Research Article

Iranian Journal of Wood and Paper Science Research

Vol. 40, No. 1, Page 81-94 (2025) DOI: 10.22092/IJWPR.2025.368212.1793

Evaluation of antioxidant properties of extracts from the heartwood and sapwood of Chinaberry tree (*Melia azedarach*) wood

Maryam Ahmadi[1], Seyed Majid Zabihzadeh[2*], Noureddin Nazarnezhad[3], Ghasem Asadpour[3] and Pourya Biparva[4]

1-PhD student, Pulp and Paper Industry, Department of Wood and Cellulosic Products Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mazandaran, Iran

2*- Corresponding Author, Associate Professor, Department of Wood and Cellulosic Products Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mazandaran, Iran, Email: m.zabihzadeh@sanru.ac.ir

3-Associate Professor, Department of Wood and Cellulosic Products Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mazandaran, Iran

4-Associate Professor, Department of Basic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mazandaran, Iran

Received: January 2025 Revised: February 2025 Accepted: February 2025

Abstract

Background and objectives: Plant extracts contain antioxidant compounds, which have generated increasing attention in various scientific and industrial fields due to their significance. Among the most important groups of compounds present in plant extracts are phenolic compounds. These compounds not only possess antioxidant properties but also have diverse applications in various industries. Numerous plants have been investigated for the extraction of bioactive compounds. Chinaberry (*Melia azedarach*), a woody species, is known to contain antioxidant substances. In this study, the extracts from heartwood and sapwood of chinaberry wood were obtained, and the extracted compounds were identified. Additionally, the antioxidant properties of these compounds were evaluated. This research provides valuable insights into the potential applications of antioxidant compounds derived from chinaberry wood in different industries.

Methodology: First, the heartwood and sapwood of *Melia azedarach* (chinaberry) were separated and ground using a laboratory mill. Particles size (60 mesh) were isolated using a laboratory sieve. Prior to extraction, the wood flour underwent pre-extraction with hexane. Three different extraction methods were employed: Soxhlet, immersion, and ultrasonic. In all methods, 10 grams of wood flour were used as the raw material. In the Soxhlet method, the raw material was placed in a thimble and then the thimble containing wood flour was placed on flask containing 250 mL of ethanol. The Soxhlet apparatus was set up, and after the first siphoning, the samples were heated for 6 hours to complete the extraction process. In the immersion method, the samples were stirred with 250 mL of ethanol at 40°C for 24 hours using a magnetic stirrer. In the ultrasonic method, the wood flour was combined with 100 mL of ethanol in a beaker. The resulting mixture was treated at 40°C for a total of 6 minutes, divided into two 3-minute intervals, using ultrasonic waves at a frequency of 20 kHz and an amplitude of 50%. The compounds present in the extracts obtained from all three methods were identified using GC-MS analysis. The total phenolic and

flavonoid content of the extracts was quantified. Additionally, the antioxidant activity of the extracts was evaluated using the DPPH method.

Results: The analysis of extractable content before pre-extraction with hexane revealed that the heartwood contained a higher number of extractable materials compared to the sapwood. Following extraction using three different methods, a re-assessment of extractable content indicated that the highest amount was obtained from the sapwood using the Soxhlet method. GC-MS analysis of extracts derived from the heartwood and sapwood of *Melia azedarach* showed that methoxyphenol was the predominant phenolic compound identified in both wood types when extracted using the Soxhlet method. In the immersion method, beta-sitosterol was the most abundant compound in the heartwood, while methylphenol dominated in the sapwood. For the ultrasonic method, imidazolidinedione was the most abundant compound in the heartwood, and beta-sitosterol prevailed in the sapwood. The highest phenolic compound content was observed in the sapwood extract obtained using the Soxhlet method, measuring 0.45865 µg gallic acid per mg of extract. The maximum flavonoid content was also recorded in the sapwood extract from the Soxhlet method, with 0.493172 mg quercetin per gram of dry weight. Antioxidant activity assessment demonstrated that the extract obtained from the heartwood using the immersion method exhibited the highest antioxidant activity.

Conclusion: This study aimed to investigate the extraction of heartwood and sapwood from *Melia azedarach* and evaluate the impact of three different extraction methods- soxhlet, immersion, and ultrasonic- on the yield of the extracted materials. Additionally, the antioxidant properties of the extracts obtained through these methods were assessed. The results revealed that phenolic compounds constituted the majority of the extracted materials in both heartwood and sapwood extracts of this species. The soxhlet method demonstrated the highest efficiency in extracting phenolic and flavonoid compounds from the sapwood, while the immersion method exhibited the highest antioxidant activity in the extracts obtained from the heartwood. These findings underscore the influence of the extraction method on the quantity and type of compounds extracted as well as their antioxidant properties. This study provides valuable insights into the potential utilization of antioxidant compounds in industrial and pharmaceutical applications.

Keywords: Heartwood, sapwood, antioxidant properties, *Melia azedarach*.

ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده از چوب درون و چوب برون گونه زیتون تلخ (*Melia azedarach*)

مریم احمدی[۱]، سیدمجید ذبیح‌زاده*[۲]، نورالدین نظرنژاد[۲]، قاسم اسدپور[۲] و پوریا بی‌پروا[۳]

۱- دانشجوی دکتری رشته صنایع خمیر و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه چوب و فراورده‌های سلولزی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران،

پست‌الکترونیک: **m.zabihzadeh@sanru.ac.ir**

۳-دانشیار، گروه چوب و فراورده‌های سلولزی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

۴-دانشیار، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۳ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۳

چکیده

سابقه و هدف: عصاره گیاهان حاوی مواد آنتی‌اکسیدانی است که به دلیل اهمیت بالای این مواد، مطالعه و بهره‌برداری از آنها در علوم و صنایع مختلف به‌طور فزاینده‌ای مورد توجه قرار گرفته است. یکی از مهمترین گروه‌های مواد موجود در عصاره گیاهان، ترکیبات فنولی هستند. این ترکیبات علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی، کاربردهای متعددی در صنایع مختلف دارند. تاکنون گیاهان گوناگونی برای استخراج عصاره‌های گیاهی بررسی شده‌اند. زیتون تلخ، یکی از گونه‌های چوبی، حاوی مواد آنتی‌اکسیدانی است. در این پژوهش، عصاره موجود در چوب درون و چوب برون زیتون تلخ استخراج شد و ترکیبات استخراج‌شده شناسایی گردیدند. همچنین، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات مورد آزمون قرار گرفتند. این مطالعه می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در مورد کاربرد بالقوه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی حاصل از زیتون تلخ در صنایع مختلف ارائه دهد.

مواد و روش‌ها: ابتدا چوب درون و چوب برون گونه زیتون تلخ از یکدیگر جدا و با استفاده از آسیاب آزمایشگاهی خرد شدند. ذرات با اندازه مش ۶۰ با استفاده از الک آزمایشگاهی جداسازی گردید. پیش از انجام عصاره‌گیری، آرد چوب با استفاده از هگزان پیش‌استخراج شد. سه روش مختلف برای عصاره‌گیری استفاده شد: سوکسوله، غوطه‌وری و التراسونیک. در هر سه روش، ۱۰ گرم آرد چوب به‌عنوان ماده اولیه استفاده گردید. در روش سوکسوله، مواد اولیه در کارتوش ریخته شد، سپس کارتوش حاوی آرد چوب دربالن حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول قرار گرفت. سیستم سوکسوله نصب شد و پس از اولین سیفون، نمونه‌ها به مدت ۶ ساعت تحت حرارت قرار گرفتند تا فرایند عصاره‌گیری کامل شود. در روش غوطه‌وری، نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول با استفاده از همزن مغناطیسی و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد هم زده شدند. در روش التراسونیک، آرد چوب به همراه ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول در بشر ریخته شد. مخلوط حاصل در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و طی دو بازه زمانی ۳ دقیقه‌ای (در مجموع ۶ دقیقه) با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز و دامنه ۵۰ درصد تحت تیمار قرار گرفت. ترکیبات موجود در عصاره‌های حاصل از هر سه روش با استفاده از GC-MS شناسایی شدند. مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره‌ها نیز اندازه‌گیری شد. علاوه بر این، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از روش DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: بررسی درصد مواد استخراجی پیش از پیش‌استخراج با هگزان نشان داد که مقدار مواد استخراجی موجود در چوب درون بیشتر از چوب برون است. پس از عصاره‌گیری با سه روش مختلف، اندازه‌گیری دوباره درصد مواد استخراجی نشان داد که بیشترین مقدار مواد استخراجی در چوب برون و با استفاده از روش سوکسوله به‌دست آمد. آنالیز ترکیبات عصاره‌های حاصل از چوب درون و چوب برون گونه زیتون تلخ با GC-MS نشان داد، در روش سوکسوله، متوکسی فنول بیشترین ترکیب فنولی شناسایی‌شده در هر دو

بخش چوب بود. در روش غوطه‌وری، بتا-سیتوسترول در چوب درون و متیل فنول در چوب برون بیشترین مقدار را داشتند. در روش التراسونیک، ایمیدازولیدیندیون بیشترین درصد ترکیب استخراج‌شده در چوب درون و بتا-سیتوسترول در چوب برون بود. بیشترین مقدار ترکیبات فنولی در عصاره استخراج‌شده از چوب برون با استفاده از روش سوکسوله و با میزان ۰/۴۵۸۶۵ میکروگرم گالیک اسید بر میلی‌گرم ثبت شد. بیشترین مقدار فلاونوئید نیز در عصاره استخراج‌شده از چوب برون با استفاده از روش سوکسوله و با میزان ۰/۴۹۳۱۷۲ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک به‌دست آمد. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که عصاره استخراج‌شده از چوب درون با استفاده از روش غوطه‌وری بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشت.

نتیجه‌گیری: هدف این پژوهش، بررسی عصاره‌گیری از چوب درون و چوب برون گونه زیتون تلخ و ارزیابی تأثیر سه روش مختلف استخراج شامل سوکسوله، غوطه‌وری و التراسونیک بر میزان عصاره استخراج‌شده بود. علاوه بر این، ویژگی آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج‌شده با این روش‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ترکیبات فنولی، بیشترین مقدار از مواد استخراج‌شده در عصاره‌های حاصل از چوب درون و چوب برون این گونه را تشکیل می‌دهند. همچنین، روش سوکسوله بالاترین بازدهی را در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از چوب برون داشت، در حالی که روش غوطه‌وری، بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در عصاره استخراج‌شده از چوب درون نشان داد. این یافته‌ها نشان داد که انتخاب روش مناسب عصاره‌گیری می‌تواند بر مقدار و نوع ترکیبات استخراج‌شده و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی آنها تأثیر بگذارد. این موضوع می‌تواند اطلاعات ارزشمندی برای استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در کاربردهای صنعتی و دارویی ارائه دهد.

واژه‌های کلیدی: چوب درون، چوب برون، خواص آنتی‌اکسیدانی، زیتون تلخ.

مقدمه

ترکیبات فنولی گروهی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که به‌طور گسترده در طبیعت یافت می‌شوند. تاکنون حدود هشت هزار ترکیب فنولی در بخش‌های مختلف گیاهان شناسایی شده است. این ترکیبات به دلیل ساختار شیمیایی خاص خود، در صنایع مختلف ازجمله تولید رنگ، دارو، آنتی‌اکسیدان‌ها، حشره‌کش‌ها، طعم‌دهنده‌ها و مواد معطر به‌طور گسترده‌ای کاربرد دارند (Verpoorte *et al.*, 2002). ازجمله زیرگروه‌های مهم ترکیبات فنولی می‌توان به اسیدهای فنولی، تانن‌ها، فلاونوئیدها و کومارین‌ها اشاره کرد. این ترکیبات به دلیل فعالیت‌های بیولوژیکی مانند خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدالتهابی و ضدسرطانی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (Mardani *et al.*, 2019). اسیدهای هیدروبنزوئیک، یکی از شاخه‌های مهم اسیدهای فنولی، به دلیل ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌رادیکالی خود نقش مهمی در جلوگیری از اکسایش مواد غذایی و حفظ سلامت ایفا می‌کنند. اکسایش چربی‌ها و روغن‌ها موجب تخریب اسیدهای چرب ضروری، تولید ترکیبات مخرب اکسایشی و کاهش ارزش تغذیه‌ای و طعم مواد غذایی می‌شود. این فرایند اثرهای مخربی نیز بر سلامت انسان دارد (Marinova & Yanishlieva, 2003). تمامی اسیدهای هیدروبنزوئیک دارای یک حلقه فنولی و حداقل یک گروه کربوکسیل در ساختار مولکولی خود هستند. تفاوت این ترکیبات در تعداد و موقعیت گروه‌های عاملی مانند هیدروکسی، متوکسی و آلکیل استر است (Biskup *et al.*, 2013). وجود گروه‌های هیدروکسیل در ساختار این ترکیبات، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها را نسبت به سایر گروه‌های عاملی تقویت می‌کند (Farnoosh *et al.*, 2016). تحقیقات نشان داده‌اند که افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل و قرارگیری آنها در موقعیت‌های اورتو و پارا حلقه فنولی، نقش کلیدی در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات دارد (Cheng *et al.*, 2003). این ویژگی‌ها ترکیبات فنولی را به مولکول‌هایی ارزشمند برای کاربرد در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی تبدیل کرده است و اهمیت بررسی بیشتر آنها را در زمینه‌های مختلف علمی و صنعتی تأکید می‌کند.

رادیکال‌های آزاد ترکیباتی با الکترون‌های جفت‌نشده

هستند که از طریق واکنش‌های برگشت‌ناپذیر با مولکول‌های زیستی مانند اسیدهای آمینه آزاد، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و لیپوپروتئین‌ها موجب آسیب اکسایشی می‌شوند. این آسیب‌ها نقشی کلیدی در ایجاد بیماری‌های قلبی-عروقی، سرطان، آب مروارید و سایر بیماری‌های مرتبط با تنش اکسایشی دارند. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن شامل عوامل آنزیمی و غیرآنزیمی است. عوامل آنزیمی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز به‌ترتیب رادیکال‌های هیدروژن پراکسید، سوپراکسید و پراکسیدهای آلی را مهار می‌کنند. همچنین، عوامل غیرآنزیمی ازجمله ترکیبات فنولی، با خواص آنتی‌اکسیدانی خود، بسیاری از رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن را خنثی می‌کنند. این ترکیبات که به زیرگروه‌هایی مانند اسیدهای فنولی، فلاونوئیدها، تانن‌ها، کینون‌ها، کومارین‌ها، لیگنان‌ها، لیگنین‌ها و استیلبن‌ها تقسیم می‌شوند، به دلیل فعالیت‌های زیستی خود، ازجمله آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدسرطانی، مورد توجه گسترده قرار گرفته‌اند (Mollaei & Ebadi, 2022).

زیتون تلخ، گیاهی از خانواده Meliaceae با نام علمی *Melia azedarach*، یکی از سرده‌های تیره زیتون‌تلخیان است. این تیره شامل درختان یا درختچه‌هایی با برگ‌های شانه‌ای است که در ایران تنها دو گونه از آن شناسایی شده است. زیتون تلخ بومی منطقه هیمالیا بوده و در ایران به‌ویژه در جنگل‌های ساحلی دریای خزر از لاهیجان تا مازندران و میان‌دره گرگان یافت می‌شود. همچنین، این گیاه به دلیل زیبایی ظاهری، در باغ‌ها و منازل به‌عنوان گیاهی زینتی کاشته می‌شود. به علت گستردگی پرورش و تمایل به زیستگاه‌های طبیعی آشفته، توزیع این گونه هنوز به‌طور دقیق مشخص نیست. مطالعات شیمیایی روی برگ‌های این گیاه نشان داده است که حاوی ترکیبات زیستی فعالی ازجمله فنیل‌پروپانوئیدها و فلاونوئیدهایی مانند میریستین، کوئرستین، کامفرول و مشتقات ایزورامنتین هستند. با وجود این یافته‌ها، اطلاعات موجود درباره ترکیب شیمیایی این گونه و ارزیابی کاربرد بالقوه آن به‌عنوان منبع استخراج اجزای فعال زیستی هنوز محدود است (Shrestha *et al.*, 2021). مواد استخراجی موجود در بخش‌های مختلف درخت زیتون تلخ دارای ترکیبات ارزشمندی هستند که کاربردهای متعددی ازجمله در تولید داروها، سموم کشاورزی و ضدآفات دارند.

هدف از این پژوهش، ارزیابی مقدار ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی چوب برون و چوب درون درخت زیتون تلخ بود. برای این منظور، استخراج ترکیبات زیست‌فعال موجود در چوب این گونه با استفاده از سه روش مختلف شامل غوطه‌وری، سوکسوله و دستگاه التراسونیک انجام شد. مقدار محتوای فنولی عصاره‌ها با استفاده از روش فولین-سیو-کالتیو، محتوای فلاونوئید با روش رنگ‌سنجی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH اندازه‌گیری شد. نتایج این پژوهش می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد کاربردهای بالقوه زیستی ترکیبات استخراج‌شده از چوب زیتون تلخ ارائه دهد.

مواد و روش‌ها

مواد

چوب درخت زیتون تلخ از محوطه دانشکده منابع طبیعی ساری جمع‌آوری شد. مواد شیمیایی مورد استفاده شامل هگزان (C_6H_{14}) (با درصد خلوص ۹۵٪ و اتانول (C_2H_5OH) با درصد خلوص ۹۷٪ بودند که از شرکت مرک تهیه شدند. معرف فولین-سیو-کالتیو، سدیم کربنات (Na_2CO_3) با خلوص ۹۹/۵٪، آلومینیوم کلرید شش آبه ($[Al(H_2O)_6]Cl_3$) با خلوص ۹۷٪ و متانول (CH_3OH) با خلوص ۹۹/۹۹٪ نیز از شرکت مرک تأمین گردید. پتاسیم استات (CH_3CO_2K) با خلوص ۹۷٪، دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازین (DPPH)، کوئرستین ($C_{15}H_{10}O_7$) سه‌آبه با خلوص ۱۰۰٪ از شرکت فلوکا و گالیک اسید ($C_7H_6O_5$) از شرکت سیگما-آلدریچ تهیه شد.

آماده‌سازی نمونه‌های چوب درون و چوب برون

پس از انتخاب درخت، چند دیسک چوب از آن برش داده شد و بعد چوب درون و چوب برون به‌صورت دستی جدا

گردید. بخش‌های مختلف چوب با استفاده از دستگاه آسیاب آزمایشگاهی و براساس استاندارد شماره T257 cm-85 از آیین‌نامه TAPPI به ذرات ریز تبدیل شد. در ادامه، ذرات حاصل با الک آزمایشگاهی جداسازی شدند و نمونه‌هایی با اندازه مش ۶۰ برای آزمایش‌ها انتخاب گردیدند. در مرحله بعد، بخش‌های جداشده از چوب درخت زیتون تلخ برای انجام آنالیزهای شیمیایی آماده شدند.

تعیین درصد رطوبت نمونه‌های آسیاب شده

برای تعیین رطوبت مواد اولیه، سه نمونه از مواد آماده‌شده به‌صورت تصادفی و با وزن یکسان انتخاب شدند. این نمونه‌ها پس از توزین اولیه، به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از این مدت، نمونه‌ها در دسیکاتور به‌منظور خنک شدن قرار داده شده و بعد دوباره وزن گردیدند. درصد رطوبت مواد اولیه با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد.

$$Mc = \frac{Mh - Md}{Md} \times 100$$ رابطه (۱)

که در آن، M_c درصد رطوبت نمونه‌ها، M_h وزن مرطوب مواد اولیه و M_d وزن خشک مواد است.

تعیین درصد مواد استخراجی

برای تعیین مواد استخراجی، از استاندارد شماره T204 cm-97آیین‌نامه TAPPI پیروی شد. ابتدا، ۱۰ گرم از آرد چوب تهیه‌شده از مواد اولیه در کارتوش قرار داده شد. سپس کارتوش حاوی آرد چوب، در بالن حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول قرار گرفته و سیستم سوکسوله نصب گردید. پس از اولین سیفون، فرایند استخراج به مدت ۶ ساعت تحت حرارت ادامه یافت. پس از اتمام استخراج، حلال موجود در بالن بازیابی شده و مواد باقی‌مانده در آون آزمایشگاهی با دمای ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد خشک شد. پس از خشک شدن و توزین مواد باقی‌مانده، درصد مواد استخراجی با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

رابطه (۲)

$$\text{درصد مواد استخراجی} = \frac{\text{وزن مواد استخراجی}}{\text{وزن مواد اولیه}} \times ۱۰۰$$

تهیه عصاره اتانولی با روش سوکسوله

از دستگاه سوکسوله برای استخراج عصاره و جداسازی مواد استخراجی از چوب درون و چوب برون استفاده شد. ابتدا پیش‌استخراج با محلول هگزان برای نمونه‌های چوب درون و چوب برون انجام شد تا چربی و اسانس موجود در آنها حذف شود. سپس با استفاده از استاندارد شماره T204 cm-97آیین‌نامه TAPPI، ۱۰ گرم از آرد چوب آماده شده در کارتوش قرار گرفت و کارتوش حاوی آرد چوب، در بالن حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر حلال اتانول جای‌گذاری شد. پس از نصب سیستم سوکسوله و انجام اولین سیفون، فرایند عصاره‌گیری به مدت ۶ ساعت تحت حرارت ادامه یافت.

تهیه عصاره اتانولی با روش غوطه‌وری

۱۰ گرم از نمونه‌های چوب درون و چوب برون آسیاب‌شده طی دو مرحله تحت فرایند عصاره‌گیری قرار گرفتند. در مرحله اول، چربی‌ها و اسانس‌های موجود با استفاده از محلول هگزان حذف شدند. در مرحله دوم، نمونه‌ها در ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول قرار گرفته و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از همزن مغناطیسی هم‌زده شدند (Saboura *et al.*, 2013).

تهیه عصاره اتانولی با روش التراسونیک

برای استخراج ترکیبات، ۱۰ گرم از چوب آسیاب‌شده با ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول در بشر مخلوط شد. مخلوط به مدت ۶ دقیقه در دو بازه زمانی ۳ دقیقه‌ای در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه التراسونیک با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز و دامنه ۵۰ درصد تیمار شد. پس از اتمام تیمار، حلال تبخیر شده و ماده جامد باقی‌مانده جمع‌آوری گردید (Pourebrahim *et al.*, 2020).

اندازه‌گیری محتوای تام فنولی

محتوای فنولی با استفاده از روش فولین سیو کالتیو اندازه‌گیری شد. بدین منظور، غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره هر نمونه تهیه شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیو کالتیو مخلوط و به‌مدت ۵ دقیقه هم‌زده شد. پس از آن، ۲ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات با غلظت ۷۵ گرم بر لیتر به مخلوط اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شده و بعد جذب آنها در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر فرابنفش نسبت به نمونه شاهد (متانول) اندازه‌گیری شد. نتایج به‌صورت مقادیر برابر با استاندارد گالیک اسید ارائه شد. برای این منظور، میانگین جذب نمونه‌ها در معادله خطی منحنی استاندارد گالیک اسید قرار داده شد و محتوای کل فنولی عصاره به‌صورت برابر میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره گزارش گردید (Ordone *et al.*, 2006).

اندازه‌گیری محتوای فلاونوئیدها

محتوای فلاونوئید هر عصاره از طریق روش رنگ‌سنجی ارزیابی شد. بدین منظور، عصاره‌ای با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر نمونه تهیه گردید. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۱۰ درصد آلومینیوم کلراید به آن افزوده شد. به‌دنبال آن، ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۱ مولار پتاسیم استات و در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به مخلوط اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و بعد جذب آن در طول موج ۴۱۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر دوگانه مرئی – فرابنفش اندازه‌گیری شد. منحنی کالیبراسیون با استفاده از کوئرستین به‌عنوان استاندارد رسم شد و محتوای فلاونوئید به‌صورت برابر میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم عصاره گزارش گردید (Chang *et al.*, 2002).

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با ارزیابی توانایی به دام‌اندازی رادیکال DPPH

ارزیابی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با روش به‌دام‌اندازی رادیکال دی‌فنیل‌پیکریل-۱-هیدرازیل (DPPH) انجام شد. در این آزمایش، از رادیکال‌های پایدار DPPH استفاده گردید. به‌منظور انجام آزمون، ۱ میلی‌لیتر از عصاره استخراج‌شده از چوب درون و چوب برون به همراه ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار DPPH مخلوط شد. این مخلوط پس از تکان دادن به‌خوبی به مدت ۱۵ دقیقه در یک محیط تاریک نگهداری شد. سپس جذب مخلوط توسط اسپکتروفتومتر فرابنفش در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از بلانک متانول اندازه‌گیری شد. بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول (BHA) به‌عنوان استاندارد استفاده گردید. عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف (برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر) آماده شدند و از مقادیر هم‌حجم حلال (آب یا متانول) همراه با DPPHبه‌عنوان بلانک استفاده شد. درصد به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH براساس رابطه زیر محاسبه گردید که در آن A_B نشان‌دهنده جذب بلانک و A_S نشان‌دهنده جذب نمونه یا استاندارد است.

$$\left[\frac{AB-AS}{AS}\right]\times 100 \qquad \text{رابطه (۳)}$$

شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره‌های استخراج شده

برای شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره‌های استخراج شده با روش‌های مختلف از دستگاه کروماتوگرافی گازی با طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) برای جداسازی و تعیین درصد هریک از اجزای عصاره استفاده شد. تجزیه GC توسط دستگاه Agilent 7890 انجام شد.

نتایج

تعیین درصد مواد استخراجی

جدول ۱ درصد مواد استخراجی چوب درون و چوب برون را در دو حالت قبل از پیش‌استخراج با هگزان و پس از پیش‌استخراج با استفاده از سه روش سوکسوله، غوطه‌وری و التراسونیک نشان می‌دهد.

جدول ۱- درصد مواد استخراجی عصاره چوب درون و چوب برون با استفاده از روش‌های سوکسوله، غوطه‌وری و التراسونیک، قبل و بعد از پیش‌استخراج با هگزان

Table 1- Percentage of extractive content from heartwood and sapwood extracts using soxhlet, immersion, and ultrasonic methods, before and after pre-extraction with hexane

Extractives Content (%)	Heartwood before pre-extraction with hexane	Sapwood before pre-extraction with hexane	Heartwood after pre-extraction	Sapwood after pre-extraction
Soxhlet	17.33	15.77	2.6	3.9
Immersion	-	-	1.63	2.5
Ultrasonic	-	-	1	0.3

شناسایی ترکیبات عصاره اتانولی استخراج شده با روش سوکسوله با آنالیز GC-MS

جدول ۲ ترکیبات شیمیایی شناسایی‌شده در عصاره اتانولی چوب درون و چوب برون استخراج‌شده با روش سوکسوله را ارائه می‌دهد. این ترکیبات از طریق آنالیز GC-MS جداسازی و شناسایی شده‌اند. براساس داده‌های جدول، ترکیبات فنولی مختلفی در چوب درون و چوب برون درخت زیتون تلخ شناسایی شده است. بیشترین درصد از ترکیبات فنولی متعلق به **متوکسی فنول** است که به‌عنوان ترکیب غالب در این آنالیز مشخص شده است. این نتایج نشان‌دهنده حضور ترکیبات زیست‌فعال قابل‌توجهی در گونه زیتون تلخ بوده و ظرفیت کاربردی آن را در صنایع دارویی و زیستی برجسته می‌سازد.

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی شناسایی‌شده در عصاره اتانولی چوب درون و چوب برون استخراج‌شده با روش سوکسوله

Table 2- Identified chemical compounds in ethanol extracts of heartwood and sapwood obtained using the soxhlet method.

Chemical Composition	Heartwood		Sapwood	
	Area (%)	Retention time (min)	Area (%)	Retention time (min)
3-Hydroxy-4-methoxybenzoic acid	1.15	7.889	1.45	7.993
Penta-methylbenzoic acid	0.52	9.269	-	-
4-(1-Hydroxyallyl)-2-methoxyphenol	12.79	9.772	14.17	9.824
1,2-Benzenedicarboxylic acid	1.81	11.957	-	-
Phenol, 2-(2-imidazo[1,2-a])	1.56	12.315	-	-
Propanone,1-phenyl-1	0.95	17.643	-	-
1,4-Benzenedicarboxylic acid	2.03	18.432	-	-
Benzaldehyde, 2,4-dihydroxy	1.97	20.108	-	-
Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)	-	-	0.42	6.566
Pentenyl angelate	-	-	0.38	8.153
Phenol, 3,4,5-trimethoxy	-	-	0.36	8.325
5-(2-Methoxy-phenyl)-3-morpholin	-	-	0.52	8.999
Squalene	-	-	0.27	19.086
3-Phenylpropionic acid	-	-	1.34	34.724

شناسایی ترکیبات عصاره اتانولی استخراج شده با روش غوطه‌وری با آنالیز GC-MS

جدول ۳ ترکیبات شیمیایی شناسایی‌شده از عصاره اتانولی چوب درون و چوب برون را که با روش غوطه‌وری استخراج شده‌اند نشان می‌دهد. این ترکیبات با استفاده از دستگاه GC-MS شناسایی و مشخص شده‌اند. براساس داده‌های جدول،

ترکیبات متنوعی ازجمله ترکیبات فنولی در چوب درون و چوب برون گونه زیتون تلخ شناسایی شده‌اند. بیشترین درصد ترکیبات شیمیایی شناسایی‌شده در عصاره حاصل از غوطه‌وری در چوب درون به **بتا–سیتوسترول** و در چوب برون به **متیل فنیل** اختصاص دارد. این نتایج نشان‌دهنده توان بالقوه عصاره چوب زیتون تلخ برای بهره‌برداری از ترکیبات زیست‌فعال با خواص آنتی‌اکسیدانی و کاربردهای صنعتی است.

جدول ۳- ترکیبات شیمیایی شناسایی‌شده در عصاره اتانولی چوب درون و چوب برون استخراج‌شده با روش غوطه‌وری

Table 3- Identified chemical compounds in ethanol extracts of heartwood and sapwood obtained using the immersion method.

Chemical Composition	Heartwood		Sapwood	
	Area (%)	Retention time (min)	Area (%)	Retention time (min)
3-Methyl-4-phenyl-1,2,4-oxadiazo	0.57	9.284	0.57	9.284
Carbofuran-3-hydroxy-7-phenol	0.6	9.881	0.60	9.881
1H-Indole, 5-methyl-2-phenyl	-	-	1.76	20.430
1-methyl-4-phenyl-5-thioxo	-	-	1.66	20.653
2,4-Imidazolidinedione, 5-(4-hydroxyphenyl)	0.57	9.284	-	-
3(Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol	0.6	9.881	-	-
1,2Benzenedicarboxylic acid	0.37	11.028	-	-
3,4-thiadiazolo[3,2-a]pyrimidin	0.09	17.628	-	-
methylenedioxybiphenyl-2-carboxylic acid	1.35	17.918	-	-
[4-(Ethylsulfanyl)phenyl]	1.35	17.918	-	-
Silicic acid	0.74	19.086	-	-
1-methyl-2-phenyl	1.76	20.430	-	-
beta.-Sitosterol	8.40	26.065	-	-

جدول ۴- ترکیبات شیمیایی شناسایی‌شده در عصاره اتانولی چوب درون و چوب برون استخراج‌شده با روش التراسونیک

Table 4- The compounds of the ethanolic extraction of the sapwood and heartwood with ultrasonication

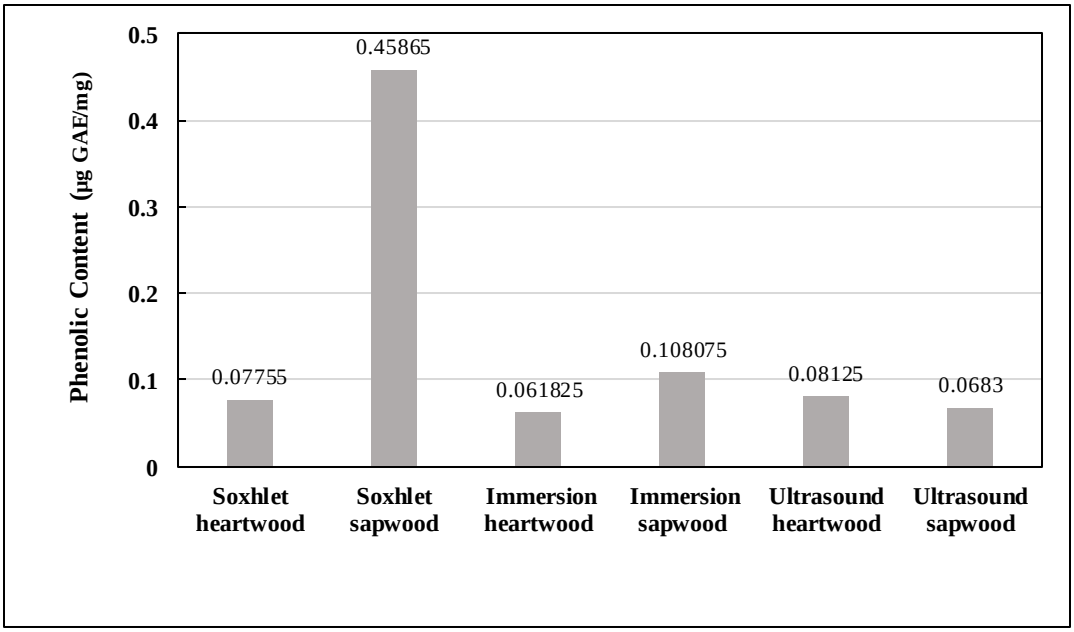
Chemical Composition	Heartwood		Sapwood	
	Area (%)	Retention time (min)	Area (%)	Retention time (min)
2,4-Imidazolidinedione	1.63	9.269	-	-
3-(Hydroxyprop-1-en-1-yl)-2-methoxyphenol	3.03	9.783	2.03	9.777
methoxy-phenyl	0.39	14.234	-	-
Methyl N-hydroxybenzenecarboximidoate	0.39	14.234	-	-
2-(2,3-Dimethoxyphenyl(methyl)benzoic acid	1.49	17.892	1.24	13.290
Benzenedicarboxylic acid	0.42	18.437	2.94	18.437
Squalene	0.46	19.091	1.03	19.091
Stigmasterol	1.23	24.928	1.73	24.923
Gentisic acid	-	-	1.44	11.536
Benzenediol	-	-	0.62	13.435
beta.-Sitosterol	-	-	9.13	26.106

شناسایی ترکیبات عصاره اتانولی استخراج شده با دستگاه التراسونیک با آنالیز GC-MS

جدول ۴ ترکیبات شیمیایی شناسایی‌شده در عصاره اتانولی چوب درون و چوب برون گونه زیتون تلخ را نشان می‌دهد که با استفاده از دستگاه التراسونیک استخراج شده‌اند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، ترکیبات مختلف فنولی در هر دو بخش چوب شناسایی شدند. بیشترین درصد ترکیبات فنولی در عصاره استخراج‌شده از چوب درون مربوط به ایمیدازولیدیندیون و در عصاره چوب برون مربوط به بتا-سیتوسترول بوده است.

اندازه‌گیری محتوای فنولی

شکل ۱ نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوای فنولی استخراج‌شده از عصاره چوب درون و چوب برون با استفاده از سه روش سوکسوله، غوطه‌وری و التراسونیک را نشان می‌دهد. بیشترین مقدار فنول استخراج‌شده مربوط به روش سوکسوله برای چوب برون است که میزان آن ۰/۴۵۸۶۵ میکروگرم گالیک اسید بر میلی‌گرم می‌باشد. کمترین مقدار فنول نیز از عصاره چوب درون استخراج‌شده با روش غوطه‌وری به‌دست آمده است که میزان آن ۰/۰۶۱۸۲۵ میکروگرم گالیک اسید بر میلی‌گرم گزارش شده است.



شکل ۱- میزان ترکیبات فنولی در عصاره‌های استخراج‌شده از چوب درون و چوب برون گونه زیتون تلخ

Figure 1. Phenolic compound content in the extracts obtained from heartwood and sapwood of *Melia azedarach*

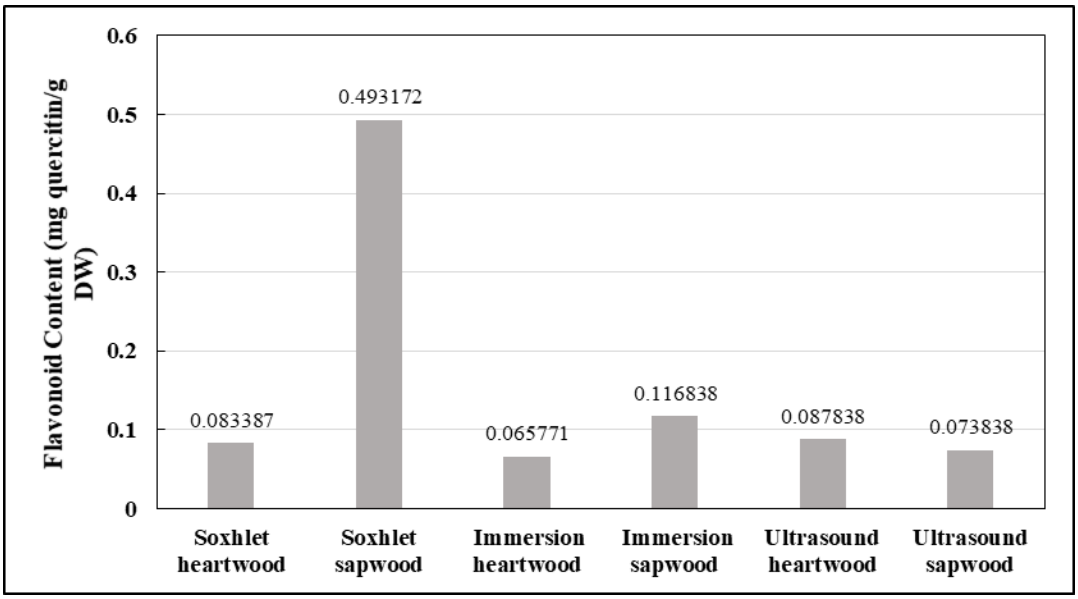
اندازه‌گیری محتوای مواد فلاونوئید

شکل ۲ میزان فلاونوئید استخراج‌شده از عصاره چوب درون و چوب برون با استفاده از سه روش سوکسوله، غوطه‌وری و التراسونیک را نشان می‌دهد. بیشترین مقدار فلاونوئید در عصاره چوب برون استخراج‌شده با روش سوکسوله به‌دست آمده است که مقدار آن ۰/۴۹۳۱۷۲ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم می‌باشد. کمترین مقدار فلاونوئید نیز در عصاره چوب درون استخراج‌شده با روش غوطه‌وری گزارش شده است که میزان آن ۰/۰۶۵۷۷۱ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم است.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

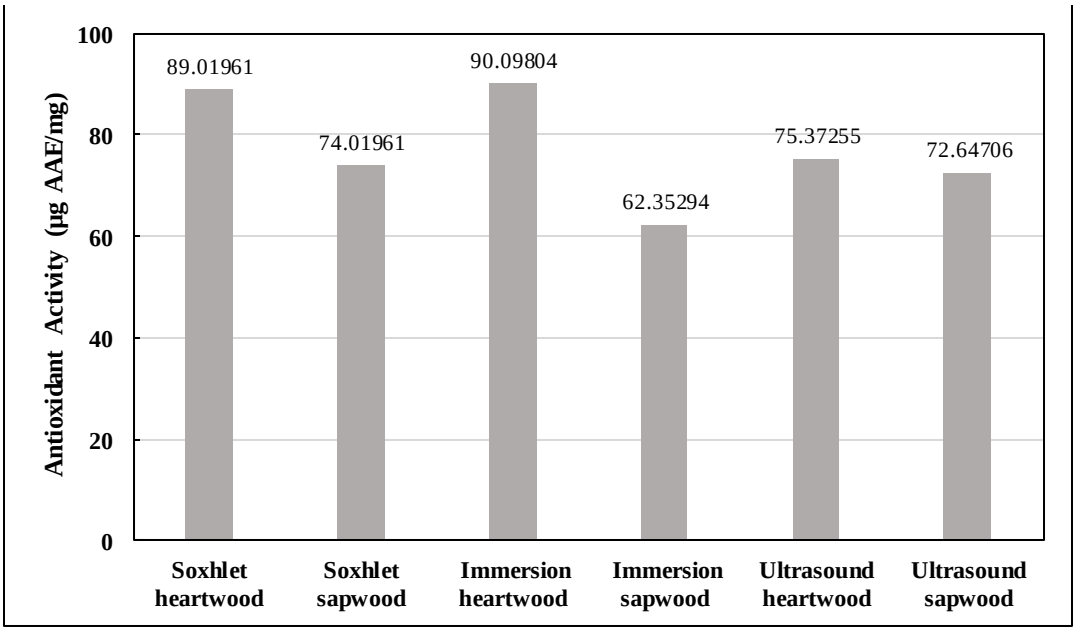
شکل ۳ میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج‌شده از چوب درون و چوب برون با سه روش

سوکسوله، غوطه‌وری و التراسونیک را از طریق ارزیابی توانایی به دام‌اندازی رادیکال DPPH نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که عصاره استخراج‌شده از چوب درون با روش‌های غوطه‌وری و سوکسوله فعالیت آنتی‌اکسیدانی تقریباً مشابهی با هم دارند.



شکل ۲- میزان ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره‌های استخراج‌شده از چوب درون و چوب برون گونه زیتون تلخ

Figure 2. Flavonoid content in the extracts obtained from heartwood and sapwood of *Melia azedarach*



شکل ۳- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌های استخراج‌شده از چوب درون و چوب برون گونه زیتون تلخ

Figure 3. Evaluation of Antioxidant Activity in Extracts from Heartwood and Sapwood of the Persian *Melia azedarach*

بحث

جدول ۱، مقدار مواد استخراجی چوب درون و چوب برون گونه زیتون تلخ را، قبل و بعد از پیش‌استخراج با هگزان و با استفاده از سه روش سوکسوله، غوطه‌وری و التراسونیک نشان می‌دهد. بیشترین درصد مواد استخراجی قبل از پیش‌استخراج با هگزان مربوط به چوب درون این گونه است. همچنین، بیشترین درصد مواد استخراجی پس از پیش‌استخراج با هگزان، به روش سوکسوله و از چوب برون زیتون تلخ به‌دست آمده است. البته کاهش درصد مواد استخراجی در چوب درون ممکن است به دلیل خروج بیشتر مواد فرار در طی پیش‌استخراج باشد.

آنالیز GC-MS عصاره‌های استخراج‌شده با روش سوکسوله نشان داد که ترکیبات فنولی مختلفی در چوب درون و چوب برون این گونه وجود دارند. بیشترین درصد ترکیبات فنولی مربوط به متوکسی فنول است. از ترکیبات شناسایی‌شده در چوب درون می‌توان به بنزن دی‌کربوکسیلیک اسید اشاره کرد که به‌عنوان یکی از ترکیبات فنولی مهم شناخته می‌شود. در چوب برون، ترکیباتی مانند متوکسی فنیل مورفولین و اسکوالن شناسایی شدند که ترکیب اول از ترکیبات مهم صنعتی به‌شمار می‌رود. در عصاره‌های استخراج‌شده با روش غوطه‌وری، بیشترین درصد ترکیبات فنولی در چوب درون مربوط به بتا-سیتوسترول بود. بتا-سیتوسترول از خانواده استرول‌ها است و به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی خود شناخته شده است (Ameli *et al.*, 2022). یکی از ترکیبات مهم شناسایی‌شده در هر دو بخش چوب، استیگماسترول است که از اعضای خانواده فیتواسترول‌ها محسوب می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که این ترکیب اثر سایتوتوکسیک بر سرطان‌های مختلف ازجمله سرطان معده، ریه، کبد، سینه، پروستات و تخمدان دارد (Ameli *et al.*, 2022). همچنین، در چوب برون، ترکیب جنتیزیک اسید شناسایی شد. این ترکیب یک اسید دی‌هیدروکسی‌بنزوئیک است و به‌عنوان یک ترکیب فنولی با خواص آنتی‌اکسیدانی شناخته می‌شود (Mardani *et al.*, 2019). در نهایت، ترکیب بتا-سیتوسترول که در چوب درون گونه زیتون تلخ شناسایی شده است، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی است و از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد.

روش فولین-سیوکالتیو یکی از رایج‌ترین روش‌ها برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولی است. اساس این روش بر کاهش (احیا) معرف فولین توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی استوار است که منجر به تشکیل کمپلکس آبی رنگی می‌شود که حداکثر جذب آن در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرار دارد (Salmanian *et al.*, 2013). به‌طورکلی، افزایش غلظت ترکیبات فنولی به‌طور مستقیم توانایی عصاره‌ها را در مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال انتقال هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد. توانایی مهارکنندگی فنول‌ها به دلیل وجود گروه‌های هیدروکسیل و گروه‌های قابل تعویض متوکسی در مولکول‌های آنهاست (Cai *et al.*, 2006). فنول‌ها گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه با بیش از ده هزار ترکیب طبیعی هستند که دارای خواص زیستی گسترده‌ای می‌باشند (Minatel *et al.*, 2017). این ترکیبات شامل یک یا چند گروه هیدروکسیل متصل به حلقه‌های آروماتیک هستند و براساس ساختار شیمیایی به دسته‌های مختلفی ازجمله فنول‌های ساده، فنولیک اسیدها، کومارین‌ها، فلاونوئیدها، استیلبن‌ها، تانن‌های متراکم و لیگنان‌ها تقسیم می‌شوند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی عمدتاً به دلیل خواص اکسایشی و کاهشی آنها و ساختار شیمیایی خاص آنها است که نقش مهمی در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، فلزات واسطه و مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه‌گانه ایفا می‌کنند. این ویژگی‌ها ارتباط مستقیمی با تأثیرات آنتی‌اکسیدانی فنول‌ها بر سلامت دارند و به توانایی آنها در مهار پیشرفت بسیاری از بیماری‌های مرتبط با تنش اکسایشی بازمی‌گردد (Karaman *et al.*, 2010). فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی عصاره‌های گیاهی ارتباط نزدیکی با محتوای بالای فنول‌ها و فلاونوئیدهای موجود در آنها دارد. در میان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری شناخته می‌شوند.

فلاونوئیدها مهارکننده‌های قوی رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسید هستند، هرچند تأثیر آنها بر رادیکال‌های سوپراکسید هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است. این ترکیبات حتی زمانی که با یون‌های فلزی کمپلکس تشکیل می‌دهند، توانایی اثرگذاری بر رادیکال‌های آزاد را حفظ می‌کنند. وجود گروه‌های هیدروکسیل در موقعیت‌های ۳ و ۵ و گروه‌های اورتودی‌فنول در ساختار فلاونوئیدها به آنها امکان می‌دهد تا رادیکال‌های آزاد را مهار کنند. همچنین، افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل با قدرت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها رابطه مستقیمی دارد (Koda *et al.*, 2008).

شکل ۳ میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج‌شده از چوب درون و چوب برون را با استفاده از سه روش سوکسوله، غوطه‌وری و التراسونیک براساس توانایی مهار رادیکال DPPH نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که عصاره استخراج‌شده از چوب درون با روش‌های غوطه‌وری و سوکسوله، فعالیت آنتی‌اکسیدانی تقریباً مشابهی دارند. مطالعات پیشین نیز نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند؛ به‌عنوان‌مثال، Shukla و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH به غلظت عصاره‌های گیاهی وابسته است و با افزایش غلظت، اثر مهارکنندگی نیز شدت می‌یابد. ترکیبات موجود در این عصاره‌ها قادر به انتقال الکترون به رادیکال‌های آزاد فعال هستند و زنجیره واکنش رادیکال‌های آزاد را متوقف می‌کنند. این ویژگی‌ها نشان‌دهنده ظرفیت بالای عصاره‌های گیاهی در کاربردهای آنتی‌اکسیدانی، ازجمله در صنایع دارویی و غذایی است.

References

-Ameli, M., Jahani, Sh., Jahan-Tighi, H. and Noori, Sh., 2022. Evaluation of anti-tumor and apoptotic effects of stigmasterol on MCL-1 and BCL-XL gene expression in animal models of breast cancer. Research in Medicine, 46(2): 11-18.

-Biskup, I., Golonka, I., Gamian, A. and Sroka, Z., 2013. Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods. Postepy Hig Med Dosw (Online), 67: 958-963.

-Cai, Y. Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q. and Corke, H., 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. Life Science, 78: 2872-2888.

-Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Food Drug Analysis, 10: 178-182.

-Cheng, Z., Ren, J., Li, Y., Chang, W. and Chen, Z., 2003. Establishment of a quantitative structure-activity relationship model for evaluating and predicting the protective potentials of phenolic antioxidants on lipid peroxidation. Journal of Pharmaceutical Science, 92(3): 475-484.

-Farhoosh, R., Johnny, S., Asnaashari, M., Molaahmadibahraseman, N. and Sharif, A., 2016. Structure antioxidant activity relationships of o-hydroxyl, o-methoxy, and alkyl ester derivatives of p hydroxybenzoic acid. Food Chemistry, 194: 128-134.

-Koda, T., Kuroda, Y. and Imai, H., 2008. Protective effect of rutin against spatial memory impairment induced by trimethyltin in rats. Nutrition Research, 28: 629–634.

-Karaman, S., Tutem, E., Baskan, K. S. and Apak, R., 2010. Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC–CUPRAC assay. Food Chemistry, 120: 1201-1209.

-Mardani, A., Farnoosh, R. and Sharifi, A., 2019. Antioxidant Activity of Gentisic and Alpha-resorcylic Acids in Bulk Oils and Emulsions. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 14(5): 743-753. (In Persian).

-Marinova, E. M. and Yanishlieva, N. V., 2003. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. Food Chemistry, 81(2): 189-197.

-Minatel, I. O., Borges, C. V., Ferreira, M. I., Gomez, H. A. G., Chen, C. Y. O. and Lima, G. P. P., 2017. Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. In: Phenolic Compounds- Biological Activity (eds. Soto-hernandez, M., Tenango, M. P. and Garcia-Mateos M. R.): 1-24.

-Mollaei, S. and Ebadi, M., 2022. A review of phenolic antioxidants isolated from endophytic fungi. Journal of Plant Process and Function, 51(1): 99-117.

-Ordone, A. A. L., Gomez, J. D. and Vattuone, M. A., 2006 Antioxidant activities of Sechium edule (Jacq.)

Swartz extracts. Food Chemistry, 97(3): 452-58.
-Pourebrahim, N., Elhamirad, A. M., Einafshar, S. and Armin, M. 2023. Effect of Ultrasound-assisted Extraction Method on the Content of Phenolic Compounds and Anti-Oxidant Properties of Damask Rose (*Rosa Damascena* Mill.) Extract. Journal of Innovation in Food Science and Technology, 15(2): 1-14.
-Saboura, A., Ahmadi, A. and Parsa, M., 2013. Comparison Between the Contents of Phenolic and Flavonoid Compounds and Aerial Part Antioxidant Activity in *Scutellaria pinnatifida* in Two NorthIranian Populations. Journal of Rafsanjan Medical Sciences, 13(3): 249-266.
-Salmanian, Sh, Sadeghi Mahoonak, A. R., Alami, M. and Ghorbani, M., 2013. Determination of antiradical and antioxidant activities and flavonoid content in hawthorn fruit (*Crataegus elbursensis*). Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 8 (1): 177-185. (In Persian).
-Shrestha, S., Ferrarese, I., Sut, S., Zengin, G., Grana, S., Ak, G., Pant, D., Dall'Acqua, S. and Rajbhandarya, S., 2021. Phytochemical Investigations and in Vitro Bioactivity Screening on Melia azedarach L. Leaves Extract from Nepal. Chemistry and Biodiversity, DOI: 10.1002/cbdv.202001070.
-Shukla, Sh., Mehta, A., Bajpai, V. K. and Shukla, S., 2009. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. Food Chemical Toxicol, 47: 2338-2343.
-Verpoorte, R., Contin, A. and Memelink, J., 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phyto chemistry Reviews, 1(1): 13-25.