

تاثیر شرایط عصاره‌گیری به کمک فراصوت بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از میوه سنجد زینتی (*Elaeagnus umbellate*)

فائزه کمالی^a، علیرضا صادقی ماهونک^{b*}، زهرا نصیری فر^a

^a دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران
^b عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۸/۳۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۷/۱۱

چکیده

مقدمه: گیاهان منبع غنی از ترکیبات فنلی (اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها و تانن‌ها) هستند که مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به شمار می‌آیند. هدف از تحقیق حاضر بررسی تاثیر دو شیوه استخراج با فراصوت اعم از پروب و حمام، بر میزان استخراج ترکیب های فنولی، فلاونوئیدی و قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH از میوه سنجد زینتی با استفاده از سه حلال استخراجی آب، متانول ۸۰٪ و اتانول ۷۰٪ بود.

مواد و روش‌ها: در دو روش حمام و پروب فراصوت از سه حلال مختلف آب، متانول ۸۰٪ و اتانول ۷۰٪ در زمان‌های مختلف ۳۰، ۶۰، ۹۰ دقیقه (برای حمام اولتراسوند) و ۵، ۱۰، ۲۰ دقیقه (برای پروب اولتراسوند) استفاده شد و در نهایت میزان کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره‌ها به ترتیب با روش فولین سیوکالتیو و روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید تعیین شدند.

یافته‌ها: براساس نتایج، در روش استخراج با پروب فراصوت، حلال اتانول ۷۰٪ و زمان ۲۰ دقیقه بیشترین میزان ترکیب‌های فنولی (۰/۰۵±۱۳/۸ میلی گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک) و قدرت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH (۹۸/۹۴٪) را نشان داد. در روش استخراج به کمک حمام فراصوت حلال اتانول ۷۰٪ در زمان ۹۰ دقیقه بالاترین میزان ترکیب‌های فنولی (۰/۰۵۷±۱۵/۸۲ میلی گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک) و فلاونوئیدی (۷/۰۹±۰/۱۱۰ میلی گرم معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک) را استخراج کرد. **نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق نشان داد که استخراج به کمک پروب و حمام فراصوت تاثیر متفاوتی در میزان استخراج ترکیبات زیست فعال گیاه سنجد زینتی داشت. در هر روش استخراج، میزان استخراج ترکیبات زیست فعال بسته به نوع حلال متفاوت بود و در تمامی روش‌های استخراج حلال اتانول ۷۰٪ بهترین حلال برای استخراج ترکیبات مورد نظر بود.

واژه‌های کلیدی: استخراج، ترکیبات فنولی، سنجد زینتی، فراصوت

مقدمه

در طی سال‌های اخیر مصرف میوه‌ها و سبزی‌ها به دلیل اثربخشی آن‌ها بر روی سلامتی انسان، افزایش یافته است. میوه‌ها سرشار از ترکیبات ضد اکسایش هستند که منجر به کاهش بروز بیماری‌های مزمن مانند سرطان، آرتروز، تصلب شرایین، بیماری‌های قلبی و التهاب و اختلال عملکرد مغز می‌شوند (Ksouri et al., 2009). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که با جذب رادیکال آزاد و ممانعت از ادامه اکسیداسیون از فساد، تغییر رنگ یا تند شدن چربی‌ها جلوگیری می‌کنند. به خصوص آنتی‌اکسیدان‌هایی که بنیان حلقوی فنلی حاوی گروه OH را دارا می‌باشند نقش مهمی در جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌ها دارند (Mahdavi et al., 1995). در سالیان اخیر افزودن آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی به دلیل سمیت و خطراتی که در سلامتی انسان ایجاد می‌کنند محدود شده است (Weisburger, 1999). بنابراین در طی این سال‌ها تلاش برای شناخت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی خصوصاً با منشأ گیاهی افزایش یافته است. نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بعضی از سبزی‌ها و میوه‌ها به طور گسترده به محتوای کل ترکیبات فنولی آن‌ها وابسته است. با اینکه فرآیندهای استخراج ترکیبات فنولی، یک فاکتور اصلی در خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره است اما دما، قدرت استخراج‌کنندگی حلال، زمان و روش اتخاذ شده برای استخراج به طور قابل توجهی ترکیب عصاره را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Betancourt, 2008). این تغییر پذیری به تفاوت در پیوندهای درونی این ترکیبات و به خصوص به قطبیت مولکول‌های تشکیل دهنده حلال بستگی دارد. به همین جهت در فرآیند استخراج عواملی چون نوع حلال و زمان استخراج بسیار مهم هستند (Hayouni et al., 2007). به علاوه، استخراج مولکول‌ها از مواد بیولوژیک توسط روش‌های معمول به عنوان مثال غرقابی، نیاز به صرف زمان طولانی و مقدار حلال زیادی دارند بنا بر این نیاز به روش‌های استخراج جدید با زمان استخراج کوتاه‌تر، مصرف حلال آلی کمتر و ایجاد آلودگی کمتر، افزایش یافته است (Betancourt, 2008). روش‌های استخراج جدید مانند استخراج به کمک فراصوت و استخراج به کمک مایکروویو از روش‌های سریع و موثر برای استخراج ترکیب‌های موثره از بافت گیاهی هستند

(Wang et al., 2006). امروزه استفاده از امواج فراصوت با توجه به اثرات موثر آن در نگهداری و فرآیند مواد غذایی رو به گسترش می‌باشد. اثرات مکانیکی امواج فراصوت و پدیده کاویتاسیون ایجاد شده در اثر این امواج، سبب افزایش نفوذ پذیری حلال به داخل سلول‌های گیاهی، افزایش انتقال جرم و به دنبال آن افزایش بازدهی استخراج در دماهای پایین تر می‌شود (Vinatoru, 2001). سیستم‌های پروب و حمام دو روش رایج استفاده از امواج فراصوت هستند. در پروب فراصوت نمونه به طور مداوم در تماس با پروب قرار می‌گیرد و قابلیت تکرارپذیری کمی دارد. علاوه بر این، خطر آلودگی نمونه و تولید کف بیشتر است اما حمام فراصوت می‌تواند بر طیف وسیعی از نمونه‌ها به طور همزمان عمل کند و قابلیت تکرارپذیری بالایی دارد (Luque-Garcia & Luquede Castro, 2003). سنجد زینتی (*Elaeagnus umbellata*) متعلق به خانواده *Elaeagnaceae* و جزو درختان برگ‌ریز است و در کشورهای پاکستان، هند، افغانستان، چین به صورت فراوان یافت می‌شود (Ahmad et al., 2006). بخش خوراکی این گیاه میوه و دانه آن است که میوه آن گوشتی و آبدار و غنی از ویتامین‌ها، اسیدهای چرب ضروری، مواد معدنی، فلاونوئیدها و کاروتنوئید است (Parmar & Kaushal, 1982). میزان لیکوپن موجود در میوه سنجد زینتی ۷ تا ۱۷ بار بیشتر از لیکوپن موجود در گوجه فرنگی است (Fordham et al., 2001) که این ترکیب به طور گسترده‌ای از بروز انواع مختلف سرطان جلوگیری می‌کند. در این مطالعه اثر نوع حلال و زمان‌های مختلف در روش استخراج به کمک حمام و پروب فراصوت، بر میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی از میوه سنجد زینتی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

- مواد

میوه سنجد زینتی مورد استفاده در این تحقیق در آذر ماه ۱۳۹۱ از محوطه دانشگاه منابع طبیعی گرگان جمع‌آوری گردید. میوه‌ها پس از شستشو و خشک کردن در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، توسط آسیاب صنعتی (توس شکن، مدل تی ۳۸۰۰)، به صورت پودر درآمدند. نمونه‌های پودر شده تا زمان آزمایش در یخچال با دمای ۴

کن انجمادی (Operun-FDB550 ساخت کره جنوبی) در دمای ۵۰- درجه سانتیگراد، خشک و به پودر تبدیل شدند. پودرهای فنولی به دست آمده تا زمان استفاده در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا و رطوبت در فریزر با دما ۱۸- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

- اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی

مقدار کل ترکیبات فنولی با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد (Slinkard & Singleton, 1977). به طور خلاصه ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۱/۱۶۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد. بعد از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۲۰٪ به آن‌ها افزوده شد. لوله‌های آزمایش بعد از تکان دادن، درون حمام آب با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار گرفته و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (S 2000 UV/VIS) در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک استفاده شد. میزان کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره بر حسب معادل اسید گالیک و با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر حسب میلی گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره بیان شد.

مقدار کل ترکیب‌های فلاونوئیدی هر عصاره به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید انجام شد (Chang *et al.*, 2002). ۰/۵ میلی لیتر از عصاره درون لوله آزمایش در ۱/۵ میلی لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰٪ و ۰/۱ میلی لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار به آن اضافه شد. در نهایت ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر به آنها اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. کوئرتستین به عنوان استا ندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. مقدار فلاونوئید براساس میزان میلی گرم معادل کوئرتستین در گرم نمونه خشک گزارش شد (Chang *et al.*, 2002).

-میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH^۱

درجه سانتیگراد نگهداری شدند. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده دارای خلوص بالایی بوده و از شرکت مرک تهیه شدند.

-استخراج به کمک حمام فراصوت

به منظور بررسی اثر حلال، عملیات استخراج با حلال‌هایی با قطبیت متفاوت انجام شد. در این روش حلال‌های آب، متانول ۸۰٪ و اتانول ۷۰٪ به طور جداگانه با نمونه‌های ۳ گرمی پودر خشک شده سنجید زینتی به نسبت ۱:۶ مخلوط شدند و بعد مخلوط‌های بدست آمده در یک حمام اولتراسون (35 Starsonic) برای زمان‌های مختلف (۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه) در معرض امواج فراصوت (فرکانس ۲۸-۳۴ کیلوهرتز) قرار گرفتند. سپس عصاره‌های استخراج شده با استفاده از کلفذ صافی واتمن شماره یک از مواد جامد گیاهی جدا گردید (Martino *et al.*, 2006). عصاره به دست آمده به وسیله تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء (IKA-RV05 Basic ساخت آلمان) در دما ۴۰ درجه سانتیگراد تغلیظ و در نهایت توسط خشک کن انجمادی (Operun-FDB550 ساخت کره جنوبی) در دمای ۵۰- درجه سانتیگراد، خشک و به پودر تبدیل شدند. پودرهای فنولی به دست آمده تا زمان استفاده در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا و رطوبت در فریزر با دما ۱۸- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

- استخراج با پروب فراصوت

در این فرآیند استخراج، از پروب فراصوت (مدل Dr. Hilscher)، با قطر پروب ۲/۵ سانتی‌متر و دامنه نوسان ۲۰٪ و نسبت حلال به نمونه ۱:۶ استفاده شد (Ince *et al.*, 2012). ابتدا به پودرهای خشک شده سنجید زینتی حلال مورد نظر اضافه شده و سپس هر کدام از حلال‌های آب، اتانول ۷۰٪ و متانول ۸۰٪ به طور جداگانه تحت امواج فراصوت برای زمان‌های مختلف (۵، ۱۰، ۲۰ دقیقه) قرار گرفتند. در نهایت عصاره‌های استخراج شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک از مواد جامد گیاهی جدا گردید و عصاره به دست آمده به وسیله تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء (IKA-RV05 Basic ساخت آلمان) در دما ۴۰ درجه سانتیگراد تغلیظ و در نهایت توسط خشک

¹ Amplitude

² 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

تأثیر شرایط عصاره‌گیری به کمک فراصوت بر استخراج ترکیبات فنولی سنجد

اندازه‌گیری توانایی عصاره در مهار رادیکال‌های آزاد به این صورت انجام شد که یک میلی لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت ۰/۱ میلی مولار) به ۳ میلی لیتر از عصاره افزوده و مخلوط به دست آمده به شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید که در آن، A_c و A_s به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند (Arabshahi-Delouee & Urooj, 2007). نمونه کنترل حاوی ۳ میلی لیتر متانول به همراه ۱ میلی لیتر معرف DPPH بود.

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = (AC - AS) / AC \times 100$$

- تجزیه و تحلیل آماری

در روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل، میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد و میزان ترکیبات فلاونوئیدی کل، مقایسه میانگین‌های به دست آمده از سه تکرار با آزمون دانکن ($P < 0.05$) بر پایه طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی گرفت. نرم افزار مورد استفاده برای تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها SPSS بود.

یافته‌ها

- روش استخراج به کمک حمام فراصوت

با بررسی نتایج آنالیز واریانس و نیز مقایسه میانگین مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH تیمارهای مختلف مشاهده شد که اثرات اصلی سطوح مختلف پارامترهای حلال و زمان و همچنین اثرات متقابل حلال و زمان در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بودند (جدول ۱، ۲ و ۳). در سطوح مختلف زمان مورد استفاده، اختلاف معنی‌داری میان سه زمان ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه مشاهده شد و زمان ۳۰ دقیقه کمترین میزان استخراج ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را نشان داد (جدول ۱). در بین حلال‌های مصرفی اتانول و آب به ترتیب بیشترین و کمترین میزان استخراج ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را نشان دادند (جدول ۲).

نتایج نشان داد که افزایش زمان تا ۹۰ دقیقه باعث افزایش میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌گردد. در بررسی اثر متقابل نوع حلال و زمان استخراج (جدول ۳)، تیمار اتانول ۷۰ درصد در طی زمان ۹۰ دقیقه با $15/82 \pm 0/057$ میلی گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنولی را داشت که از لحاظ آماری با اتانول ۶۰ و ۳۰ و همچنین متانول ۸۰ - ۹۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری داشت و کمترین میزان استخراج ترکیبات فنولی نیز مربوط به آب ۳۰ دقیقه با $6/35 \pm 0/096$ میلی گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک بود. بین زمان‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بنابراین می‌توان گفت که استفاده از اتانول به عنوان حلال استخراجی در روش استخراج به کمک حمام فراصوت و افزایش زمان استخراج از ۳۰ تا ۹۰ دقیقه، تأثیر معنی‌داری در میزان استخراج ترکیبات فنولی خواهد داشت. در مورد ترکیبات فنولی فلاونوئیدی نیز در مقایسه سه نوع حلال مصرفی (اثر اصلی)، بیشترین مقدار استخراج ترکیبات فنولی فلاونوئیدی مربوط به حلال اتانول بود که با حلال‌های آب و متانول ۸۰٪ تفاوت معنی‌داری از نظر میزان استخراج داشتند (جدول ۲). در بررسی اثر اصلی سطوح مختلف زمان مشاهده شد که تا زمان ۹۰ دقیقه افزایش معنی‌داری در میزان استخراج ترکیبات فنولی فلاونوئیدی در سطح احتمال ۵٪ بوجود می‌آید (جدول ۱). در بررسی اثر متقابل حلال در زمان (جدول ۳)، تیمارهای آب - ۳۰ دقیقه و اتانول - ۹۰ دقیقه به ترتیب با $1/54 \pm 0/009$ و $7/09 \pm 0/110$ معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک، کمترین و بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنولی فلاونوئیدی را در بین تیمارها داشتند. همچنین تفاوت معنی‌داری میان تیمارهای آب ۳۰ دقیقه و آب - ۶۰ دقیقه در سطح احتمال پنج درصد مشاهده نشد. در بین سه نوع حلال مورد استفاده، بیشترین و کمترین مقدار مهار رادیکال‌های DPPH به ترتیب مربوط به اتانول ۷۰٪ و آب بود. بین سه حلال اختلاف معنی‌داری از این نظر وجود داشت (جدول ۲). در بررسی زمان‌های مختلف (اثر اصلی) بیشترین میزان مهار رادیکال‌های DPPH مربوط به زمان ۹۰ دقیقه و کمترین مربوط به زمان استخراج ۳۰ دقیقه بود (جدول ۱).

در بررسی اثر متقابل حلال و زمان استخراج (جدول ۳)، تیمارهای آب - ۳۰ دقیقه و اتانول ۷۰ - ۹۰ دقیقه به ترتیب با ۵۳/۷۶±۴/۰۳۲ و ۸۶/۵۳±۰/۶۹۸ درصد، کمترین و بیشترین میزان مهار رادیکال های DPPH را در بین تیمارها داشتند. همچنین تفاوت معنی داری میان تیمارهای آب ۳۰ دقیقه و آب - ۶۰ دقیقه در سطح احتمال پنج درصد مشاهده نشد.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر زمان های مختلف بر روی میزان استخراج ترکیب های فنولی و فلاونوئیدی و مهار رادیکال های آزاد DPPH در روش استخراج به کمک حمام فراصوت

میانگین			تیمار (زمان (دقیقه))
مهار رادیکال های آزاد DPPH (%)	ترکیبات فلاونوئیدی (mg QE/g dry sample)	ترکیبات فنولی (mg GAE/g dry sample)	
۶۵/۴۴ ^c	۲/۸۱ ^c	۷/۹۵ ^c	۳۰
۷۴/۹۴ ^b	۳/۷۱ ^b	۹/۶۰ ^b	۶۰
۷۷/۶۶ ^a	۴/۶۷ ^a	۱۲/۶۸ ^a	۹۰

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد است.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر نوع حلال مصرفی در میزان استخراج ترکیب های فنولی، فلاونوئیدی و مهار رادیکال های آزاد DPPH در روش استخراج به کمک حمام فراصوت

میانگین			تیمار (حلال مصرفی)
مهار رادیکال های آزاد DPPH (%)	ترکیبات فلاونوئیدی (mg QE/g dry sample)	ترکیبات فنولی (mg GAE/g dry sample)	
۶۰/۹۸ ^c	۱/۷۹ ^c	۷/۲۸ ^c	آب
۷۴/۷۰ ^b	۳/۷۶ ^b	۱۰/۳۳ ^b	متانول ۸۰٪
۸۲/۳۵ ^a	۵/۶۵ ^a	۱۲/۶۲ ^a	اتانول ۷۰٪

حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد است.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع حلال و زمان های مختلف در میزان استخراج ترکیب های فنولی، فلاونوئیدی و مهار رادیکال های آزاد DPPH در روش استخراج به کمک حمام فراصوت

میانگین			تیمار (حلال-زمان)
مهار رادیکال های آزاد DPPH (%)	ترکیبات فلاونوئیدی (mg QE/g dry sample)	ترکیبات فنولی (mg GAE/g dry sample)	
۵۳/۷۶±۴/۰۳۲ ⁱ	۱/۵۴±۰/۰۰۹ ^{hi}	۶/۳۵±۰/۰۹۶ ^j	آب- ۳۰
۶۱/۹۱±۱/۳۸۶ ^h	۱/۷۷±۰/۰۱۹ ^{gh}	۷/۰۱±۰/۰۴۶ ^{gi}	آب - ۶۰
۶۷/۲۸±۰/۰۴۱ ^f	۲/۰۵±۰/۰۲۱ ^g	۸/۴۸±۰/۰۳۸ ^f	آب - ۹۰
۶۶/۵۰±۰/۴۲۷ ^g	۲/۸۵±۰/۰۲۵ ^f	۷/۶۸±۰/۱۸۱ ^{fg}	متانول ۸۰- ۳۰
۷۸/۴۵±۰/۳۰۹ ^d	۳/۵۷±۰/۰۴۹ ^{de}	۹/۵۶±۰/۰۱۳ ^{de}	متانول ۸۰ - ۶۰
۷۹/۱۶±۰/۴۳۱ ^c	۴/۸۵±۰/۰۲۳ ^c	۱۳/۷۵±۰/۲۲۷ ^b	متانول ۸۰ - ۹۰
۷۶/۰۶±۰/۵۰۳ ^e	۴/۰۷±۰/۰۱۰ ^d	۹/۸۲±۰/۶۰۷ ^d	اتانول ۷۰- ۳۰
۸۴/۴۵±۱/۱۴۶ ^b	۵/۷۹±۰/۰۷۸ ^b	۱۲/۲۳±۰/۱۱۲ ^c	اتانول ۷۰ - ۶۰
۸۶/۵۳±۰/۶۹۸ ^a	۷/۰۹±۰/۱۱۰ ^a	۱۵/۸۲±۰/۰۵۷ ^a	اتانول ۷۰ - ۹۰

میانگین های اثر متقابل حلال×زمان دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد هستند.

تأثیر شرایط عصاره‌گیری به کمک فراصوت بر استخراج ترکیبات فنولی سنجد

روش استخراج به کمک پروب فراصوت

با بررسی نتایج آنالیز واریانس و نیز مقایسه میانگین مقدار کل ترکیبات فنولی تیمارهای مختلف، مشاهده شد که اثرات اصلی سطوح مختلف پارامترهای حلال و زمان و همچنین اثرات متقابل حلال و زمان در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بودند (جدول ۴، ۵ و ۶). در بین حلال‌های مصرفی (اثر اصلی) اتانول و آب به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار کل ترکیبات فنولی را دارا بودند (جدول ۵). همچنین در سطوح مختلف زمان (اثر اصلی)، اختلاف معنی‌داری میان سه زمان ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه مشاهده شد و زمان ۵ دقیقه کمترین میزان ترکیبات فنولی را نشان داد (جدول ۴). نتایج نشان داد که افزایش زمان تا ۲۰ دقیقه باعث افزایش مقدار ترکیبات فنولی گردید.

در بررسی اثر متقابل حلال در زمان (جدول ۶)، تیمار اتانول ۷۰-۲۰ دقیقه با $13/786 \pm 0/057$ میلی گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنولی را داشت که از لحاظ آماری با اتانول ۱۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و کمترین میزان استخراج ترکیبات فنولی نیز مربوط به آب ۵ دقیقه با $8/464 \pm 0/303$ میلی گرم معادل اسیدگالیک به گرم نمونه خشک بود. بنابراین می‌توان گفت که در صورت استفاده از

اتانول به عنوان حلال استخراجی در روش استخراج به کمک فراصوت، افزایش زمان استخراج از ۱۰ تا ۲۰ دقیقه، تأثیر معنی‌داری در میزان استخراج ترکیبات فنولی دارد ولی افزایش زمان تا ۲۰ دقیقه دارای اثر معنی‌داری نبود.

در مورد ترکیبات فنولی فلاونوئیدی نیز در سه نوع حلال مصرفی (اثر اصلی)، بیشترین مقدار کل ترکیبات فنولی فلاونوئیدی مربوط به حلال اتانول بود که با حلال‌های آب و متانول ۸۰٪ تفاوت معنی‌داری از نظر میزان استخراج داشتند (جدول ۵). در بررسی اثر اصلی سطوح مختلف زمان مشاهده شد که میزان ترکیبات فنولی فلاونوئیدی تا زمان ۲۰ دقیقه افزایش یافته بود و تا زمان ۲۰ دقیقه افزایش معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ نشان داد (جدول ۴). در بررسی اثر متقابل حلال در زمان (جدول ۶)، اثر معنی‌داری در استخراج فلاونوئید مشاهده نشد. تیمارهای آب ۵ دقیقه و اتانول ۲۰ دقیقه به ترتیب با $1/105 \pm 0/066$ و $3/345 \pm 0/056$ معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک، کمترین و بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنولی فلاونوئیدی را در بین تیمارها داشتند. همچنین تفاوت معنی‌داری در میان تیمارهای آب ۵ دقیقه و آب ۱۰ دقیقه در سطح احتمال پنج درصد مشاهده نشد.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر زمان‌های مختلف بر روی میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در روش استخراج به کمک پروب فراصوت

میانگین			
تیمار (زمان (دقیقه))	ترکیبات فنولی (mg GAE/g dry sample)	ترکیبات فلاونوئیدی (mg QE/g dry sample)	مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (%)
۵	۱۰/۰۴۵ ^c	۱/۶۵ ^c	۹۳/۸۳۳ ^c
۱۰	۱۱/۸۲۹ ^b	۲/۱۲۳ ^a	۹۴/۹۸۱ ^b
۲۰	۱۲/۶۲۹ ^a	۲/۷۷۹ ^a	۹۵/۴۳۳ ^a

حرف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر نوع حلال مصرفی در میزان استخراج ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در روش استخراج به کمک پروب فراصوت

میانگین			
تیمار (حلال مصرفی)	ترکیبات فنولی (mg GAE/g dry sample)	ترکیبات فلاونوئیدی (mg QE/g dry sample)	مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (%)
آب	۱۰/۱۴۶ ^c	۱/۵۷۵ ^c	۹۱/۴۴۶ ^c
متانول ۸۰٪	۱۱/۲۱۶ ^b	۲/۲۰۴ ^a	۹۴/۹۸۱ ^b
اتانول ۷۰٪	۱۳/۱۴۰ ^a	۲/۷۸۰ ^a	۹۵/۴۳۳ ^a

حرف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

جدول ۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع حلال و زمان‌های مختلف در میزان استخراج ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی و مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در روش استخراج به کمک پروب فراصوت

تیمار (حلال-زمان)	ترکیبات فنولی (mg GAE/g dry sample)	ترکیبات فلاونوئیدی (mg QE/g dry sample)	مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (%)
آب - ۵	۸/۴۶۴±۰/۳۰۳ ^{hi}	۱/۱۰۵±۰/۰۶۶ ^{hi}	۹۰/۶۲۴±۰/۴۴۲ ⁱ
آب - ۱۰	۱۰±۰/۱۶۷ ^h	۱/۵۴۶±۰/۱۳۷ ^{gh}	۹۱/۶۳۴±۰/۲۳۳ ^h
آب - ۲۰	۱۱/۷۹۴±۰/۳۳۶ ^{efg}	۲/۰۷۵±۰/۰۵۶ ^{ef}	۹۲/۰۸۲±۰/۰۷۷ ^{fg}
متانول ۵-۸۰	۹/۵۴۴±۰/۳۰۲ ⁱ	۱/۵۵۸±۰/۳۳۸ ^{fg}	۹۲/۴۳۹±۰/۳۲۳ ^f
متانول ۱۰-۸۰	۱۱/۷۹۸±۰/۴۴۹ ^{ef}	۲/۱۳۶±۰/۱۵۴ ^{de}	۹۴/۶۱۹±۰/۲۳۵ ^e
متانول ۲۰-۸۰	۱۲/۳۰۸±۰/۱۸۴ ^e	۲/۹۱۸±۰/۰۴۱ ^{ab}	۹۵/۲۷۰±۰/۱۲۶ ^d
اتانول ۵-۷۰	۱۱/۹۴۵±۰/۳۴۰ ^{de}	۲/۳۰۳±۰/۱۶۱ ^{cd}	۹۸/۴۴۷±۰/۵۰۳ ^{bc}
اتانول ۱۰-۷۰	۱۳/۶۹۰±۰/۲۲۲ ^{ab}	۲/۶۹۲±۰/۱۹۲ ^{bc}	۹۸/۶۹۱±۰/۲۳۶ ^{ab}
اتانول ۲۰-۷۰	۱۳/۷۸۶±۰/۰۵۷ ^a	۳/۳۴۵±۰/۰۵۶ ^a	۹۸/۹۴۳±۰/۶۹۸ ^a

میانگین‌های اثر متقابل حلال×زمان دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد هستند.

۲۹

آزاد DPPH به ترتیب مربوط به اتانول ۷۰-۲۰ دقیقه و آب ۵ دقیقه بود. افزایش زمان استخراج از ۵ تا ۱ دقیقه، تأثیر معنی‌داری در میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH داشت ولی افزایش زمان از ۱۰ تا ۲۰ دقیقه دارای اثر معنی‌داری نبود (شکل ۶).

بحث

میزان ترکیبات استخراج شده با کمک حمام فراصوت

در روش حمام فراصوت تیمار اتانول ۷۰ درصد در طی زمان ۹۰ دقیقه با $15/82 \pm 0/057$ میلی‌گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک و $7/09 \pm 0/110$ معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک، به ترتیب بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی را در بین تیمارها داشتند. نتایج نشان داد که افزایش زمان تا ۹۰ دقیقه باعث افزایش میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی می‌گردد.

علت افزایش میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی با افزایش زمان فراصوت را می‌توان به پدیده

در بررسی اثر اصلی سه نوع حلال مورد استفاده، بیشترین و کمترین مقدار مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به ترتیب مربوط به اتانول و آب به دست آمد. میان سه حلال اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۵). در بررسی زمان‌های مختلف (اثر اصلی) بیشترین میزان DPPH مربوط به ۲۰ دقیقه و کمترین مربوط به ۵ دقیقه بود (جدول ۴). در بررسی اثر متقابل حلال در زمان (جدول ۶)، تیمارهای آب - ۵ دقیقه و اتانول - ۲۰ دقیقه به ترتیب با بیشترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را در بین تیمارها داشتند.

در مورد ترکیب‌های فلاونوئیدی نیز در سه نوع حلال مصرفی (اثر اصلی)، بیشترین مقدار کل ترکیب‌های فلاونوئیدی مربوط به حلال اتانول ۷۰٪ بود که با متانول ۸۰٪ تفاوت معنی‌داری از نظر میزان استخراج نداشت (جدول ۵). در بررسی اثر اصلی سطوح مختلف زمان مشاهده شد که میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی تا زمان ۲۰ دقیقه افزایش یافته بود (جدول ۴). اثر اصلی سه نوع حلال مورد استفاده، بیشترین و کمترین مقدار مهار رادیکال‌های

تأثیر شرایط عصاره‌گیری به کمک فراصوت بر استخراج ترکیبات فنولی سنجد

استخراج ترکیبات مورد نظر بود. Albu و همکاران (۲۰۰۴) در تحقیقی تأثیر امواج فراصوت را بر استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از گیاه رزماری مورد بررسی قرار دادند. آنها از سه حلال بوتانول، استات اتیلن و اتانول استفاده کردند و دریافتند که امواج فراصوت اثر حلال اتانول که در شرایط معمولی حلال ضعیفی است به یک سطح استخراج مشابه با دو حلال دیگر رساند. ثابت شد استخراج از گیاه خشک شده با اتانول موثرتر از ماده تازه می‌باشد که احتمالاً به دلیل آب موجود در دومی است. در پژوهشی دیگر، Falleh و همکاران (۲۰۱۲) نیز دریافتند عصاره اتانولی قدرت مهار رادیکال آزاد بیشتری نسبت به عصاره متانولی دارد.

نتیجه‌گیری

فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی به میزان قابل توجهی تحت تأثیر ماهیت حلال، زمان استخراج و تعامل این دو عامل وابسته است. با این حال، قدرت استخراج حلال، مهم‌ترین فاکتور موثر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محصول است. روش‌های سنتی استخراج نظیر روش غرقابی و سوکسله نیاز به صرف زمان طولانی و مقدار حلال زیاد دارند همچنین از لحاظ دمایی ایمن نیستند و باعث تجزیه تعدادی از ترکیبات می‌شوند. امواج فراصوت منجر به ایجاد نوسانات مکانیکی در یک مایع می‌گردد. تأثیر مکانیکی فراصوت باعث نفوذ حلال به درون مواد سلولی شده و انتقال جرم را بهبود می‌دهد. همچنین بازیافت پلی‌فنول‌ها از مواد گیاهی توسط قطبیت حلال مورد استفاده جهت فرآیند استخراج تحت تأثیر قرار می‌گیرد. نتایج این تحقیق نشان داد که استخراج به کمک پروب و حمام فراصوت تأثیر متفاوتی در میزان استخراج ترکیبات زیست‌فعال گیاه سنجد زینتی داشت. در هر روش استخراج، میزان استخراج ترکیبات زیست‌فعال بسته به نوع حلال متفاوت بود. در روش حمام فراصوت تیمار اتانول ۷۰ درصد در طی زمان ۹۰ دقیقه با ± 0.057 و $15/82$ میلی‌گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک و $7/09 \pm 0.110$ معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک، به ترتیب بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی را در بین تیمارها داشتند. در نمونه‌های استخراجی با روش پروب فراصوت نیز، بیشترین میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH با میزان

کاویتاسیون نسبت داد که در واقع در اثر انتشار امواج صوتی در فاز جامد-مایع، چرخه‌های انقباض و انبساطی در محیط ایجاد می‌شود که باعث تشکیل حباب‌هایی شده که این حباب‌ها در ادامه رشد و در نهایت متلاشی می‌شوند. این عمل باعث نوسان ذرات جامد و مایع شده و تحت عمل فراصوت سرعت پیدا می‌کنند. در نتیجه مواد حل‌شونده سریعاً از فاز جامد به حلال انتشار پیدا می‌کنند. علاوه بر این، دیگر اثرها مانند امولسیفیکاسیون، انتشار و صدمه به بافت نیز به افزایش استخراج اجزای مورد نظر از مواد خام کمک می‌کند. به طوری که در زمان‌های بالاتر ممکن است به دلیل وقوع اکسیداسیون (به علت قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت) میزان استخراج کاهش یابد (Rostagno et al., 2003).

Ma و همکاران (۲۰۰۸) استخراج هیسپریدین را از پوست *Citrus reticulata* به کمک امواج فراصوت بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که بازده استخراج با افزایش زمان به طور معنی‌داری افزایش یافت که این افزایش از ۲۰ تا ۶۰ دقیقه با شیب زیاد ولی از ۶۰ تا ۱۶۰ دقیقه به آرامی افزایش یافت. Wang و همکاران (۲۰۰۸) ترکیبات فنولی سبوس‌گندم را به کمک روش فراصوت استخراج کردند و تأثیر پارامترهای حلال، دما و زمان را بر روی میزان استخراج مورد بررسی قرار دادند. در بررسی آنها از یک حمام فراصوت و سه حلال متانول ۷۰٪، استون و اتانول ۸۰٪ در دماهای ۲۵ الی ۷۵ درجه سانتی‌گراد و زمان بین ۱۰ تا ۵۰ دقیقه استفاده شد. آنها گزارش کردند که در شرایط یکسان دمایی و زمانی، بیشترین استخراج ترکیبات فنولی توسط حلال اتانول صورت می‌گیرد. همچنین با افزایش زمان و دما میزان استخراج این ترکیبات افزایش می‌یابد.

میزان ترکیبات استخراج شده با کمک پروب اولتراسوند

در روش استخراج با پروب فراصوت، حلال اتانول ۷۰٪ و زمان ۲۰ دقیقه بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فنول ($13/8 \pm 0.05$) میلی‌گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک و قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH ($98/94$ ٪) را نشان داد. بنابراین در تمامی روش‌های استخراج حلال اتانول ۷۰٪ بهترین حلال برای

from melissa using microwave and ultrasound. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 37: pp. 69-75.

Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Hamdi, B., Chaieb, K., Bakhrouf, A., Magné, C. & Abdelly, C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L and related polyphenolic constituents. Food Chemistry Toxicology, 47: pp. 2083–2091.

Luque-Garcia, J. L. & Luque de Castro, M. D. (2003). Where is microwave based analytical treatment for solid sample pretreatment going? Trends Anal. Chemistry, 22: pp. 90–99.

Ma, Y., Ye, X., Hao, Y., Xu, G., Xu, G. & Liu, D. (2008). Ultrasound assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. Ultrasonics Sonochemistry, 15: pp. 227-232.

Mahdavi, D. L., Deshpande, S. S. & Salunkhe, D. K. 1995. Food Antioxidant. Marcel Dekker Inc., New York, USA, 746p.

Martino, E., Ramaiola, I. & Urbano, M. (2006). Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* Pallas Alternative to Soxhlet and ultrasound assisted extraction. Journal of Chromatography, 11(25): pp.147-151.

Parmar, C. & Kaushal, M. K. (1982). *Elaeagnus umbellata* Thunb. In Wild Fruits of Sub-Himalayan region. Kalyani Publishers. New Delhi, India, pp: 23-25.

Rostagno, A., Palma, M. & Barroso, C., (2003). Ultrasound assisted extraction of soy isoflavones. Journal of Chromatography A, 1012: 119-128.

Slinkard, K. & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28: pp. 49-55.

Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive herbs, Ultrasonics principles from Sonochemistry, v. 8, pp. 303-313.

Weisburger, J. H. (1999). Mechanisms of action antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes, and tea. Food and Chemical Toxicology, 37: pp. 943-948.

Wang, L. & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science and Technology, 17: pp. 300-312.

۹۸/۹۴۳±۰/۶۹۸ درصد مربوط به تیمار اتانول ۷۰ درصد و زمان ۲۰ بود. بنابراین در تمامی روش های استخراج حلال اتانول ۷۰٪ بهترین حلال برای استخراج ترکیبات مورد نظر بود.

منابع

Ahmad, S. D., Sabir, S. M. & Zubair, M. (2006). Ecotypes diversity in autumn olive (*Elaeagnus umbellata* Thunb): A single plant with multiple micronutrient genes. Chemistry and Ecology, (22): pp. 509-521.

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P & Mason, T. J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. Ultrasonics Sonochemistry, 11(3-4), pp. 261-265.

Arabshahi-Delouee, S. & Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morusindica* L.) leaves. Food Chemistry, 102: pp. 1233–1240.

Betancourt, A. O. (2008). Analysis, extraction and recovery of poly-3-hydroxybutyrate in the biomass. University of Quebec at Montreal Thesis, pp. 45-55.

Chang, C., Yang, M., Wen, H. & Chern, J. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. Food and Drug Analysis, 10: pp. 178-182.

Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, M. E., Abdelly, CH. & Magné, CH. (2012). Ultrasound-Assisted Extraction: Effect of Extraction Time and Solvent Power on the Levels of Polyphenols and Antioxidant Activity of *Mesembryanthemum edule* L. *Aizoaceae* Shoot. Journal of Pharmaceutical Research, 11(2): pp. 243-249.

Fordham, I. M., Clevidence, B. A., Wiley, E. R. & Zimmerman, R. H. (2001). Fruit of autumn olive; A rich source of lycopene. Hort Science, 36: pp.1136-1137.

Hayouni, A., Abedrabba, M., Bouix, M. & Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. Food Chemistry, 105 (3): pp.1126–1134.

Ince, A. E., Sahin, S. & Sumnu, S. G. (2012). Extraction of phenolic compounds

Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y. & Li, X., (2008). Optimization of ultrasound assisted

extraction of phenolic compounds from wheat bran. Food Chemistry, 106: pp. 804-810.

www.jstnar.iut.ac.ir

jitn.srbiau.ac.ir