فصل‌نامه‌ی داروهای گیاهی
Journal homepage: WWW.ojs.iaushk.ac.ir

بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک از گیاه پونه گاوی (*Flomidoschema parviflora*) با استفاده از دستگاه اولتراسوند

مجتبی حیدری مجد[۱]، سید علی مرتضوی[۲]*، جواد اصیلی[۳]، شادی بلوریان[۴]، محمد آرمین[۵]، آنا عبدالشاهی[۶]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، گروه علوم و صنایع غذایی، سبزوار، ایران؛
۲. گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛
*مسئول مکاتبات: (E-mail: Morteza1937@yahoo.com)
۳. گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛
۴. گروه پژوهشی و افزودنی های غذایی جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد، ایران؛
۵. دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، سبزوار، ایران؛
۶. شبکه بهداشت و درمان دامغان دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران؛

شناسه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۴/۲۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۰۹/۲۰
نوع مقاله: پژوهشی
موضوع: به زراعی – به نژادی

کلید واژگان :

- ✓ *اولتراسوند*
- ✓ *بهینه سازی*
- ✓ *ترکیبات فنولیک*
- ✓ *روش سطح پاسخ*

چکیده

مقدمه و هدف: با پیشرفت علوم و صنایع غذایی گرایش به جایگزینی افزودنی های طبیعی به جای انواع سنتزی در مواد غذایی به وجود آمده است. با توجه به اثرات سوء و نامطلوب آنتی اکسیدان های سنتزی استفاده از آنتی اکسیدان های حاصل از منابع طبیعی در چربی ها و روغن های خوراکی به عنوان یک راه حل منطقی در نظر گرفته می شود. در این پژوهش، بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک از عصاره متانولی ۸۰ درصد گیاه پونه گاوی با استفاده از اولتراسوند و به کمک روش سطح پاسخ پرداخته شده است..

روش تحقیق: برای بهینه سازی فرآیند در آزمون ها ۳ عامل دما (۱۵، ۳۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد) ، زمان (۱۵، ۳۵ و ۵۵ دقیقه) و pH (۶، ۷ و ۸) هر کدام در ۳ سطح مورد بررسی قرار گرفت. این طرح از طریق Box-Behnken در سه عامل و در سه سطح که شامل ۱۷ آزمون است انجام شد.

نتایج و بحث: نتایج به دست آمده نشان می دهد که مناسب ترین شرایط برای استخراج ترکیبات فنولیک زمان ۴۷ دقیقه، دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد و pH=۶.۶ می باشد. در بررسی نتایج و روند نمودارها زمان به عنوان موثرترین عامل شناسایی شد. هم‌چنین مقایسه بین دو روش استخراج، یعنی غرقابی و اولتراسوند نشان داد که راندمان استخراج ترکیبات فنولیک در روش اولتراسوند نسبت به روش غرقابی بیشتر است.

توصیه کاربردی/ صنعتی: در نهایت عصاره گیری به روش اولتراسوند ممکن است از نظر کارآیی استخراج مواد فنولیک از گیاه پونه گاوی پیشنهاد می شود.

۱. مقدمه

کانون توجهات اخیر به مواد فیتوشیمیایی مشتق شده از گیاهان بوده است که این ناشی از اثرات مثبت آن‌ها بر سلامتی بشر می باشد. مواد غذایی را در طی فرآوری در کارخانه جات می‌توان با ترکیبات فعال[۱] از قبیل ترکیبات فنولیک که دارای فواید و

1- Bioactive

خصوصیات فیزیولوژیکی از جمله ضد آلـرژی[۲]، ضـد التهـاب[۳]، ضـد میکروبی[۴]، آنتی اکسیدانی[۵] و غیره می باشند، غنـی سـازی نمـود. اثرات سودمند موجود در ترکیبـات فنولیـک بـه خصوصـیات آنتـی اکسیدانی آن‌ها مربوط می شود (Rodriges *et al*., 2007). ترکیبات دارای خاصیت ضد اکسیدان، شامل ترکیبات فنولی هسـتند کـه در برخی از گیاهـان یافـت مـی‌شـوند. افـزودن آنتـی اکسـیدان هـای مصنوعی مانند بوتیلاتد هیدروکسی آنیزول[۶]، بوتیلاتـد هیدروکسـی تولوئن[۷]و ترتیاری بوتیل هیدروکینون[۸]می‌تواند اکسیداسیون لیپدها را در مواد غذایی کنترل کند. ولیکن استفاده از این آنتـی‌اکسـیدان های مصنوعی به دلیل خطراتی کـه در سـلامتی دارنـد و بـه دلیـل سمیت آن‌ها محدود شده است (Weisburger, 1999). اثرات سمی و سرطان‌زایی این آنتـی‌اکسـیدان هـای سـینتتیک بـر روی انسـان شناخته شده است. هم‌چنین آنتی‌اکسیدان های سـینیتیک ممکـن است باعث توروم کبد شوند و بر روی فعالیت های آنزیمی کبد اثـر بگذارنـد (Hayouni *et al*., 2007). بنـابراین در سـال هـای اخیـر تلاش برای شناخت آنتی اکسیدان های طبیعـی خصوصاً بـا منشـا گیاهی افزایش یافته است (Mahdavi *et al*., 2995).

نتایج مطالعات نشان می دهد که فعالیت آنتی اکسیدانی بعضی از سبزی‌جات و میوه جات به طور گسترده به محتوای کل ترکیبات فنولیک آن ها وابسته است. از نقطه نظر استخراج ترکیبات موثره از محصولات کشاورزی یا پس مانده های آن، میزان استخراج ترکیبات فعال آن‌ها از جمله ترکیبـات فنولیـک بسـیار مهـم اسـت و میـزان حضور ترکیبات فنولیک در محصولات غذایی به صورت طبیعـی یـا غنی شده نشان دهنده ارزش غذایی آن محصول در حفظ سـلامتی بشر است. به همین جهت در فرآیند اسـتخراج عـواملی چـون نـوع حلال، دما و زمان استخراج بسیار مهم هستند. هم‌چنین نحوه عمل استخراج می توانـد بـه صـورت سـنتی از طریـق روش هـایی مثـل سوکسـله، غرقـابی و یـا از طریـق فـن‌آوری هـای جدیـدی ماننـد مایکروویو و یا امـواج مـافوق صـوت صـورت گیـرد. در ایـن زمینـه پژوهش های زیادی توسط محققان صورت گرفته اسـت. بـه عنـوان مثـال رودریگـز و هـم‌کـاران (Rodriges *et al*., 2007) موفـق بـه استخراج ترکیبات فنولیک از پوسـت نارگیـل کـه یکـی از ضـایعات محصولات کشاورزی است شدند. در این پژوهش نیز به بهینه سازی اسـتخراج ترکیبـات فنولیـک از گیـاه پونـه گـاوی بـا نـام علمـی *Flomidoschema parviflora* کـه از گیاهـان خـانواده نعنـاع (Lamiaceae) می باشد با استفاده از اولتراسوند پرداخته شده است و در ادامه به مقایسه دو روش استخراج، یعنی غرقابی و اولتراسـوند پرداخته شده است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. مواد گیاهی

گیاه پونه گاوی *Flomidoschema parviflora* در خرداد مـاه سال ۸۹ از ارتفاعات شهرستان گناباد واقع در استان خراسان جمـع آوری شد و سپس در دمای اتـاق و دور از نـور خورشـید در مسـیر جریان هوا، خشک شده و سپس توسط آسیاب برقی صنعتی، پـودر شده و از الک با مش ۱۰۰ عبور داده شد و در محلی تاریک، سرد و خشک نگهداری شد. نمونه گیاهی گونه مذکور بـا اسـتناد بـه فلـور پاکستان موجود در کتابخانه دانشگاه فردوسی مشهد و متخصصـین گیاه شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد مورد تأیید قرار گرفت.

۲-۲. استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی

جهت تهیه عصاره از برگ و گـل‌هـای گیـاه از روش غرقـابی و روش استخراج با دسـتگاه اولتراسـوند، اسـتفاده شـد. حـلال مـورد استفاده در هر دو روش متانول ۸۰ درصـد بـود. متـانول بـه عنـوان حلال مؤثر به طور گسترده برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از منابع گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۲-۲-۱. روش غرقابی

۵ گرم نمونه پودر شده گیاهی با ۱۷۵ میلـی لیتـر متـانول ۸۰ درصد (نسبت ۱:۱۰ حجمی/ وزنی) طی مدت ۲۴ ساعت به وسیله دستگاه شیکر و در دمای محیط مخلوط شد. مخلوط عصاره حاصل با کاغذ واتمـن شـماره یـک صـاف گردیـد و در دمـای ۵-۲ درجـه

2- Anti-allergic
3- Anti-inflammatory
4- Anti-microbial
5- Anti-oxidant
6- BHA
7- BHT
8- TBHQ

سانتی‌گراد برای حفظ ترکیبات فنولیک در یخچال نگهداری شد. در مرحله بعدی پودر گل پونه گاوی عصاره گیری شده در مرحله اول وزن گردید و به نسبت ۱:۱۰ حجمی/ وزنی با حلال تازه (متانول ۸۰ درصد) توسط دستگاه شیکر در دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت مخلوط گردید. مخلوط به دست آمده از مرحله دوم نیز همانند مرحله اول با کاغذ واتمن شماره یک صاف گردید و عصاره حاصل از مرحله دوم به عصاره حاصل از مرحله اول اضافه شد و در ادامه در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد با دستگاه روتاری تغلیظ و سپس در آون تحت خلاء و در همان دما تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد (هاربون، ۱۳۸۵).

۲-۲-۲. استخراج با اولتراسوند

در فرآیند استخراج با اولتراسوند مدل Dr. Hilscher، میزان نمونه به حلال، با توجه به استفاده از Sonotrode، مدل S2 قطر یک میلی‌متر و حداکثر دامنه نوسان[9] برابر با ۲۶۰ میکرومتر، محدودیت استفاده حجمی بین ۵۰-۲ میلی‌متر وجود دارد، به همین خاطر حلال در یک نسبت ثابت ۳۵ میلی لیتر به یک گرم پودر گیاه اضافه می‌شود.

۲-۳. اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولیک

مقدار کل ترکیبات فنولیک در عصاره حاصل از دو روش استخراج غرقابی و التراسوند، بر اساس روش فولین سیوکالتیو مورد بررسی قرار گرفت (Hayouni *et al.*, 2007). برای تهیه محلولی از پودر عصاره خشک شده با غلظت ۱۰۰۰ قسمت در میلیون در بالن ۱۰۰ میلی لیتر، و به ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر عصاره خشک شده متانول ۸۰ درصد اضافه می‌کنیم تا به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسد و بالن را در روی Heater Magnetic قرار می‌دهیم تا پودر عصاره به طور کامل در متانول حل شود.

برای آزمون فولین، عصاره‌های تهیه شده، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره ۱۰۰۰ قسمت در میلیون را در لوله آزمایش ریخته و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده، معرف فولین سیوکالتیو را به نسبت (۱/۱۰) را اضافه می‌کنیم. بعد از فاصله زمانی ۱ دقیقه، در دمای اتاق ۱/۵ میلی لیتر از کربنات سدیم ۲۰ درصد را اضافه می‌کنیم و تا حد کافی عمل هم‌زدن را انجام می‌دهیم. ترکیب درون لوله آمایش به مدت ۲ ساعت در تاریکی در دمای اتاق نگهداری می‌شود و سپس جذب محلول در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط اسپکترفتومتر خوانده شد. آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد.مقدار کل ترکیبات فنولیک از روی معادله خط رسم شده بر مبنای اسید گالیک به صورت میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره خشک شده بیان گردید. آزمون فولین، با سه تکرار انجام شد.

۲-۴. رسم منحنی استاندارد

محلول‌های استاندارد در غلظت‌های مختلف اسید گالیک (۰، ۳۰، ۷۰، ۱۱۰، ۱۵۰، ۱۹۰ و ۲۲۰ قسمت در میلیون در متانول ۸۰ درصد) تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از هریک از محلول‌ها را در لوله آزمایش وارد کرده و سایر مراحل را بر اساس قسمت قبلی انجام دادیم. آزمون جذب برای هر یک از محلول‌های استاندارد در سه تکرار انجام شد. بر اساس نتایج جذب خوانده شده منحنی جذب اسید گالیک با توجه به غلظت‌های ساخته شده رسم شد و سپس مقدار کل ترکیبات فنولیک برای هر یک از عصاره‌ها، بر اساس معادله خط منحنی جذب اسید گالیک محاسبه شد.

۲-۵. روش آماری

برای بررسی اثر مدت زمان فرآیند، دما و pH بر روی بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولیک آزمون بر اساس طرح RSM در ۳ عامل و ۳ سطح طراحی و بر اساس طرح Box-Behnken آزمون انجام شد (جدول ۱). نرم افزار مورد استفاده Design Expert و نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel رسم شد.

۳. نتایج و بحث

۳-۱. انتخاب بهترین مدل

پس از تجزیه داده‌ها جهت تعیین بهترین مدل پیشنهادی از میان پنج مدل موجود Linear, 2FI, Quadratic, cubic, Mean با توجه به جدول ۲، تجزیه واریانس، مدلی که مقدار مجموع

[9] Amplitude

مربعات [10] آن دارای اختلاف معنی‌دار بوده و مقدار Lack of fit آن معنی‌دار نشود به عنوان بهترین مدل انتخاب می‌شود. با توجه به این موضوع و پس از بررسی نتایج به دست آمده و مقایسه میان مدل‌های رگرسیونی نتایج حاکی از آن بود که مدل Quadratic برای تمامی آزمون‌های اندازه گیری شده در این مطالعه، دارای اختلاف معنی دار با سایر مدل‌ها بود (جدول۲) و این مدل تنها مدلی بود که Lack of fit برای آن معنی‌دار نشده بود (جدول ۳). در نتیجه مدل Quadratic برای بررسی روند تغییرات پارامترهای اندازه گیری شده در این مطالعه انتخاب شد. پس از انتخاب بهترین مدل در سطح آماری مورد نظر (۱ یا ۵ درصد)، جهت بررسی پارامترهای اثرگذار در مطالعه با توجه به جدول تجزیه واریانس، پارامتری که آزمون F برای آن معنی‌دار نباشد ($p>0.01$) از مدل حذف می‌شود و سایر پارامترها که دارای اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد بودند در مدل نگهداری شد.

لازم به ذکر است در صورتی که پارامتر خطی یک متغیر در یک مدل، اثر معنی داری نداشته باشد ولی اثر متقابل آن، با یکی از متغیرهای دیگر، که آن متغیر دارای اثر معنی‌داری در مدل بوده، دارای اثر معنی‌دار باشد آن پارامتر در مدل نگه داشته می‌شود و در سپس معادله کلی با استفاده از ضرایب داده شده برای هر پارامتری حاصل می‌گردد.در نهایت در میان پارامترهای مختلف، پارامتری که بیشترین مجموع مربعات را داشته باشد به عنوان اثرگذارترین پارامتر و بر عکس انتخاب می‌شود.

۳-۲. تعیین محتوای کل ترکیبات فنولیک

مقدار محتوای کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره پونه گاوی با استفاده از نمودار استاندارد ترسیم شده بر حسب اسید گالیک محاسبه گردید (نمودار ۱). با توجه به جدول ۳، نتایج کلیه پارامترها دارای اثر معنی داری در مدل بودند ($p<۰.۰۰۱$) بنابراین می توان با توجه به پارامتر های معنی دار شده معادلی کلی مدل Quadratic را به صورت زیر گزارش کرد:

معادله ۱.

$$Y=-33.283+0.588t-0.0542T+11.552ph-5.868t^2-5.322T2-0.97ph^2+4.853t*T-0.03t*ph+0.04166T*ph$$

T=temp and t=time

با توجه به معادله ۱ و جدول ۳ پارامتر زمان (t) دارای بیشترین تأثیر بر روی استخراج ترکیبات فنولی عصاره گیاه پونه گاوی بود.

در روش RSM مرحله‌ای به نام Verification وجود دارد، در این مرحله می‌بایست مقدار استخراج ترکیبات فنولی کل را در مرحله آزمایش با مقدار پیش‌گویی شده توسط مدل به طریق آماری مقایسه نمود در این بررسی پس از انجام این مرحله ، مقادیر مشاهده شده با مقادیر پیش‌بینی‌شده مقایسه گردید و محاسبات در نمودار ۲، قابل مشاهده است؛ نتایج، بیانگر همبستگی بسیار خوب بین نتایج به دست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش‌بینی‌شده با روش آماری است.

۳-۳. اثر عوامل مختلف بر روی استخراج ترکیبات فنولیک

با توجه به نمودار Surface (نمودار ۳) با افزایش دما و زمان مقدار استخراج ترکیبات فنولیک افزایش می‌یابد در دما و زمان‌های بالاتر از ۴۵ دقیقه روند استخراج کاهش یافته است.

در ارتباط با اثر متقابل زمان و pH در نمودار Surface (نمودار ۴) با افزایش زمان تا ۳۵ دقیقه مقدار استخراج افزایش یافته و پس از آن همزمان با افزایش pH تا زمان ۴۷ دقیقه روند کندی مشاهده شد و پس از آن استخراج کاهش می‌یابد. اما با افزایش pH ابتدا مقدار استخراج تا pH=7 روند افزایشی کندی داشته اما در زمان-های بالاتر روند کاهشی محسوسی در مقدار استخراج ترکیبات فنولیک با افزایش pH بیشتر از pH=7 مشاهده شد.

در نمودار Counter (نمودار ۵) ضمن تایید همین موضوع بیان می دارد که پس از pH=7 روند استخراج ترکیبات فنولیک کاهش محسوسی نشان داد. روند استخراج ترکیبات فنولیک در ارتباط با اثر متقابل دما و pH در نمودار Surface (نمودار ۵) نشان داده شده است همان طور که مشاهده می شود با افزایش دما تا حدود ۳۰ درجه سانتی‌گراد روند افزایشی در مقدار ترکیبات

[10] Sum of square

فنولیک مشاهده می‌شود و پس از آن در pH های کمتر از ۷ با افزایش دما مقدار استخراج تقریباً ثابت است اما در pH بالای ۷ با افزایش دما بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد کاهش در میزان ترکیبات فنولیک مشاهده شد. با افزایش pH تا حدود pH=7 مقدار بسیار کمی در میزان استخراج مشاهده شده است، اما بعد از pH=7 یک روند کاملاً نزولی در میزان استخراج مشاهده شد.

با توجه به نمودارهای رسم شده می توان بیان کرد که دما و زمان به طور معنی داری بر میزان استخراج ترکیبات فنولیک موثر است؛ به طوری که با افزایش دما و زمان، روند افزایشی در میزان استخراج ترکیبات فنولیک مشاهده شده است. افزایش دما سبب افزایش ضریب نفوذ حلال و افزایش زمان نیز مدت زمان انتقال جرم را افزایش می‌دهد با توجه به این‌که مقدار نسبت نمونه به حلال در این طرح (نسبت ۱:۳۵) ثابت در نظر گرفته شد، دلیل کاهش مقدار استخراج ترکیبات فنولی با توجه به نمودار Surface به دلیل اشباعیت حلال در دما و زمان های بالاتر و هم‌چنین به دلیل از هم پاشیدگی دمایی ترکیبات فنولی، در دماهای بالا می باشد.

هررا و لوک (Herrera and Luque, 2005) و همچنین پینلو و هم‌کاران (Pinelo *et al*., 2005) بیان داشتند که افزایش دما و زمان استخراج به طور معنی‌داری بر روی میزان استخراج ترکیبات فنولیک به ترتیب بر روی توت آسیاب شده و تفاله انگور موثر است. کاکاکه و هم‌کاران (Cacace and Maza, 2003) گزارش کردند که افزایش دما سبب افزایش استخراج آنتوسیانین از انگور سیاه شده است. این محققان دلیل این امر را اثر دما روی افزایش حلالیت و افزایش ضریب نفود می‌دانستند. این محققان در ادامه اعلام کردند در دماهای بالاتر از ۴۵ درجه سانتی‌گراد شیب تندی در کاهش میزان آنتوسیانین مشاهده شده است و این به دلیل حساسیت آنتوسیانین به دماهای بالا می‌باشد (Cacace and Maza, 2003). نتایج حاصل در مورد زمان استخراج با نتایج سوئلی و هم‌کاران مطابقت دارد. ایشان بر اساس نمودارهایی که در آن اثر متقابل زمان را با سایر عوامل (pH، دما و نسبت نمونه به حلال) بررسی کرد، مشخص نمود که با افزایش مدت زمان استخراج (۲۰ تا ۶۰ دقیقه) تفاوت معنی‌داری در استخراج ترکیبات فنولیک دیده نمی‌شود. همجنین آنها بیان کردند که وقتی که حلال با ترکیبات استخراج شده اشباع می‌شود شیب غلظت صفر شده و اثر حلال متوقف می‌شود. یاکین و هم‌کاران (Ya-Qin and Chen, 2009) بیان کردند که با افزایش دما و زمان استخراج (تا حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد) افزایش در میزان استخراج ترکیباب از پوست نوعی از مرکبات فنولیک مشاهده شد اما یک روند کاهشی در مقدار استخراج ترکیبات فنولیک در زمان‌ها و دماهای بالاتر (دمای بالای ۴۰ درجه سانتی‌گراد) مشاهده شد. این محققان دلیل این امر را تجزیه حرارتی یا واکنش‌های پلی مریزاسیون ترکیبات فنولیک با خودشان بیان نمودند (Ya-Qin and Chen, 2009). محققانی دیگر (Pinelo et al., 2005; Manthey and Grohmann, 1995; Yalmiz and Toledo, 2004) در کارهای تحقیقاتی خود که روند استخراج ترکیبات فنولیک را بررسی می‌کردند بیان داشتند که در دماهای بالا، کاهش در میزان استخراج ترکیبات فنولیک مشاهده شده است. همه این محققان دلیل این امر را واکنش های پلی‌مریزاسیون ترکیبات فنولیک با خودشان بیان نمودند.

با توجه به این‌که pH حلال مورد نظر، (متانول ۸۰ درصد) برابر با ۵.۳ در شرایط آزمایشگاه (۲۱ درجه سانتی‌گراد) می‌باشد و با اضافه کردن یک گرم از پودر نمونه گیاهی، بعد از هم‌زدن مخلوط حاصل، در حدود ۶ ثابت می شود، بنابراین pH طبیعی نمونه گیاهی ۶ می‌باشد و روند کاهشی مقدار استخراج ترکیبات فنولی بعد از pH=7 در نمودارهای Surface مربوط به اثر متقابل زمان-pH و دما-pH در ارتباط با دور شدن pH از pH طبیعی گیاه می‌باشد. سالارباشی (۱۳۸۸) ضمن تأیید همین موضوع بیان کردند که هر چه روند تغییر pH به حالت طبیعی گیاه بومادران (pH=۶.۳) نزدیک می‌شود مقدار استخراج ترکیبات فنولیک افزایش می‌یابد.

با توجه به نتایج جدول ۳، زمان و pH به ترتیب به عنوان موثرترین و کم اثر گذارترین عامل شناسایی شدند. پس از بررسی داده ها برای استحصال حداکثر ترکیبات فنولی از عصاره پونه گاوی در شرایط مطالعه مشاهده شد که مناسبترین شرایط برای استخراج ترکیبات فنولیک دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد، pH=6.61 و زمان ۴۷ دقیقه بدون در نظر گرفتن سایر پارامترهای اندازه‌گیری شده برای عصاره‌های استحصالی می‌باشد (جدول ۴). تحت این شرایط

میزان استخراج ترکیبات فنولیک از عصاره به بیش از ۱۵ میلی گرم گالیک اسید (استاندارد ترکیبات فنولیک) به ازای ۱ گرم از پودر اولیه پیش‌بینی شد.

رودریگوس و همکاران (Rodriges *et al*., 2007) با استفاده از آزمون سطح پاسخ، شرایط بهینه را (pH=6.5، مدت زمان ۱۵ دقیقه، نسبت نمونه به حلال ۱:۵۰ و دمای استخراج ۳۰ درجه سانتی‌گراد) تعیین کرد و در شرایط بهینه، بازده استخراج را ۲۲.۴ میلی‌گرم ترکیبات فنولیک به ازای ۱ گرم عصاره خشک گزارش نمود.

۳-۴. اثر روش استخراج بر مقدار کل ترکیبات فنولیک

اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنولیک عصاره های استخراجی با روش‌های غرقابی و اولتراسوند حاکی از آن بود که روش استخراج تأثیر به سزایی بر میزان کل ترکیبات فنولیک بر حسب اسید گالیک دارد. همان‌طور که در نمودار ۶ مشاهده می‌شود روش اولتراسوند، ترکیبات فنولیک بیشتری را نسبت به روش غرقابی استخراج کرده است (مقدار ترکیبات فنولیک بر حسب اسید گالیک در روش اولتراسوند ۱۵/۲ میلی گرم و در روش غرقابی ۱۰/۵ میلی گرم اسید گالیک به ازای ۱ گرم از پودر اولیه به دست آمد). می‌توان گفت تنش برشی حاصل از امواج مافوق صوت باعث شکسته شدن مولکول‌های پلیمری بزرگ و در نتیجه باعث استخراج بهتر ترکیبات فنولیک نسبت به روش غرقابی می‌شود. این نتایج با گزارش آلبو و همکاران (Albu *et al*., 2004) مطابقت دارد، این محققان گزارش کردند که استفاده از روش اولتراسوند باعث افزایش کارنوسیک اسید استخراج شده از رزماری می‌شود.

یاکین و همکاران (Ya-Qin and Chen, 2009) ضمن بررسی روند استخراج ترکیبات فنولیک از نوعی از مرکبات بیان داشتند که استفاده از اولتراسوند باعث افزایش معنی‌داری در استخراج ترکیبات فنولیک نسبت به روش غرقابی شده است. همچنین دزاشیبی (■■■■) گزارش کردند که روش اولتراسوند ترکیبات فنولیک بیشتری را بر حسب اسید تانیک نسبت به روش اولتراسوند استخراج کرده است.

۴. نتیجه گیری

نتایج آزمون ها نشان داد که با افزایش دما و زمان مقدار استخراج ترکیبات فنولیک افزایش یافته اما در ارتباط با pH فقط تا pH خنثی افزایش در مقدار استخراج مشاهده شد. هم‌چنین روش استخراج با اولتراسوند نسبت به روش غرقابی دارای بازده بیشتری از نظر استخراج ترکیبات فنولیک می باشد. هم‌چنین در طرح نمودار سطح پاسخ عامل زمان به عنوان تأثیرگذارترین عامل در استخراج ترکیبات فنولیک انتخاب شد.

۵. منابع

دزاشیبی، ز. ۱۳۸۵. ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ حنا. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار.

سالارباشی، داود. ۱۳۸۸. بررسی خصوصیات آنتی اکسیدانی گیاه بومادران. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار.

هاربون، ج. ب. (ترجمه دکتر ی، آیینه چی) ۱۳۸۵. روش‌های تجزیه شیمیایی گیاهان. تهران: انتشارات دانشگاه تهران.

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

Cacace, J.E. and Maza, G. 2003. Optimization of extraction of antocyanins from black currant with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*., 68: 240-248.

Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M. and 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: 1126-1134.

Herrera, M. and Luque, M.D. 2005. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds

from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*. 1100: 1-7.

Mahdavi, D.I., Deshpande, S.S. and Salunkhe, D.K. 1995. Food antioxidant. Marcel Dekker, inc., New York.

Manthey, J.A. and Grohmann, K. 2001. Phenols in citrus peel byproducts concentrations of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in citrus peel molasses. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.*, 49: 3268-3273.

Pinelo, M., Rubilar, M. and Jerez. M. 2005. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*., 53: 2111-2117.

Rodriges, S., Gustavo, A. S. Pinto. 2007. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compound from coconut shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*., 15: 95-100.

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

Yalmiz, Y. and Toledo, R.T. 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 255-260.

Ya-Qin, Ma. Jian-Chu, Chen. 2009. Simultaneous extraction of phenolic compound of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Journal of Ultrasonics Sonochemistry*., 16: 57-62.