sonochemistry*, 66: 105073.

Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M. R., Conforti, F., Statti, G., De Cindio, B., Houghton, P. J., & Menichini, F. (2009). The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chemistry*, 114(2): 553-560.

Miano, A. C., Ibarz, A., & Augusto, P. E. D. (2016). Mechanisms for improving mass transfer in food with ultrasound technology: Describing the phenomena in two model cases. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29: 413-419.

Mozaffarian V. (2012). Medicinal and Aromatic Plants of Iran, *Farhange Moaser*. Iran. PP: 1444. (In Persian)

Nie, J., Chen, D., Ye, J., Lu, Y., & Dai, Z. (2021). Optimization and kinetic modelling of ultrasonic-assisted extraction of fucoxanthin from edible brown algae *Sargassum fusiforme* using green solvents. *Ultrasonic Sonochemistry*, 77: 105671.

Nurcholis, W., Putri, D. N. S., Husnawati, H., Aisyah, S. I., & Priosaeryanto, B. (2021). Total flavonoid content and antioxidant activity of ethanol and ethyl acetate extract from accessions of *Amomum compactum* fruits. *Annals of Agricultural Sciences*, 66: 58-62.

Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S., & Altundag, S. (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*, 112: 874-879.

Othman, M. S., Khaled, A. M., Bagwan, A. H., Fareid, M. A., Ghamy, R. A., Habotta, O. A., & Monaem, A. A. E. (2021). Hepatorenal protective efficacy of flavonoids from *Ocimum basilicum* extract in diabetic albino rats: A focus on hypoglycemic, antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 244: 112287.

Peanparkdee, M., Patrawatt, J., & Iwamoto, S. (2019). Effects of extraction conditions on phenolic content, anthocyanin content and antioxidant activity of bran extracts from Thai rice cultivars. *Journal of Cereal Science*, 86: 86-91.

Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L., & Bogdanov, S. (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis, *Phytochemical Analysis*, 15: 235-240.

Rahaman, A., Zeng, X. A., Kumari, A., Rafiq, M., Siddeeg, A., Manzoor, M. F., Baloch, Z., & Ahmed, Z. (2019). Influence of ultrasound-assisted osmotic dehydration on texture, bioactive compounds and metabolites analysis of plum. *Ultrasonics Sonochemistry*, 58: 104643.

Ramos, M. T., Fort, J. B., Watson, N. J., Lopez, I. I. R., Galicia, G. C., & Jimenez, E. C. (2020). Effect of solvent composition and its interaction with ultrasonic energy on the ultrasound-assisted

extraction of phenolic compounds from mango peel (*Mangifera indica* L.). *Food and Bioprocess Technology*, 122: 41–54.

Rengarajan, S., Melanathuru, V., Govindasamy, C., Chinnadurai, V., & Elsadek, M. F. (2020). Antioxidant activity of flavonoid compounds isolated from the petals of *Hibiscus rosa sinensis*. *Journal of King Saud University-Science*, 32: 2236–2242.

Rodrigues, S., & Fenandes, F. A. N. (2017). In *Epigenetic biomarkers and diagnostics*. Elsevier Inc.

Senrayan, J., & Venkatachalam, S. (2018). A short extraction time of vegetable oil from *Carica papaya* L. seeds using continuous ultrasound acoustic cavitation: Analysis of fatty acid profile and thermal behavior. *J Food Process Eng*, 42(1): 1–9.

Shahi Shavoon, R. (2022). A review study of the distribution pattern of endemic plants in Iran and the necessity of protecting these plants, Fourth National Biology Conference, Estehban, <https://civilica.com/doc/1523101> (In Persian)

Sharayei, P., Azarpazhooh, E., Zomorodi, S., Einafshar, S., & Ramaswamy, H. S. (2021). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of astaxanthin from green tiger (*Penaeus semisulcatus*) shrimp shell. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76: 105666.

Shehata, M. G., Awad, T. S., Asker, D., El Sohaimy, S., El Aziz, N. M. A., & Youssef, M. M. (2021). Antioxidant and antimicrobial activities and UPLC-ESI-MS/MS polyphenolic profile of sweet orange peel extract. *Current Research in Food Science*, 4: 326–335.

Silva, B., Bluca, C. B., Gonaga, V. L., Fett, R., Dalmaco, E. M., Caon, T., & Costa, A. C. O. (2021). In vitro anti-inflammatory properties of honey flavonoids: A review. *Food Research International*, 141: 110086.

Sim, Y. Y., Ong, W. T. J., & Nyam, K. L. (2019). Effect of various solvents on the pulsed ultrasonic-assisted extraction of phenolic compound from *Hibiscus cannabinus* L. leaves. *Industrial Crops and Products*, 140: 111708.

Tang, Z. Y., Fan, R. Z., Yin, A. P., Tang, D. K., Ahmed, A., Cao, J., Yin, S., Pu, R., & Tang, G. H. (2021). Flavonoids with anti-inflammatory activities from *Daphne giraldii*. *Arabian Journal of Chemistry*, 24(2): 102962.

Tavakkoli-Khaledi, S., & Asgarpanah, J. (2016). Essential Oil Chemical Composition of *Mentha mozaffarianii* Jamzad Seeds, *Journal of the Mexican Chemical Society*, 60(1): 19-22.

Thilakarathna, R. C. N., Siow, L. F., Tang, T. K., & Lee, Y. Y. (2023). A Review on Application of Ultrasound and Ultrasound Assisted Technology for Seed Oil Extraction. *Journal of Food Science and Technology*, 60: 1222–1236.

Wang, L., Lin, X., Zhang, J., Zhang, W., Hu, X., Li, W., & Liu, S. (2019). Extraction method for the releasing of bound phenolic from *Rubus idaeus* L. leaves and seeds. *Industrial Crops and Products*, 135: 1–9.

Wojdylo, A., Oszmianski, J., & Czemerzys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compound in 32 selected herbs, *Food Chemistry*, 1005: 940-949.

Yemm, E., & Willis, A. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical journal*, 57(3): 508.

Yu, F., Xu, X., Lin, S., Peng, T., & Zeng, S. (2020). Integrated metabolomics and transcriptomics reveal flavonoids glycosylation difference in two Citrus peels. *Scientia Horticulturae*, 292: 110623.

Yusoff, I.M., Taher, Z.M., Rahmat, Z., & Chua, L.S. (2022). A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins, *Food Research International*, 157: 111268.

Zahari, N. A. A. R., Chong, G. H., Abdullah, L. C., & Chua, B. L. (2020). Ultrasonic-assisted extraction (UAE) process on thymol concentration from *Plectranthus Amboinicus* leaves: Kinetic modeling and optimization. *Processes*, 8(3): 322.

Zainol, M. K., Mohd Subri, I., Zamri, A. I., Mohd Zin, Z., Faisal, A., & Mamat, H. (2020). Antioxidative properties and proximate analysis of spent coffee ground (SCG) extracted using ultrasonic methanol assisted technique as a potential functional food ingredient. *Food Research*, 4(3): 636–644.