



فصل‌نامه داروهای گیاهی

journal homepage: www.iaushk.ac.ir



ارزیابی تأثیر متغیرهای فراصوت بر استخراج ترکیبات فنولی موجود در پوست سبز

بادام (*Prunus amygdalus*)

ویکتوریا مسعودی^۱، اعظم اعرابی^{۲*}

۱. گروه مهندسی شیمی، واحد شهرضا، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرضا، ایران؛

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهرضا، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرضا، ایران؛

*مسئول مکاتبات (E-mail: aarabi@iaush.ac.ir)

چکیده

مقدمه و هدف: استخراج ترکیبات فنولی از باقی مانده محصولات کشاورزی برای توسعه محصولات با ارزش افزوده مهم است. بادام (*Prunus amygdalus*) یکی از محصولات کشاورزی بومی کشور است که به مقدار زیاد در کشور پرورش داده می‌شود. در این مطالعه از پوست سبز بادام به‌عنوان یک محصول جانبی که امروزه صرفاً برای تغذیه دام استفاده می‌شود جهت بررسی استخراج ترکیبات فنولیک و خاصیت آنتی-اکسیدانی آنها استفاده شده است.

روش تحقیق: در این تحقیق استخراج ترکیبات فنولی با استفاده از امواج فراصوت به روش سطح پاسخ و با کمک نرم‌افزار مینی تب مورد بررسی قرار گرفته و اثر چهار پارامتر دما، زمان تیمار با فراصوت، فرکانس امواج فراصوت و غلظت اتانول هر کدام در پنج سطح بر میزان استخراج ترکیبات فنولی مورد بررسی و بهینه‌سازی قرار گرفت. در نهایت تأثیر نسبت حلال به ماده جامد بر میزان استخراج این ترکیبات بررسی شده م با روش متداول سوکسله مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج و بحث: نتایج آزمون‌ها بر اساس طراحی انجام شده نشان داد که مقدار بهینه استخراج در شرایطی که اتانول ۸۶٪، دما ۵۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۷۵ دقیقه و فرکانس ۱۶۳ هرتز باشد به‌دست می‌آید. همچنین تأثیر نسبت حلال به ماده جامد (پوست بادام) در نسبت‌های (w/w) ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۳۰، ۱:۴۰ طبق شرایط بهینه به‌دست آمده در مرحله قبل با امواج فراصوت ارزیابی گردید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج شده در این شرایط با روش مهار رادیکال آزاد DPPH اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد بیشترین مقدار ترکیبات فنولیک و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در نسبت ۴۰:۱ حلال به ماده جامد به ترتیب برابر ۱۱۳۴/۱۹ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک و ۸۷/۴۲ درصد به دست آمد. نتایج این نسبت از حلال و ماده جامد با نتایج به-دست آمده از استخراج ترکیبات فنولیک با روش سوکسله و در حضور اتانول خالص تفاوت معناداری را در ترکیبات فنولیک و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن نشان داد.

توصیه‌های کاربردی / صنعتی: کاربرد تکنیک‌های جدید از جمله امواج فراصوت در استخراج ترکیبات فنولی از منابع گیاهی می‌تواند راهکار موثری نه تنها برای افزایش میزان استخراج این ترکیبات باشد بلکه به دلیل زمان کوتاه‌تر، آسیب کمتری نیز به این ترکیبات وارد می‌شود.

شناسه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۱/۱۸

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۴/۱۵

نوع مقاله: علمی - پژوهشی

موضوع: فیتوشیمی

کلید واژگان:

Prunus amygdalus ✓

ترکیبات فنولیک ✓

فراصوت ✓

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ✓

۱. مقدمه

استون، هگزان با روش اولتراسوند بوده و روش اولتراسوند میزان کل ترکیبات فنولی استخراج شده را نسبت به روش پرکولاسیون بهبود بخشیده و مدت زمان عصاره‌گیری را کاهش داده است (Mohagheghi Samarin et al., 2010).

حیدری مجد و همکاران در سال ۱۳۹۱ بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولیک گیاه پونه گاوی با استفاده از اولتراسوند و به روش سطح پاسخ مورد بررسی قرار دادند (heidari majd et al., 2011). نتایج به دست آمده نشان داد که مناسب‌ترین شرایط برای استخراج ترکیبات فنولیک زمان ۴۷ دقیقه، دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد و pH ۶/۶ می‌باشد.

بادام با نام علمی *Prunus amygdalus* یکی از گیاهان تیره گل سرخ متعلق به دو لپه‌ای‌ها و بومی آسیای غربی، کرانه جنوبی دریای مدیترانه و مراکش است. میوه درخت بادام به‌صورت شفت می‌باشد که قشر خارجی آن سبز رنگ و پوشیده از کرک است که در داخل آن بادام با پوست سخت وجود دارد. در ابتدای تشکیل میوه پوشش خارجی سبز رنگ و گوشت‌دار است که پوشیده از کرک است و پس از رسیدن بادام به‌تدریج پوشش خارجی سبز رنگ خشک شده و پوست آن نیز سفت و سخت می‌شود (Zhang et al., 2009). میزان تولید بادام در جهان بیش از ۱/۳ میلیون تن است و جمهوری اسلامی ایران با بیش از ۱۱۰ هزار تن بعد از آمریکا، اسپانیا و مراکش رتبه چهارم تولید جهانی را دارا است. با توجه به تولید قابل توجه بادام در کشور و وجود انواع گونه‌های آن، بررسی و تحقیق در جهت استخراج یک ترکیب ارزشمند از پوست سبز بادام که در حال حاضر تنها به عنوان غذای دام استفاده می‌شود حائز اهمیت است. با توجه به اینکه در مورد اثر حلال و مقایسه اثر امواج فراصوت بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی پوست سبز بادام تحقیقاتی صورت نگرفته است در این پژوهش مقایسه دو روش امواج فراصوت و روش غرقابی بر میزان ترکیبات فنولی استخراج شده با روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

در این پژوهش به منظور بررسی اثر امواج فراصوت بر استخراج ترکیبات فنولی موجود در پوست سبز بادام، ابتدا اثر فرکانس امواج

واکنش‌های اکسیداسیون به‌دلیل تولید رادیکال‌های آزاد سلامت انسان را به مخاطره می‌اندازد. این رادیکال‌ها آغازگر واکنش‌های اکسیداسیون می‌باشند که به آسیب یا مرگ سلول‌ها منجر می‌شود. یافته‌های علمی حاکی از آن است که میوه‌ها و سبزی‌ها حاوی انواع مختلفی مواد مغذی و غیرمغذی فیتوشیمیایی هستند که از نظر بیوزیستی فعالیت‌های متنوعی داشته و می‌توانند از بروز برخی بیماری‌های مزمن نظیر انواع سرطان، بیماری‌های قلبی -عروقی و دیابت جلوگیری کنند (Galiñanes et al., 2015).

یکی از مهم‌ترین عملکردهای این ترکیبات مهار رادیکال‌های آزاد، تقویت دستگاه ایمنی بدن، اثرات ضد میکروبی، آنتی‌اکسیداتیو، ضد سرطانی آنها است. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند استرس اکسیداتیو را در سلول‌ها کاهش دهند. بسیاری از گونه‌های گیاهی توان آنتی‌اکسیدانی مشابهی با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، بدون اثرات جانبی دارند و به‌عنوان یک جایگزین در صنعت غذا و دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند. فنول‌ها ترکیباتی هستند که دارای یک یا چند حلقه اروماتیک واجد گروه هیدروکسیل می‌باشند که به‌طور گسترده در قلمرو گیاهان توزیع و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند (Abbasi et al., 2012; Adjé et al., 2015). فنول‌ها در گیاهان به‌طور کلی در دفاع در برابر اشعه ماوراء بنفش و یا حمله توسط پاتوژن‌ها و انگل‌ها دخالت داشته و همچنین در رنگ گیاهان موثر هستند. آنها در تمام اندام‌های گیاه وجود دارند و در نتیجه بخش جدایی‌ناپذیر از رژیم غذایی انسان هستند (Baba and Malik, 2015).

استخراج ترکیبات فنولی با روش‌ها و حلال‌های مختلفی بر اساس نوع ترکیب فنولی مورد نظر وجود دارد که هر کدام توسط محققان برای گیاهان مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. استفاده از روش‌های حرارت دهی (سوکسله) و استفاده از روش‌های غیر حرارتی مانند امواج فراصوت (Sharmila et al., 2016) و امواج مایکروویو (Hayat et al., 2009)، سیال فوق بحرانی (Pereira et al., 2013) در جهت استخراج این ترکیبات بیواکتیو مورد مطالعه محققان قرار گرفته است. محققان ثمرین و همکاران (۱۳۸۷) در استخراج ترکیبات فنولیک پوست سیب زمینی با دو روش اولتراسوند و پرکولاسیون دریافتند که بیشترین مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره‌ها به ترتیب مربوط به حلال‌های متانول، آب، اتانول،

۲.۲. طراحی آزمون با روش سطح پاسخ جهت بررسی شرایط استخراج ترکیبات فنولی موجود در پوست بادام

به منظور بررسی اثر فرایند فراصوت بر استخراج ترکیبات فنولی و تعیین فعالیت بازدارندگی رادیکال آزاد، طراحی آزمون با استفاده از نرم‌افزار مینی تب نسخه ۱۷ با روش سطح پاسخ انجام گرفت. روش سطح پاسخ برای تعیین شرایط بهینه مورد استفاده قرار می‌گیرد (Montgomery, 2012) و در این مرحله از تحقیق آزمایشات اثر چهار پارامتر دما، زمان تیمار با فراصوت، فرکانس امواج فراصوت و غلظت اتانول بر غلظت ترکیبات فنولی مطابق با طرحی (CCD) مورد بررسی قرار گرفت تا دما، زمان، غلظت و فرکانس بهینه برای استخراج حداکثر ترکیبات فنولی مشخص گردد. پارامترهای مشخص شده در ۵ سطح و مقدار $\alpha = \pm 2$ تعیین گردید. تعداد آزمایشات طراحی شده با نرم افزار برابر با ۳۱ تعیین شد (جدول ۱).

فراصوت، زمان تیمار، دمای تیمار و غلظت اتانول به عنوان حلال با روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی بررسی شد و پس از تعریف شرایط بهینه تیمار فراصوت، مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده با روش پركولاسیون (سوکسله) مقایسه گردید. همچنین اثر نسبت حلال به ماده جامد در استخراج ترکیبات فنولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

۱.۲. آماده سازی پوست بادام

پوست سبز بادام رقم ربیع از مزارع اصفهان جمع آوری گردید و پس از جدا کردن آنها از میوه، ابتدا به منظور حذف ناخالصی ها و گرد و غبار آن با آب شستشو شد و سپس در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد در مجاورت هوای گرم خشک شد و سپس توسط آسیاب آزمایشگاهی پودر شده و پس از عبور از الک با مش ۲۰۰ میکرون در بسته های پلی اتیلنی جهت انجام آزمایشات بعدی در محل خنک و تاریک نگهداری شد.

جدول ۱. سطوح اندازه‌گیری متغیرها در استخراج ترکیبات فنولی

متغیر	پارامتر	واحد	سطوح متغیر				
			۲(+α)	۱	۰	-۱	-۲(-α)
۱X	غلظت حلال	درصد	۹۰	۷۷/۵	۶۵	۵۲/۵	۴۰
۲X	زمان	دقیقه	۹۰	۸۲/۵	۷۵	۶۷/۵	۶۰
۳X	فرکانس	هرتز	۳۰۰	۲۳۵	۱۷۰	۱۰۵	۴۰
۴X	دما	سانتی‌گراد	۷۰	۶۲/۵	۵۵	۴۷/۵	۴۰

که β_0 عدد ثابت، $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$ ضرایب متغیرهای خطی، $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{14}, \beta_{23}, \beta_{24}, \beta_{34}$ ضرایب اثرات متقابل پارامترها می‌باشد در حالیکه $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{44}$ ضرایب درجه دوم پارامترها هستند. به منظور مدل‌سازی ابتدا باید مشخص کرد هر یک از موارد تعیین شده اعم از درجه یک، درجه دو و اثر متقابل در چه سطحی معنی‌دار شده‌اند که این مطلب با بررسی p مربوط به هر یک از پارامترها (جدول ۳) مشخص می‌شود. برای تهیه مدل در سطح اطمینان ۹۵٪، مواردی که $P < 0.05$ دارند در مدل استفاده می‌شوند. بر اساس آزمون‌های طراحی شده با روش سطح پاسخ، نتایج آنالیز آزمون‌های انجام شده که همان اندازه‌گیری ترکیبات فنولی می‌باشد، پاسخ در نظر گرفته می‌شود که در جدول ۲ مشخص گردیده است.

مقادیر انتخاب شده برای سطوح بالا و پایین متغیرها برای غلظت اتانول، زمان، دما، فرکانس و به ترتیب برابر با (۴۰ تا ۹۰ درصد)، (۶۰-۹۰ دقیقه)، (۴۰-۷۰)°C، (۴۰-۳۰۰ هرتز) در نظر گرفته شد. تیمارهای تعیین شده جهت استخراج ترکیبات فنولی بر اساس متغیرهای تعریف شده با در نظر گرفتن طرح CCD در جدول (۲) آمده است.

مدل ریاضی از این آزمون‌ها با حضور ۴ متغیر مطابق با (رابطه ۱) می‌باشد:

(رابطه ۱)

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{14} x_1 x_4 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{24} x_2 x_4 + \beta_{34} x_3 x_4 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{44} x_4^2$$

جدول ۲. تیمارهای انتخابی مطابق طرح مرکب مرکزی به منظور استخراج ترکیبات فنولی

تیمار	اتانول (%)	زمان (دقیقه)	فرکانس (هرتز)	دما (C°)	میزان ترکیبات فنولی استخراج شده (میلی گرم بر گرم عصاره خشک)
	۱X	۲X	۳X	؛X	
۱	۷۷/۵	۶۷/۵	۲۳۵	۶۲/۵	۸۸۴/۹
۲	۵۲/۵	۸۲/۵	۲۳۵	۴۷/۵	۹۶۱/۵
۳	۵۲/۵	۶۷/۵	۱۰۵	۴۷/۵	۹۹۹/۳
۴	۷۷/۵	۶۷/۵	۱۰۵	۴۷/۵	۹۷۳/۷
۵	۶۵	۷۵	۱۷۰	۵۵	۷۷۸/۷
۶	۶۵	۷۵	۱۷۰	۵۵	۷۴۶/۸
۷	۴۰	۷۵	۱۷۰	۵۵	۹۷۶/۸
۸	۵۲/۵	۶۷/۵	۱۰۵	۶۲/۵	۹۴۳
۹	۶۵	۷۵	۱۷۰	۷۰	۹۹۶/۰۵
۱۰	۶۵	۷۵	۱۷۰	۵۵	۷۶۰/۷
۱۱	۶۵	۷۵	۴۰	۵۵	۹۷۱/۸
۱۲	۶۵	۷۵	۱۷۰	۵۵	۷۸۰/۴
۱۳	۵۲/۵	۶۷/۵	۲۳۵	۶۲/۵	۱۰۱۵/۴
۱۴	۵۲/۵	۸۲/۵	۱۰۵	۶۲/۵	۷۵۲/۱
۱۵	۷۷/۵	۶۷/۵	۲۳۵	۴۷/۵	۹۷۳
۱۶	۶۵	۷۵	۳۰۰	۵۵	۹۶۴/۳
۱۷	۶۵	۹۰	۱۷۰	۵۵	۱۰۰۴/۳
۱۸	۷۷/۵	۸۲/۵	۱۰۵	۶۲/۵	۹۶۱/۰۵
۱۹	۷۷/۵	۸۲/۵	۲۳۵	۶۲/۵	۹۵۸/۵
۲۰	۶۵	۷۵	۱۷۰	۵۵	۸۵۰/۷
۲۱	۵۲/۵	۸۲/۵	۲۳۵	۶۲/۵	۹۴۵/۷
۲۲	۶۵	۷۵	۱۷۰	۵۵	۹۴۷/۶
۲۳	۶۵	۶۰	۱۷۰	۵۵	۹۴۸/۷
۲۴	۷۷/۵	۸۲/۵	۲۳۵	۴۷/۵	۹۸۶/۸
۲۵	۵۲/۵	۶۲/۵	۱۰۵	۴۷/۵	۹۵۸/۵
۲۶	۹۰	۷۵	۱۷۰	۵۵	۹۹۹/۳
۲۷	۵۲/۵	۶۷/۵	۲۳۵	۴۷/۵	۹۵۴/۶
۲۸	۷۷/۵	۸۲/۵	۱۰۵	۴۷/۵	۹۶۲/۱
۲۹	۷۷/۵	۶۷/۵	۱۰۵	۶۲/۵	۹۵۳
۳۰	۶۵	۷۵	۱۷۰	۴۰	۱۰۱۱/۰۵
۳۱	۶۵	۷۵	۱۷۰	۵۵	۸۳۹/۹

۴.۲. تعیین شرایط بهینه استخراج

به منظور تعیین شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنولی و آنتی اکسیدانی هر چهار متغیر در محدوده سطوح تعریف شده طراحی آزمون و مقدار ترکیبات فنولی و آنتی اکسیدانی در حد بیشینه تعریف شد. سپس شرایط بهینه فرایند جهت استخراج حداکثری ترکیبات فنولیک و آنتی اکسیدان توسط نرم افزار مشخص می‌شود و مقادیر به دست آمده در شرایط آزمون با مقادیر پیش بینی شده توسط مدل مقایسه می‌شود.

۵.۲. استخراج عصاره به وسیله حمام اولتراسونیک

به منظور استخراج عصاره مقدار ۵ گرم از پوست سبز بادام، با دقت ۰/۰۰۱ توزین شد و در ۵۰ میلی لیتر اتانول با غلظت‌های متفاوت بر اساس جدول تیمار حاصل از طراحی آزمون مخلوط شده و به وسیله ورتکس هم زده و سپس به منظور استخراج ترکیبات فنولی در حمام اولتراسونیک در مقادیر متفاوت از فرکانس، دما و زمان تعریف شده در تیمارها قرار داده شد. در مرحله بعد مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با شدت ۸۰۰۰xg سانتریفیوژ شد و فاز شفاف آن پس از جداسازی به وسیله اوپراتور چرخان تحت خلأ در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه تغلیظ شد و عصاره به دست آمده جهت آزمایشات بعدی در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته و در شرایط یخچال نگهداری شد (Tao et al., 2014).

۶.۲. استخراج ترکیبات فنولی به روش پرکولاسیون (سوکسله)

جهت مقایسه نتایج به دست آمده از اثر فرایند امواج فراصوت بر استخراج ترکیبات فعال از جمله ترکیبات فنولی موجود در پوست سبز بادام، روش غرقابی یا پرکولاسیون با استفاده از دستگاه سوکسله انجام شد. ابتدا مقدار ۵ گرم نمونه پوست سبز بادام پودر شده توزین شده و در حضور ۵۰ میلی لیتر اتانول با غلظت تعیین شده در تیمار بهینه حاصل از طراحی آزمون در شرایط حرارت دهی سوکسله به مدت ۱ ساعت عصاره آن استخراج شد. سپس حلال اضافی با اوپراتور تحت خلأ تبخیر شد و عصاره حاصل در میکروتیوب تا زمان انجام آزمون‌های بعدی در یخچال نگهداری شد.

۷.۲. بررسی اثر نسبت‌های مختلف حلال اتانول به نمونه بر

استخراج ترکیبات فنولی

پس از مشخص شدن شرایط بهینه در تیمار فراصوت و بر اساس طراحی آزمون رویه پاسخ، به منظور بررسی اثر نسبت حلال به ماده جامد بر محتوای کل ترکیبات فنولی استخراج شده، ۵ گرم از نمونه پودر پوست سبز بادام را در غلظت ۸۶٪ اتانول (غلظت به دست آمده از شرایط بهینه) و با نسبت‌های (w/w ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۳۰، ۱:۴۰) مخلوط کرده و در حمام اولتراسوند در دما، شدت فرکانس و زمان تعیین شده در تیمار بهینه قرار داده شد. سپس نمونه از دستگاه خارج شده و پس از سانتریفیوژ شدن به مدت ۲۰ دقیقه با شدت ۸۰۰۰xg، فاز شفاف آن به وسیله روتاری اوپراتور در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه تحت خلأ تغلیظ شده تا زمانی که ۲ الی ۳ میلی‌لیتر از آن باقی بماند، عصاره به دست آمده جهت تعیین مقدار فنول کل و قدرت بازدارندگی رادیکال آزاد مورد ارزیابی قرار گرفت.

۸.۲. اندازه‌گیری ترکیبات فنولی عصاره

جهت تعیین کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌ها روش Uma و همکاران (۲۰۱۰) همراه با کمی تغییرات استفاده شد. به این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از هر عصاره با ۱/۵۸ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و ۱۰۰ میکرولیتر فولین سیوکالتیو و ۳۰۰ میکرولیتر از کربنات سدیم ۰/۲ مولار باهم مخلوط شده و حدود ۳۰ دقیقه در جای تاریک آن را نگهداری کرده و جذب آن در اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. از طریق این جذب‌های خوانده شده و معادله خط به دست آمده از نمودار کالیبراسیون مقدار ترکیبات فنولی عصاره محاسبه می‌گردد (Uma et al., 2010). جهت ترسیم منحنی استاندارد از اسید گالیک استفاده شد و مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره بر اساس میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن ماده خشک نمونه گزارش شد.

۹.۲. اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج

شده

در این پژوهش خاصیت آنتی‌اکسیدانی محلول‌های تیمار شده با اتانول در نسبت‌های مختلف حلال به نمونه با روش به دام انداختن

پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی استفاده شد. به منظور بررسی اثر نسبت حلال و فاز جامد بر مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده و همچنین مقایسه روش فراصوت و پرکولاسیون از روش مقایسه میانگین و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد.

۳. نتایج و بحث

۱.۳. بررسی اثر متغیرها بر محتوای ترکیبات فنولی استخراج شده و ارائه مدل پیشنهادی برای استخراج ترکیبات فنولیک

روش سطح پاسخ برای تعیین شرایط بهینه مورد استفاده قرار می‌گیرد (Montgomery, 2012) و در این تحقیق اثر چهار پارامتر دما، زمان، فرکانس و غلظت اتانول بر غلظت ترکیبات فنولی مطابق با طرح CCD مورد بررسی قرار گرفت تا دما، زمان، غلظت و فرکانس بهینه برای استخراج حداکثر ترکیبات فنولی مشخص گردد. بر اساس آزمون‌های طراحی شده با روش سطح پاسخ، نتایج آنالیز آزمون‌های انجام شده که همان اندازه‌گیری ترکیبات فنولی می‌باشد، به عنوان پاسخ در نظر گرفته شد که در جدول ۲ ارائه شده است. مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده در محدوده ۷۴۶/۸ تا ۱۰۱۵/۴ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک متغیر بود. نتایج آنالیز داده‌های به‌دست آمده در شرایط تعیین شده در جدول ۳ ذکر گردیده است.

رادیکال DPPH مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا محلول ۰/۳ میلی مولار از DPPH با متانول تهیه شد و ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه به همراه ۰/۵ میلی‌لیتر DPPH و ۱ میلی‌لیتر متانول را در سل اسپکتروفوتومتر ریخته به مدت ۳۰ دقیقه در جای تاریک و در دمای اتاق نگهداری شده و سپس جذب مخلوط واکنش در ۵۱۷ نانومتر در حضور سل متانول و محلول کنترل حاوی ۱/۵ میلی‌لیتر متانول و ۰/۵ میلی‌لیتر DPPH خوانده می‌شود. درصد فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود (Zeljko et al., 2015).

$$\text{IC \%} = (A \text{ control} - A \text{ sample} / A \text{ control}) \times 100 \quad (2)$$

IC: فعالیت مهار کنندگی رادیکال
A control: جذب نمونه کنترل
A sample: جذب نمونه

به این منظور ابتدا منحنی کالیبراسیون با تعیین جذب غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک ترسیم و سپس با توجه به نمودار ترسیم شده و معادله آن میزان بازدارندگی عصاره‌های استخراج شده تعیین گردید.

۱۰.۲. تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولیک موجود در پوست سبز بادام از نرم افزار مینی تب نسخه ۱۷ و با روش سطح

جدول ۳. تجزیه واریانس مربوط به مدل استخراج ترکیبات فنولی

منابع	درجه آزادی	مجموع مربعات دنباله‌ای	میانگین مربعات تصحیح شده	F	P
رگرسیون	۱۴	۱۴۷۶۵۵	۱۰۵۴۶/۸	۲/۸۱	۰/۰۲۵
خطی	۴	۸۸۹۳	۲۲۲۳/۳	۰/۵۹	۰/۶۷۳
درجه دوم	۴	۱۱۶۴۲۰	۲۹۱۰۴/۹	۷/۷۶	۰/۰۰۱
حاصل ضرب	۶	۲۲۳۴۳	۳۷۲۳/۸	۰/۹۹	۰/۴۶۳
خطای باقیمانده	۱۶	۶۰۰۴۳	۳۷۵۲/۷	-	-
خطای عدم برازش	۱۰	۳۰۴۵۱	۳۰۴۵/۱	۰/۶۲	۰/۷۶۲
خطای خالص	۶	۲۹۵۹۲	۴۹۳۲	-	-
خطای کل	۳۰	۲۰۷۶۹۸	-	-	-

عدم تطابق مدل برابر با ۰/۶۲ می‌باشد که با توجه به اینکه مقدار آن از $(\alpha = 0/05)$ بیشتر شده است معنادار نبوده و دلیل بر این است که مدل ارائه شده در سطح اطمینان ۹۵٪ تطابق دارد.

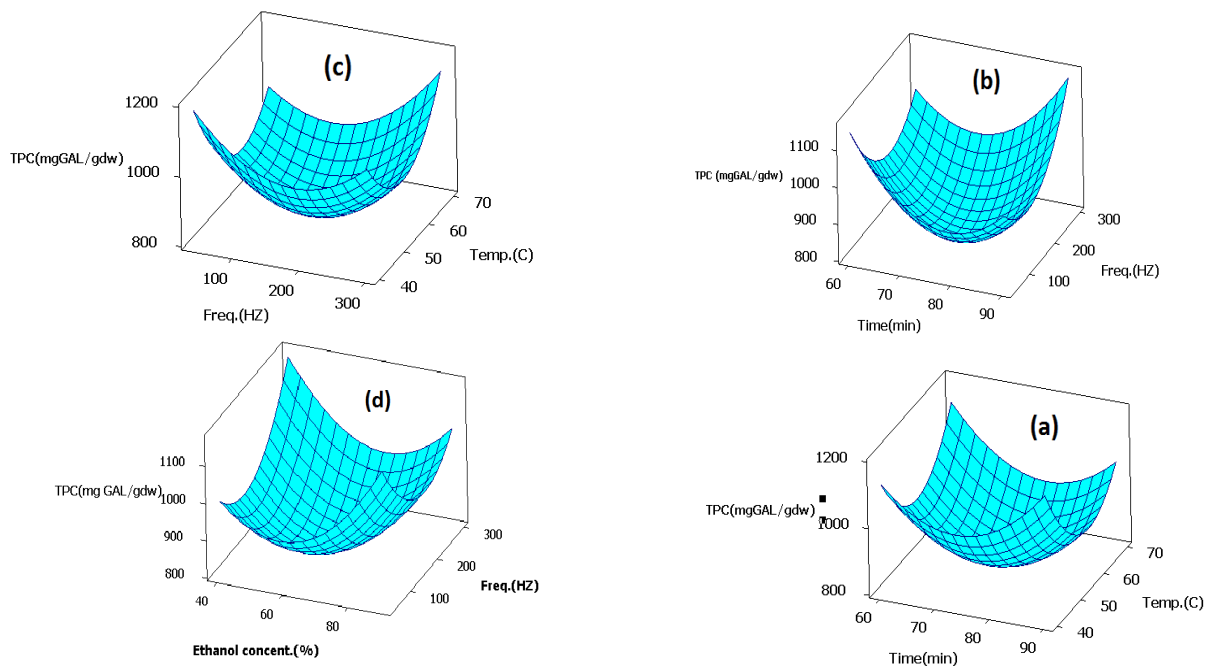
برای بررسی اثرات چهار متغیر بر مقدار استخراج ترکیبات فنولی، نمودار سه بعدی سطح پاسخ و همچنین نمودارهای کانتور آنها ارائه گردیده است.

طبق شکل ۱a، بیشترین میزان ترکیبات فنولی در زمان ۹۰ دقیقه و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد دیده می‌شود. به این ترتیب با افزایش زمان و کاهش دما میزان استخراج این ترکیبات بیشتر می‌شود زیرا با افزایش زمان، انتقال جرم بیشتر و بهتر صورت گرفته و این ترکیبات بیشتر آزاد می‌شوند و روند کاهش دما نیز به خاطر حساسیت این ترکیبات به دما باعث بهبود استخراج می‌شود. شارمیلا و همکاران (۲۰۱۶) در تحقیقات خود بر روند استخراج ترکیبات فنولی بیان داشتند که در دماهای بالا، کاهش در میزان استخراج مشاهده می‌شود (Sharmila et al., 2016).

بر اساس نتایج به دست آمده در جدول ۳، استخراج ترکیبات فنولی به‌طور قابل توجه و مشخص تحت تاثیر زمان (X_2) ، دما (X_4) ، فرکانس (X_3) و همچنین غلظت اتانول (X_1) می‌باشد به طوری که مربعات غلظت اتانول $(X_1)^2$ ، زمان $(X_2)^2$ ، فرکانس $(X_3)^2$ و دما $(X_4)^2$ به‌عنوان یک پارامتر مؤثر و معنادار بر مقدار استخراج فنولی آزاد شده می‌باشند. در حالیکه با عدم معنادار بودن مقادیر مربوط به اثرات متقابل پارامترهای مختلف و حذف ضرایب مربوط به پارامترهایی که معنادار نیستند مدل نهایی پیشنهادی در این طراحی به‌صورت رابطه ۳ ارائه می‌گردد:

$$y = 37.4x_1^2 + 34.5x_2^2 + 32.4x_3^2 + 41.3x_4^2 \quad \text{رابطه (۳)}$$

برای ارزیابی کیفیت مدل و اندازه‌گیری اینکه مدل ارائه شده با داده‌های حاصل از آزمون تطابق دارد پارامترهایی چون F-value، عدم تطابق مدل (Lack-of-Fit) و ضریب همبستگی مورد بررسی قرار می‌گیرد (Montgomery, 2012). ضریب همبستگی داده‌ها برای رابطه پیشنهادی برابر با ۹۰/۷۱ می‌باشد $(r^2 = 90/71)$. مقدار



شکل ۱- نمودار سطح پاسخ سه بعدی میزان استخراج ترکیبات فنولی در مقابل زمان، دما، فرکانس امواج فراصوت و غلظت اتانول

میوه داغداغان و مقایسه حلال متانول ۸۰٪ و اتانول، تاثیر اتانول را در استخراج این ترکیبات بهتر گزارش کردند (Nasiri far et al., 2013) در حالی که حاجی مهدی پور و همکاران (۱۳۸۸) در استخراج ترکیبات فنولی از گیاه سرخارگل، متانول را در بین حلال‌های مورد بررسی در استخراج این ترکیبات موثرتر معرفی کردند (Hajimehdipoor et al., 2009).

۲.۳. بهینه استخراج ترکیبات فنولیک

پس از بهینه‌سازی فاکتورهای موثر در استخراج ترکیبات فنولی مشخص شد که مقدار بهینه استخراج در شرایطی که اتانول ۸۶٪، دما ۵۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۷۵ دقیقه و فرکانس ۱۶۳ هرتز باشد حاصل می‌شود. تحت این شرایط، مقدار استخراج ترکیبات فنولی توسط نرم افزار ۱۰۱۵ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک پیش‌بینی شد و با انجام این تیمار در آزمایشگاه، مقدار واقعی ترکیبات فنولی استخراج شده ۸۸۳/۲۷ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک نمونه اندازه‌گیری شد.

۳.۳. مقایسه درصد ترکیبات فنولیکی و ظرفیت آنتی اکسیدانی پوست سبز بادام استخراج شده در نسبت‌های مختلف حلال به ماده جامد به روش فراصوت و سوکسله

نسبت‌های مختلف ماده جامد (پوست سبز بادام) به حلال (۱:۱، ۲:۱، ۳:۱، ۴:۱) تهیه و در دستگاه فراصوت در فرکانس ۱۶۳ هرتز به مدت ۷۵ دقیقه و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (طبق شرایط بهینه) قرار گرفت تا استخراج صورت پذیرد. نتایج به دست آمده در جدول ۴ قابل مشاهده است. همان‌گونه که در جدول ۴ مشاهده می‌شود اختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف با نسبت‌های مختلف حلال وجود دارد و بیشترین مقدار استخراج در نسبت ۴:۱ مشاهده می‌شود.

همچنین اختلاف معنی‌داری در میزان ترکیبات فنولی استخراج شده با روش فراصوت و پركولاسیون مشاهده می‌شود و این بیانگر این امر است که امواج فراصوت تأثیر بیشتری در آزادسازی و استخراج ترکیبات فنولی داشته است.

در تحقیقات دلیل این امر را به تجزیه حرارتی یا واکنش پلیمریزاسیون ترکیبات فنولی با خودشان نسبت داده‌اند. در نتایج دیگر محققان نیز اثر افزایش دما بر کاهش ترکیبات فنولی را تجزیه حرارتی آنها می‌دانند. با توجه به شکل ۱b میزان استخراج این ترکیبات با افزایش فرکانس بیشتر می‌شود زیرا استخراج به کمک فراصوت می‌تواند بر ویژگی‌های عملکردی، جرم ملکولی و وزن مولکولی بیوپلیمرها اثر گذاشته و از طریق کاویتاسیون، تنش برشی و ایجاد اغتشاش منجر به تغییرات شیمیایی و فیزیکی از جمله ایجاد حفره در مولکول‌ها، آنها را از حالت پلیمری خارج کند، تخریب شیمیایی نیز با ایجاد رادیکال‌های هیدروکسیل در بیوپلیمرها صورت می‌گیرد.

شکل ۱c تاثیر همزمان فرکانس و دما بر استخراج ترکیبات فنولی نشان می‌دهد. افزایش دما و فرکانس هر دو منجر به افزایش استخراج این ترکیبات شده است. رودریگز و همکاران (۲۰۰۷) نیز در استخراج ترکیبات فنولی از پوست چوبی نارگیل روند افزایش دما را در استخراج ترکیبات فنولی موثر یافتند (Rodrigues and Pinto, 2007). در حالی که کمالی و همکاران (۱۳۹۲) نیز در استخراج ترکیبات فنولی از گیاه سنجد زینتی کاهش دما را در بیشتر شدن میزان استخراج این ترکیبات موثر معرفی کرده‌اند (Kamali et al., 2015).

در شکل ۱d نیز مشاهده می‌شود که فرکانس ۳۰۰ هرتز که یک فرکانس با قدرت زیاد است با افزایش سطح تماس بین جامد و فاز مایع از طریق نفوذ به ماتریس جامد، استخراج بیشتر این ترکیبات را باعث می‌شود و در غلظت اتانول ۹۰٪ بر اساس نتایج به دست آمده نشان داد که نوع حلال بر راندمان استخراج تأثیر گذار بوده و راندمان عصاره‌گیری با افزایش قطبیت حلال افزایش یافته است. به نظر می‌رسد که حلال‌های ترکیبی کارایی بیشتری در استخراج ترکیبات فنولی داشته باشد (Lou et al., 2016). غفور و چوی (۲۰۰۹) نیز در استخراج ترکیبات فنولی از پوست انگور، افزایش غلظت حلال را مطابق با نتایج این پژوهش در استخراج ترکیبات فنولی مؤثر گزارش کرده‌اند (Ghafoor and Choi, 2009). نصیری و همکاران (۱۳۹۲) در استخراج ترکیبات فنولی از

جدول ۴. مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده در نسبت‌های مختلف حلال به ماده جامد

تیمار	نسبت مختلف حلال / ماده جامد (w/w)	مقدار ترکیبات فنولی میلی گرم بر گرم عصاره خشک	مقدار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (%)
۱	۱۰:۱	۸۸۳/۱۷ ± ۱/۲۷ ^{cd}	۸۰/۱۱ ± ۰/۲۳ ^c
۲	۲۰:۱	۸۹۵/۲۶ ± ۲/۱۷ ^c	۸۴/۱۳ ± ۰/۱۱ ^b
۳	۳۰:۱	۱۱۱۴/۶۱ ± ۳/۱۳ ^b	۸۷/۱۱ ± ۰/۱۶ ^a
۴	۴۰:۱	۱۱۳۴/۱۹ ± ۴/۲۳ ^a	۸۷/۱۱ ± ۰/۴۲ ^a
۵	سوکسله	۷۸۹/۰۸ ± ۲/۱۶ ^e	۷۳/۱۳ ± ۰/۵۵ ^d

حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنادار ($P < 0.05$) بین نتایج در ستون می‌باشد.

برخورد تصادفی ذرات با سرعت بالا تسهیل شده و در نهایت منجر به افزایش انتقال جرم می‌گردد. علاوه بر این، وقوع کاپیتاسیون نزدیک سطح مایع-جامد باعث ایجاد میکروکانال‌هایی می‌شود که در شکست و سایش سطح ذرات نقش دارد. این امر منجر به در معرض قرار گیری سطوح جدیدتر و در نتیجه افزایش انتقال جرم می‌گردد (Wang et al., 2013). با آزادسازی بیشتر ترکیبات فنولی خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش می‌یابد زیرا این ترکیبات خود به نوعی نقش آنتی‌اکسیدانی دارند. پس در نتیجه انتظار می‌رود در روش فراصوت خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر از روش سوکسله باشد.

۴. نتیجه‌گیری

نتیجه حاصل از انجام این پژوهش نشان داد استفاده از امواج فراصوت در مقایسه با روش سوکسله (پروکولاسیون) به دلیل ایجاد پدیده کاپیتاسیون و حفره در غشاء سلول، توانایی بیشتری برای نفوذپذیری غشا به حلال و به تبع آن آزاد سازی و استخراج ترکیبات فنولی از سلول های پوست سبز بادام دارد و زمان تیمار، دمای فرایند و شدت امواج بر مقدار آزاد سازی این ترکیبات موثر می‌باشند. شرایط بهینه برای استخراج ترکیبات فنولی موجود در پوست سبز بادام دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۸۳ درصد اتانول و امواج فراصوت با فرکانس ۱۶۳ هرتز به مدت ۷۵ دقیقه تعیین شد. همچنین اثر نسبت حلال به ماده جامد نیز بر مقدار ترکیبات استخراج شده و اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصل موثر بود و تفاوت معناداری بین نمونه‌ها دیده شد. در جمع‌بندی نهایی از نظر

فراصوت آسان‌ترین روش برای تخریب سلول‌ها و تولید عصاره می‌باشد. این روش بسیار کار آمد، ایمن و قابل اعتماد است. به منظور استخراج مواد، غشا سلول‌ها باید شکسته شود. حفره‌سازی فراصوت، نیروها برشی ایجاد می‌کند که دیواره‌های سلول را به‌طور مکانیکی می‌شکند و انتقال مواد را بهبود می‌بخشد (Yingngam et al., 2014). از این اثر در استخراج مواد از سلول‌ها استفاده می‌شود. به همین دلیل روش اولتراسوند سریع‌تر و کامل‌تر از روش پروکولاسیون و سایر روش‌های غرقابی است. روش استفاده از دستگاه سوکسله کارایی کمتری را در استخراج نشان می‌دهد و این نمایانگر این امر است که در روش سوکسله، دمای بالا منجر به تخریب برخی ترکیبات فنولی می‌شود. فراصوت همچنین سبب کاهش اندازه ذرات می‌شود که سطح تماس را افزایش داده و در نتیجه انتشار حلال در بافت افزایش می‌یابد. در هر حال، روش اولتراسوند به دلیل کاستن قابل توجه زمان عصاره‌گیری و افزایش کارایی نسبت به روش پروکولاسیون ارجح می‌باشد (Dahmoune et al., 2015).

در مقایسه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های به‌دست آمده با روش فراصوت و پروکولاسیون نیز همان‌گونه که در جدول ۴ مشاهده می‌شود اختلاف معنی‌داری در نتایج وجود دارد و بیشترین میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در عصاره روش فراصوت و در نسبت ۴۰:۱ از حلال به پوست بادام دیده می‌شود که از استخراج این ترکیبات به روش سوکسله بیشتر می‌باشد.

افزایش راندمان استخراج در تیمارهای فراصوت در مقایسه با روش رایج حرارت دهی را می‌توان به اثر این امواج در ایجاد پدیده کاپیتاسیون مربوط دانست. با انتشار امواج فراصوت و انفجار حباب‌ها، ایجاد جریان آشفته و تلاطم در سیستم می‌شود و در اثر آن،

- (Moench). *Journal of Medicinal Plants*, 8(32): 145-152.
- Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Jia, C., Zhang, X., Xia, W. 2009. Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Separation and Purification Technology*, 70(1): 63-70.
- Jahanban, A.E., Heidari, R., Hasanzadeh, A., Jamei, R. 2010. Antioxidant and antiradical activities of phenolic extracts from Iranian almond (*Prunus amygdalus* L.) hulls and shells. *Turkish Journal of Biology*, 34: 165-173.
- Kamali, F., Sadeghi Mahoonak, A.R., Nasirifar, Z. 2015. The effect of ultrasound-assisted conditions on the extraction of phenolic compounds and flavonoids from autumn olive fruits (*Elaeagnus Umbellata*). *Journal of food technology and nutrition*, 12(2): 23-32.
- Lou, S.N., Lai, Y.C., Hsu, Y.S., Ho, C.T. 2016. Phenolic content, antioxidant activity and effective compounds of kumquat extracted by different solvents. *Food Chemistry*, 197: Part A, 1-6.
- Mohagheghi Samarin, A., Poorazarang, H., Elhamirad, A.H., Dezashibi, Z., Hematyar, N. 2010. Extraction of phenolic compounds from potato peel (*Ramus Variey*) with solvent and ultrasound-assisted methods and evaluation of its antioxidant activity in soybean oil. *Iranian journal of food science and technology*, 8(1): 81-91.
- Montgomery, D.C. 2012. *Design-and-Analysis of Experiments-Wiley*. 8th edition, pp. 757.
- Nasiri far, Z., Sadeghi Mahoonak, A., Kamali, F. 2013. Effect of extraction condition with two ultrasonic methods on phenolic, flavonoids and DPPH free radical scavenging of *Celtis australis* extract. *Journal of Food Processing and Preservation*, 5: 115-129.
- Pereira, P., Bernardo-Gil, M.G., Cebola, M.J., Mauricio, E., Romano, A. 2013. Supercritical fluid extracts with antioxidant and antimicrobial activities from myrtle (*Myrtus communis* L.) leaves. Response surface optimization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 83: 57-64.
- Rodrigues, S., Pinto, G.A.S. 2007. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder. *Journal of food engineering*, 80(3): 869-872.
- دارا بودن فیتوترکیب‌های مهم و با ارزش در این گیاه اولویت با اندام گل و نقطه بهینه برداشت ترجیحاً سایت قاسم آباد می‌باشد. اما به هر حال تفاوت فاحشی بین سایت‌ها از لحاظ حضور و مقدار این مواد مؤثره وجود ندارد.

۵. منابع

- Abbasi, A.M., Shah, M.H., Li, T., Fu, X., Guo, X., Liu, R.H. 2015. Ethnomedicinal values, phenolic contents and antioxidant properties of wild culinary vegetables. *Journal of Ethnopharmacology*, 162: 333-345.
- Adjé, F.A., Lozano, Y.F., Le Gerneve, C., Lozano, P.R., Meudec, E., Adima, A.A., Gaydou, E.M. 2012. Phenolic acid and flavonol water extracts of *Delonix regia* red flowers. *Industrial Crops and Products*, 37 (1): 303-310.
- Baba, S.A., Malik, S.A. 2015. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *Journal of Taibah University for Science*, 9(4): 449-454.
- Dahmoune, F., Remini, H., Dairi, S., Aoun, O., Moussi, K., Bouaoudia-Madi, N., Adjeroud, N., Kadri, N., Lefsih, K., Boughani, L., Mouni, L., Nayak, B., Madani, K. 2015. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *P. lentiscus* L. leaves: Comparative study of artificial neural network (ANN) versus degree of experiment for prediction ability of phenolic compounds recovery. *Industrial Crops and Products*, 77: 251-261.
- Galiñanes, C., Freire, M.S., Gonzalez-Alvarez, J. 2015. Antioxidant activity of phenolic extracts from chestnut fruit and forest industries residues. *European Journal of Wood and Wood Products*, 73: 651-659.
- Ghafoor, K., Choi, Y.H. 2009. Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape peel through response surface methodology. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52 (29): 300-305.
- Hajimehdipoor, H., Khanavi, M., Shekarchi, M., Abedi, Z., Pirali Hamedani, M. 2009. Investigation of the best method for extraction of phenolic compounds from *Echinaceae purpurea* L.

- Sharmila, G., Nikitha, V.S., Ilaiyarasi, S., Dhivya, K., Rajasekar, V., Kumar, N.M., Muthukumaran, K., Muthukumaran, C. 2016. Ultrasound assisted extraction of total phenolics from *Cassia auriculata* leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 84: 13-21.
- Tao, Y., Wu, D., Zhang, Q.A., Sun, D.W. 2014. Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: Modeling, optimization and stability of extracts during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(2): 706-715.
- Uma, D.B., Ho, C.W., Wan Aida, W.M. 2010. Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from Henna (*Lawsonia inermis*) leaves. *Sains Malaysiana*, 39(1): 119-128.
- Wang, X., Wu, Y., Chen, G., Yue, W., Liang, Q., Wu, Q. 2013. Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from Sparganii rhizoma with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(3): 846-854.
- Yingngam, B., Monschein, M., Brantner, A. 2014. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Cratoxylum formosum* ssp. formosum leaves using central composite design and evaluation of its protective ability against H₂O₂-induced cell death. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 7(Supplement 1)*: S497-S505.
- Zeljko, S.C., Topcagic, A., Pozgan, F., Stefane, B., Tarkowski, P., Maksimovic, M. 2015. Antioxidant activity of natural and modified phenolic extracts from *Satureja montana* L. *Industrial Crops and Products*, 76: 1094-1099.
- Zhang, Q.A., Zhang, Z.Q., Yue, X.F., Fan, X.H., Li, T., Chen, S.F. 2009. Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder. *Food Chemistry*, 116(2): 513-518.