ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی و تعیین میزان محتوای فنلی و فلاونوئیدی کل عصاره آبی و متانولی گیاه دارویی چای ترش *Hibiscus sabdarifa*

۱- فاطمه مقصودی۲-وحید اکبرپور* ۳-مصطفی گواهی ٤-حسین مرادی

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم‌کشاورزی و منابع‌طبیعی ساری، ساری، ایران

۲- استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران (نویسنده مسئول)

۳- استادیار گروه نانو زیست فناوری،دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل،آمل، ایران

٤- استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

Email: fateme.maghsoudi75gmail.com[۱]
Email: v_akbarpour60@yahoo.com[۲]
Email: mostafagovahi@gmail.com[۳]
Email: h.moradi@sanru.ac.ir[٤]

چکیده:

گیاه چای‌ترش با نام علمی *Hibiscus sabdariffa* از خانواده Malvaceae می‌باشد. این گیاه بومی مناطق گرم است و در ایران در بلوچستان و جیرفت نیز کشت می‌شود. در این پژوهش، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای تام ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره آبی و متانولی کاسبرگ چای‌ترش مورد بررسی قرار گرفت. از کاسبرگ‌های خشک‌شده‌ی چای ترش جهت تهیه‌ی عصاره‌های آبی و متانولی استفاده گردید و اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره با روش (۲و ۲ -دی فنیل ۱ -پیکریل هیدرازیل) DPPH سنجیده شد. هم چنین محتوای فنلی و فلاونوئیدی کل نیز مورد بررسی قرار گرفت. میزان فنل کل کاسبرگ چای‌ترش در عصاره‌های آبی و متانولی به ترتیب ۲/۶۲± ۱۹/۷۳ و ۳/۷۴±۲۸/۴۰ (میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره) و میزان فلاونوئید کل در عصاره‌های آبی و متانولی به ترتیب ۱/۷۵±۳/۶۶ و ۱/۷۵±۵/۸۸ (میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره) به‌دست آمد. همچنین نتایج نشان داد که غلظت عصاره‌ها و آنتی‌اکسیدان سنتزی تاثیر معنی‌داری بر مهار رادیکال آزاد DPPH دارد ($P<0.05$).

کلمات کلیدی: آنتی اکسیدان، فنل، فلاونوئید، عصاره چای ترش، حلال

۱– مقدمه

گیاهان از زمان قدیم نقش مهمی در حفظ سلامتی و بهبود کیفیت زندگی انسان‌ها داشته‌اند. طی سال های اخیر فرآورده‌های گیاهی (متابولیت‌های ثانویه) به دلیل دسترسی آسان، راحتی کاربرد و اثرات جانبی کمتر در مقایسه با فرآورده‌های شیمیایی بیشتر مورد توجه‌اند [۷]. یکی از مهمترین محصولات گیاهان دارویی، عصاره آنها است. عصاره که حاوی انواع مولکول‌های فرار، شامل ترپنوئیدها و ترکیبات آروماتیک و آلیفاتیک می‌باشد، از اندام‌های مختلف گیاهی از جمله برگ‌ها، میوه، ریشه، گل و چوب گیاه به دست می آید [۹]. فنل، فلاونوئید و کاروتنوئید از مهمترین متابولیت های ثانویه هستند که در قسمت های مختلف گیاهان مانند برگ، ساقه و شاخه ها وجود دارند. حلالیت ترکیبات فنلی توسط نوع حلال (قطبیت) استفاده شده، درجه پلیمریزه شدن فنل‌ها و تعاملات بین آنها تعیین می‌شود[۶].

آنتی اکسیدان‌ها به ترکیباتی گفته می‌شود که به طور مؤثر و به طرق مختلف از واکنش رادیکال‌های آزاد به شکل‌های اکسیژن و نیتروژن فعال با زیست مولکول‌هایی نظیر پروتئین، آمینواسید، لیپید و DNA، جلوگیری کرده و منجر به کاهش آسیب و مرگ سلولی، بیماری‌های قلبی- عروقی و سرطان‌ها می‌شوند [۳]. یکی از شاخه‌های آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ترکیبات فنلی هستند که به مقدار فراوان در گیاهان یافت می‌شوند. ترکیبات فنلی یک گروه از متابولیت‌های ثانویه هستند که میزان و تنوع آنها در حین رشد گیاهان تحت تأثیر ژنتیک، شرایط رشد، پرورش و عوامل آب و هوایی است [۳]. امروزه گیاهان دارویی به عنوان منابع طبیعی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند [۹].

آنتی‌اکسیدان‌ها به دو صورت طبیعی و سنتزی وجود دارند.BHT از متداول‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی است که استفاده از این نوع آنتی‌اکسیدان‌ها به دلیل اثرات جانبی منفی بر سلامتی به میزان زیادی محدود شده است. لذا در سال‌های اخیر، تحقیق بر روی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی جدیدتر، خصوصاً با منشا گیاهی به علت اهمیت چنین مولکول‌هایی در فارماکولوژی، صنایع آرایشی و غذایی افزایش یافته است. گیاهان منابع غنی از فیتوکمیکال، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و دیگر محصولات با ارزش بیوتکنولوژیکی بالا می باشند. ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی که انتشار وسیعی در گیاهان دارند از جمله‌ی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند با توجه به اینکه آنتی اکسیدان‌های سنتزی مانند BHT دارای خاصیت سرطان‌زایی بوده، به همین دلیل استفاده و جایگزین کردن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در دسترس (بویژه در منابع گیاهی) در صنایع غذایی و دارویی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد [۱و۱۱].

چای ترش در واقع گونه‌ی گیاهی است با نام علمی *Hibiscus sabdarifa* از خانواده‌ی Malvaceae که در کشورهای مختلف به نام‌های محلّی مختلفی شهرت دارد. در ایران بیشتر به عنوان چای ترش (Tea Sour) معروف است. بیش از ۳۳۳ گونه از این گیاه در دنیا در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر یافت می‌شود. زیستگاه اصلی این گیاه غرب آفریقاست و امروزه در سطح وسیعی در غرب آفریقا، آسیا، استرالیا از هند تا مالزی، اتریش، آمریکای مرکزی و بسیاری از کشورهای گرمسیری کشت می‌شود. این گیاه بومی ایران نمی‌باشد و کشت و کار آن در ایران در استان سیستان و بلوچستان و جیرفت گزارش شده است [۷].

ترکیبات فنلی موجود در این گیاه شامل اسیدهای آلی و فنلیک مانند اسید سیتریک، اسید هیدروکسی سیتریک و اسید هیبیسکوس است. فلاونوئیدها مانند کوئرستین، لوتئولین یا گوسیپتین و گلیکوزیدهای مربوطه آنها نیز وجود دارد [۱۰]. هدف از

ایـن مطالعـه، ارزیـابی قـدرت آنتی‌اکسیدانی و بررسی محتوی فنل تام، فلاونوئیدی، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی آبی و متانولی گیاه چای‌ترش می‌باشد.

۲–مواد و روش‌ها:

به منظور تهیه عصاره آبی و متانولی گیاه چای ترش (*Hibiscus sabdariffa*) کاسبرگ‌های خشک شده‌ی گیاه چای‌ترش از بازار محلی بهشهر تهیه گردید و تأئید گیاهشناسی روی جنس و گونه آن انجام گرفت به‌منظور تهیه عصاره‌های آبی و متانولی(۸۰ ٪) ابتدا کاسبرگ‌های خشک شده پودر شده و عصاره‌گیری به‌روش خیساندن انجام شد. برای این منظور، ده گرم از کاسبرگ خشک‌شده گیاه چای‌ترش با ترازوی دیجیتالی وزن و به‌نسبت ۱ به ۱۰ در حلال‌های مورد نظر ریخته شد و به مدت ۷۲ ساعت در درون انکوباتور شیکردار قرار داده شد. در انتها، پس از سانتریفیوژ، عصاره توسط کاغذ صافی واتمن صاف شده و تفاله گیاهی از عصاره جدا گردید و پس از خشک شدن عصاره‌ها به‌وسیله تیغه فلزی از روی سطح پلیت‌های شیشه‌ای خراش داده شد و پودر حاصله برای انجام آزمایش‌های بعدی به دلیل حساسیت عصاره، تا زمان آنالیز در دمای ۴ سانتی گراد نگهداری شدند.

۲–۱–سنجش ترکیبات فنلی:

مقدار فنل کل با استفاده از معرف فولین–سیوکالتیو و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-Vis(Visible-UV CARY 300 Conc) اندازه‌گیری شد. عصاره با نسبت ۱ به ۱۰ میلی گرم در لیتر تهیه شد. ۰/۵ میلی لیتر از هر عصاره با ۲۵ میلی لیتر واکنش‌گر ۰/۲ نرمال فولین سیوکالتیو مخلوط و به‌مدت ۵ دقیقه هم زده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد اضافه شد. پس از ورتکس جذب نمونه‌ها پس از ۵۰ دقیقه در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک قرائت شد [۸].

۲–۲–سنجش ترکیبات فلاونوییدی:

جهت اندازه‌گیـری ترکیبـات فلاونوییـدی از کلریـد آلومینیـوم بـه عنوان معرف اسـتفاده شـد. عصاره با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل و ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد. سپس، ۰/۱ میلی‌لیتر محلول پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به این مخلوط اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب مخلوط حاصله در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد [٤].

۲-۳-روش ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد درDPPH:

در این روش، از رادیکال‌های آزاد (DPPH (2, 2 -diphenyl - 1 -picrylhydrazyl بـه عنوان معرف اسـتفاده شد و فعالیـت اتـم‌های هیـدروژن و الکترون عصاره‌ها از طریق بی رنگ شدن محلـول بـنفش پررنـگ DPPH اندازه گیری شد. غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها به همراه ۱ میلی لیتر از DPPH ۰/۱ میلی مولار و ۱ میلی لیتر متانول تهیه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه قرار دادن در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با DPPH در مقابل بلانک توسط دستگاه UV- Vis قرائت شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید.

$$I\ (\%) = (A_0 - A_s)/A_0 \times 100$$

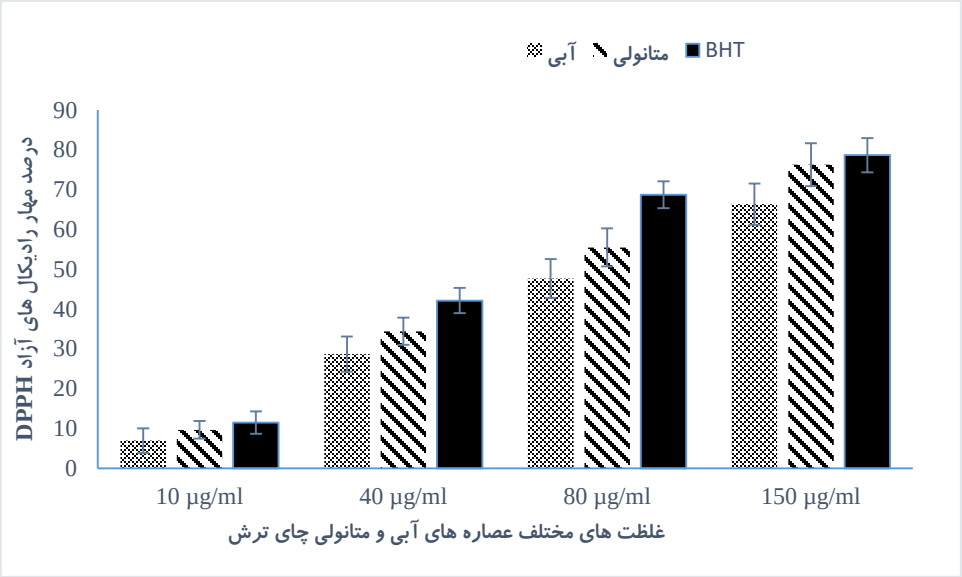
که در اینجا A_0 جذب کنترل (حاوی همه اجزا واکنشگر بدون نمونه) A_S جذب نمونه و I میزان مهارکنندگی رادیکالDPPH می‌باشد.

آنالیز آماری: آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. آنالیز واریانس با استفاده از (ANOVA) یکطرفه و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در نرم افزار SPSS در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

۳-نتایج:

۳-۱-میزان فنل کل و فلاونوئید کل

میزان کل ترکیبات فنلی به روش فولین سـیوکالتو و بر اساس منحنی استاندارد گالیک اسید تعیین شد. مقایسه میانگین داده‌های فنل کل و فلاونوئید کل عصاره چای ترش حاکی از تفاوت معنی دار این ترکیبات در حلال‌های مختلف می‌باشد ($P<0.05$). نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که میزان فنل کل در عصاره‌های آبی و متانولی به ترتیب ۲/۶۲± ۱۹/۷۳ میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم عصـاره و ۳/۷۴±۲۸/۴۰ میلی گرم گالیک اسـید در گرم عصـاره می‌باشـد. همچنین مقدار فلاونوئید کل در عصاره‌های آبی و متانولی به ترتیب ۱/۷۵±۳/۶۶ و ۱/۷۵±۵/۸۸ میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره می‌باشد.



نمودار۳-۱- مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH غلظت های مختلف عصاره‌های آبی و متانولی و آنتی اکسیدانی گیاه چای ترش

۳-۲-فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

گیاهان برای بقا در مقابل تغییرات محیط اکسیداتیو اطرافشان، از طیف متنوعی از مولکول‌ها با ساختارها و اعمال متفاوت جهت پاکسازی رادیکال‌های آزاد استفاده می‌کنند، به‌همین دلیل معمولاً در ارزیابی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی، از سیستم‌های متفاوتی نیز استفاده می‌شود در مطالعه حاضر از روش به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH استفاده شده است. نمودار ۱، میزان کاهش جذب DPPH را در غلظت های مختلف عصاره های آبی، متانولی و آنتی اکسیدان سنتزی BHT نشان می دهد. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که غلظت‌های عصاره‌های آبی، متانولی و آنتی اکسیدان سنتزی تأثیر معنی داری بر مهار رادیکال DPPH دارد ($P<0.05$). فعالیت ضد رادیکالی در عصاره‌های آبی و متانولی گیاه چای‌ترش و همچنین BHT وابسته به غلظت بود. به طوری که با افزایش غلظت عصاره‌ها بر حسب میکرو گرم بر میلی‌لیتر، درصد مهارکنندگی عصاره‌های آبی و متانولی به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. در تمامی غلظت های مورد بررسی، آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT فعالیت ضد رادیکالی بالاتری را به خود اختصاص داد. میزان IC_{50} عصاره های آبی، متانولی و BHT ۸۴/۳، ۷۵/۸ و ۵۴/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

۴-بحث:

عوامل متعددی می‌تواند بر میزان استخراج ترکیبات فنلی تأثیرگذار باشد مانند مراحل آماده‌سازی گیاه (نحوه خشک کردن، زمان و دمای عصاره‌گیری، نمونه گیاهی، نوع گونه، مرحله نمو، شرایط محیطی گیاه و روش‌های سنجش ترکیبات فنلی. این پژوهش نشان داد که عصاره‌ی متانولی گیاه چای‌ترش نسبت به عصاره‌ی آبی دارای قابلیت مهارکنندگی بیشتری برای رادیکال‌های آزاد می‌باشد. این فعالیت عمدتاً به دلیل وجود قدرت اکسیداسیون- احیا است که می تواند نقش مهمی در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد داشته باشد. این فعالیت به طور معمول مربوط به گروه‌های هیدروکسیل فنلی می‌باشد. معمولاً انتخاب حلال‌ها برای استخراج با توجه به هدف مطالعه، ماهیت ترکیبات، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ماده، قابل دسترس بودن مواد و تجهیزات انجام می شود در استخراج ترکیبات فنلی، قطبیت حلال‌ها در افزایش حلالیت فنل‌ها نقش بسیار مهمی دارد مانند دیگر تحقیقات انجام شده، در این آزمایش نیز حلال نقش مؤثری در میزان ترکیبات فنلی داشت. وجود آب و متانول (۸۰٪) سبب استخراج دامنه وسیع‌تری از ترکیبات فنلی می‌شود. از دلایل دیگر مناسب‌تر بودن این حلال در استخراج ترکیبات فنلی، ویژگی‌های ساختاری گونه مورد مطالعه است [۳].

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ویژگی های حلال مورد استفاده جهت استخراج ترکیبات فنلی به میزان زیادی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها را تحت تاثیر قرار داد. کاسبرگ چای‌ترش به دلیل غنی بودن از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی دارای پتانسیل فعالیت آنتی اکسیدانی بالقوه ای است. از آنجا که متابولیت‌های ثانویه مشتق شده از گیاهان مانند فنل و فلاونوئید دارای پتانسیل قوی برای پاکسازی رایکال‌های آزاد میباشند. مخلوط متانول- آب و یا متانول به تنهایی برای استخراج ترکیبات فنلی به ویژه فلاونوئیدها و اسیدهای فنلی از بافت گیاهی به کار میرود. افزایش غلظت ترکیبات فنلی به طور مستقیم میزان توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار رایکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. در بین ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها ترکیبات آنتی اکسیدانی قویتری محسوب می‌شوند. فلاونوئیدها بازدارنده‌های قوی رایکال‌های هیدروکسیل و پراکسید هستند. چندین روش برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی وجود دارد. در تحقیق حاضر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به روش ظرفیت مهار رایکال‌های آزاد DPPH، مورد سنجش قرار گرفت. فعالیت مهارکنندگی رایکال‌های آزاد در روش DPPH بستگی به غلظت عصاره‌های گیاهی دارد. با افزایش غلظت، توانایی دادن الکترون‌ها به رایکال های آزاد و در نتیجه قدرت مهارکنندگی شدت میابد و واکنش زنجیره‌ای رایکال های آزاد متوقف میشود [۱].

حلالیت ترکیبات فنلی توسط نوع حلال (قطبیت) استفاده شده، درجه پلیمریزه شدن فنل ها و تعاملات بین آنها اداره می شود به عنوان مثال؛ مشاهده شده است که متانول مطلق در مقایسه با آب برای استخراج پلی‌فنل‌ها از پساب‌های کشاورزی و در مقایسه با استون ۵۰٪ برای استخراج فنل‌ها از گندم مؤثرتر است، بنابراین امروزه جهت استخراج مواد مؤثره گیاهی از حلال های مختلفی استفاده میشود. Hossain و همکاران در سال ۲۰۱۵ بیان کردند که قدرت آنتی اکسیدانی گیاهان ممکن است تحت تأثیر نوع حلال مورد استفاده قرار گیرد. به‌طوریکه بیشترین قدرت آنتی‌اکسیدانی در مطالعه آنها مربوط به عصاره هیدروالکلی بود [٦].

در تحقیقی تاثیر تیمار حلال های متانول، اتانول، استون و آب مقطر بر روی میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی، فنل کل، تانن‌ها، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها(میوه عناب) بررسی شد و به این نتیجه رسیدند که استون در استخراج ترکیبات فنل و فلاونوئید کل بهترین عملکرد را در میان سایر حلال‌ها داشته است. استخراج آنتوسیانین و استخراج تانن با متانول دارای بالاترین بازده استخراج بوده است. در اکثر گزارش‌ها آب از حداقل قابلیت استخراج متابولیت‌های ثانویه در بین سایر حلال‌ها برخوردار بوده است. در تحقیقی استخراج ترکیبات فنلی برگ گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) با دو روش استخراج(غرقابی و ماکروویو) و حلال‌های آب، متانول و اتانول در زمان های مختلف بررسی و به این نتیجه رسیدند که در هر دو روش، عصاره اتانولی بیشترین راندمان و عصاره آبی کمترین راندمان را در استخراج ترکیبات فنلی دارا بوده است. در تحقیقی مقایسه محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام هوایی دو جمعیت گیاه بشقابی سنبله ای در شمال ایران بررسی و به این نتیجه رسیدند که میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی تام عصاره‌ها تحت تاثیر سه عامل جمعیت، روش استخراج و نوع حلال بوده و بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره متانولی و کمترین میزان را در عصاره آبی به دست آوردند [۵]

نتایج مطالعه نشان داد که عصاره‌ی هیدروالکلی (متانولی) *H. sabdariffa L* حاوی بالاترین ترکیبات فنلی نسبت به عصاره‌ی آبی است. الکل حلال بهتری نسبت به آب برای استخراج فنل از *H. sabdariffa L.* calyx است و این نتیجه با Anokwuru (۲۰۱۱) و همکارانش مطابقت دارد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش غلظت عصاره روزل افزایش می یابد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره روزل به شدت با محتوای آنتوسیانین آن مرتبط است. با توجه به Duh و Yen (۱۹۹۷)، عصاره روزل یک اهداکننده الکترون است و می تواند با رادیکال های آزاد واکنش دهد تا آنها را به محصولات پایدارتر تبدیل کند و خاتمه دهد. نتایج فالاده و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد که عصاره گل روزل دارای محتوای اسید اسکوربیک یا آسکوربات بسیار بالایی است که یک آنتی‌اکسیدان طبیعی شناخته شده و عامل کاهنده عالی است [۲].

۵-نتیجه‌گیری:

تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی چای ترش در این تحقیق نشان داد که عصاره هیدروالکلی(متانولی) گیاه چای‌ترش دارای قابلیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد می‌باشند. این فعالیت عمدتاً به دلیل وجود قدرت اکسیداسیون- احیا است که می تواند نقش مهمی در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد داشته باشد. یافته‌های این پژوهش با گزارش‌های قبلی مبتنی بر ارتباط مستقیم اجزای فنولیک با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطابقت داشت. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که انتخاب نوع حلال بر میزان استخراج ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی موثر است و از طرفی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی به میزان زیادی تحت تأثیر ماهیت حلال، زمان استخراج و غلظت است. در این مطالعه، با توجه به نتایج به دست آمده از ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهان مختلف استخراج شده با حلال‌های متفاوت می‌توان گفت که از بین حلال‌های مختلف به کار رفته (متانولی و آبی) حلال متانولی عملکرد بهتری در ارتباط با استخراج فنل، فلاونوئید و میزان مهار رادیکال‌های آزاد داشت، در حالی که حلال آبی عملکرد ضعیف‌تری نسبت به حلال آبی نشان داد.

۶-مراجع:

[1]. AGHAKHAH RAZLIGHI, Z., Abdolhossein, R., Larijani, K. (2019). Investigation of total phenolic and flavonoid contents, and evaluation of antioxidant activities of *Verbascum cheiranthifolium* Boiss. extract from Kolakchal region, Tehran Province. *Applied Biology*, 8(32), 53-62.

[2]. Al-Hashimi, A. G. (2012). Antioxidant and antibacterial activities of Hibiscus sabdariffa L. extracts. *African Journal of Food Science*, *6*(21), 506-511.

[3]. BABAKHANI, A., & SARZARE, A. (2016). OPTIMIZATION OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS EXTRACTION FROM AZOLLA FERN, AZOLLA FILICULOIDES.

[4]. Chang, Y .L., Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(13), 3713–3717.

[5]. Fazeli-nasab, B., Moshtaghi, N., & Forouzandeh, M. (2019). Effect of Solvent Extraction on Phenol, Flavonoids and Antioxidant Activity of some Iranian Native Herbs. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*, *27*(3), 14–26

[6]. Gavyar, P., & Amiri, H. (2019). Chemical composition of essential oil and antioxidant activity of *postia puberula*, an endemic species from Iran. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, *18*, 119-128.

[7]. Javadian, F., Sepehri, Z., Amraee, M., Kiani, Z., Shahraki Mojahed, M., Shahi, Z., & Pourghasemi Fetideh, S. (2015). An Evaluation of Antibacterial activity of Ethanolic Extract of sour tea (Hibiscus Sabdariffa) against Klebsiella Pneumoniae Resistant to antibiotics. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 22(4), 565-570.

[8]. Ordoñez, A. A. L., Gomez, J. D., Vattuone, M. A., & Isla, M. I. (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry*, *97*(3), 452–458.

[9]. Rashidi, M., MOSLEHISHAD, M., ZIARATI, P., & Ghamari, F. (2018). Antioxidant and antimicrobial activity of *Hibiscus gossypifolius* and *Hypericum perforatum* against *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

[10]. Thovhogi, N., Diallo, A., Gurib-Fakim, A., & Maaza, M. (2015). Nanoparticles green synthesis by *Hibiscus sabdariffa* flower extract: main physical properties. *Journal of Alloys and Compounds*, *647*, 392-396.

[11]. Zarinkamar, F. (2017). Evaluation of antioxidant activity and phenolic content from saffron organs (*Crocus sativus* L.). *Modares Journal of Biotechnology*, *8*(2), 160-170.