

استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا (HPTLC) در بررسی بهبود فرآیند عصاره‌گیری از گیاه/استویا ربادیانا با استفاده از امواج فراصوت

مرتضی روحانی^{a*}، زهره میرجعفری^a، هاجر رضایپور^b، جواد مختاری^a

^a استادیار گروه شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^b دانشجوی کارشناسی ارشد فیتوشیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۰۷

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۱/۲۲

چکیده

مقدمه: در دهه‌های اخیر با توجه به ابتلای شمار زیادی از افراد به بیماری دیابت، گرایش به استفاده از جایگزین‌های طبیعی برای شیرین‌کننده‌ها افزایش یافته است. یکی از مهمترین جایگزین‌های طبیعی، عصاره گیاه/استویا ربادیانا می‌باشد. در این تحقیق از امواج فراصوت جهت بهینه‌سازی فرآیند عصاره‌گیری از گیاه/استویا ربادیانا استفاده شد. همچنین روش کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا (HPTLC) به عنوان روشی سریع و دقیق جهت آنالیز کمی عصاره‌گیری مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در ابتدا مناسب‌ترین حلال برای استخراج عصاره آبی گیاه/استویا ربادیانا از بین حلال‌های آب، مخلوط آب-متانول، متانول، مخلوط آب-اتانول و اتانول انتخاب شده و سپس فرآیند عصاره‌گیری به روش سوکسله (با مدت زمان‌های مختلف) و با استفاده از امواج فراصوت (با توان‌ها و مدت زمان‌های مختلف) انجام شد و میزان عصاره استخراج شده با این دو روش با یکدیگر مقایسه و نتایج مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که آب نسبت به دیگر حلال‌ها نتایج بهتری برای استخراج نشان می‌دهد. سپس فرآیند استخراج به کمک سوکسله و همچنین امواج فراصوت انجام شد. بررسی شرایط زمانی مختلف در سوکسله و شرایط مختلف توانی و زمانی در فراصوت، برتری چشم‌گیر روش فراصوت را در استخراج استویوزید به مقدار $811/61 \mu\text{g/ml}$ در مدت زمان ۲ دقیقه و توان ۹۰ وات نسبت به روش سوکسله به مقدار $795/70 \mu\text{g/ml}$ در مدت ۲ ساعت نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از تابش فراصوت در استخراج شیرین‌کننده از گیاه/استویا ربادیانا می‌تواند به عنوان یک گزینه مناسب برای بهره‌برداری آزمایشگاهی و صنعتی مد نظر قرار گیرد. مدت زمان استخراج بسیار کوتاه، استفاده از آب به عنوان حلالی بی‌خطر، مصرف انرژی اندک و عدم نیاز به روش‌های آماده‌سازی پیچیده و وقت‌گیر و همچنین بهره‌گیری از روش HPTLC به عنوان روشی سریع، ساده و کارآمد برای شناسایی کیفی و کمی از مزایای روش مورد استفاده در این کار تحقیقاتی است.

واژه‌های کلیدی: استویا ربادیانا، امواج فراصوت، عصاره، استویوزید، کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا

email: rouhani.morteza@gmail.com

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

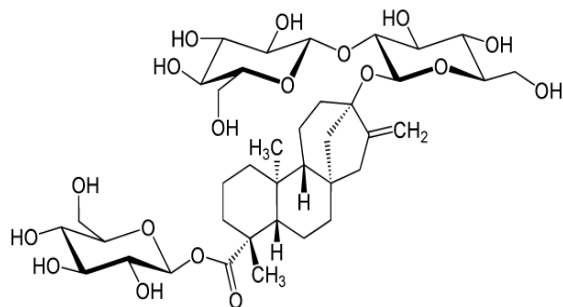
مزه شیرین استویا به دلیل حضور ترکیبات مختلف گلیکوزیدی در آن مانند استویوزید، دالکوزید، استویوبیوزید و ربادیوزیدهای A تا E می‌باشد. استویوبیوزید اصلی‌ترین گلیکوزید و شیرین‌کننده موجود در برگ‌های گیاه استویا ربادیانا است (شکل ۲). از این رو، تعیین مقدار استویوبیوزید استخراج شده بهترین گزینه برای مطالعه روش‌های عصاره‌گیری از این گیاه است. مصرف استویا به عنوان شیرین‌کننده برای بیماران دیابتی پیشنهاد می‌گردد؛ چرا که نتایج تحقیقات نشان داده است که مصرف آن هیچ‌گونه کالری یا کربوهیدراتی به بدن اضافه نمی‌کند (Salazar et al., 2018). علاوه بر این، مصرف استویا تاثیری بر میزان قند خون نگذاشته و همینطور واکنشی به انسولین نشان نمی‌دهد. همینطور تحقیقات نشان می‌دهد که برخی از گلیکوزیدهای موجود در استویا تاثیر چشم‌گیری در دفع سدیم از طریق ادرار دارند. از دیگر تاثیرات شناخته شده از مصرف استویا می‌توان به تاثیر آن در کاهش فشار خون اشاره کرد. موسسه ملی سرطان نیز وجود هرگونه شواهد مبنی بر تاثیر مصرف شیرین‌کننده استویا در ابتلا به سرطان را رد کرده است (Formigoni et al., 2018).

استویا نوعی شیرین‌کننده طبیعی است که از برگ‌های گونه‌ای گیاه با نام استویا ربادیانا^۱ استخراج می‌شود (شکل ۱). ترکیبات فعال در استویا، استویول گلوکوزیدها (مخصوصا استویوبیوزید و ربادیوزید) هستند که تا ۱۵۰ برابر از ساکاروز شیرین‌تر بوده (Cardello et al., 1999) و در برابر تغییرات دما و pH مقاومت بالایی دارند (Abdulateef and Osman, 2012). استویا در مقایسه با ساکاروز، در آغاز شیرینی کمتر ولی ماندگاری بالاتری دارد و در برخی عصاره‌ها ممکن است که دارای یک ته مزه تلخ در غلظت‌های بالا باشد.



شکل ۱- گیاه استویا ربادیانا (Misra et al., 2011)

۹۰



شکل ۲- ساختار شیمیایی مولکول استویوبیوزید (Salazar et al., 2018)

روش‌های متداول عصاره‌گیری مبتنی بر استفاده از یک حلال یا ترکیبی از حلال‌ها می‌باشد. برای تسریع فرآیند استخراج از همزدن و همینطور اعمال حرارت نیز استفاده می‌گردد. استفاده از سوکسله به عنوان روشی استاندارد جهت ارزیابی و مقایسه با روش‌های دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد. از روش سوکسله عموماً برای استخراج ترکیباتی با

مقررات غذایی و دارویی در مورد استویا در کشورهای مختلف، متغیر است. در ایالات متحده آمریکا، عصاره‌های گلیکوزیدی استویا با خلوص بالا عموماً بی‌خطر در نظر گرفته می‌شوند و استفاده از آن‌ها به عنوان یکی از اجزای فرآورده‌های غذایی مانعی ندارد، اما برگ استویا و عصاره‌های خالص‌سازی نشده، تاییدیه سازمان غذا و داروی آمریکا را ندارند (US FDA 2017). اتحادیه اروپا در سال ۲۰۱۱ استویا را به عنوان یک افزودنی غذایی، تایید کرد (Stones, 2011).

گیاه استویا ربادیانا برای بیش از ۱۵۰۰ سال توسط گوآرانی‌ها در آمریکای جنوبی مورد استفاده قرار می‌گرفت. برگ‌های این گیاه صدها سال در برزیل و پاراگوئه برای شیرین کردن چای و دمنوش‌های محلی استفاده می‌شد (Misra et al., 2011).

^۱ Stevia Rebaudiana

سیلیکاژل ۶۰ HF₂₅₄ با اندازه ۲۰×۱۰ cm و ضخامت ۰/۲ cm محصول شرکت مرک برای این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت (Salazar et al., 2018) روش سطح پاسخ (RSM) مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری است که در بهینه سازی فرآیندهایی به کار می‌رود که پاسخ مورد نظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تأثیر قرار می‌گیرد. شمای گرافیکی مدل ریاضی سبب تعریف واژه روش سطح پاسخ شده است. با کمک این طرح آماری، تعداد آزمایش‌ها کاهش می‌یابد (Myers et al., 2002). مهم‌ترین مسئله این پژوهش، بررسی آثار اصلی و متقابل بهینه‌سازی و مقایسه شرایط مختلف استخراج (خیساندن، سوکسله، ماکروویو و فراصوت) بر فاکتورها بود؛ از این رو طرح آماری سطح پاسخ انتخاب شد.

روش‌ها

- تهیه محلول استاندارد استویوزید

محلول اصلی استاندارد استویوزید توسط حل کردن دقیق ۵ mg از ماده اصلی در متانول و رساندن آن به حجم ۱۰ ml تهیه شد. محلول مورد استفاده (۲۰۰ μg/ml) توسط رقیق‌سازی مناسب محلول اصلی به دست آمد (Martins et al., 2017).

- منحنی استاندارد برای استاندارد استویوزید

محلول استاندارد استویوزید (۱۰۶ μg/band تا ۲/۱۲ mg/band) به صورت سه‌گانه روی صفحه HPTLC مورد استفاده قرار گرفت (Martins et al., 2017). صفحه HPTLC مطابق شرایط استاندارد استفاده و سپس اسکن شد و در نهایت پیک‌های بدست آمده ثبت گردید. منحنی کالیبراسیون استویوزید با استفاده از رسم مساحت پیک در مقابل غلظت استویوزید استفاده شده ترسیم گردید (Salazar et al., 2018).

- تعیین حلال مناسب برای فرآیند استخراج

جهت تعیین حلال مناسب برای استخراج استویوزید و فرآیند عصاره‌گیری، مقدار ۱۰ گرم از برگ خشک و ساییده شده استویا با ترازوی آزمایشگاهی AND (دقت ۰/۰۰۱ گرم) وزن شده و به ترتیب در ۲۰۰ ml از حلال‌های آب، متانول- آب (۲۰:۸۰)، متانول، اتانول- آب (۲۰:۸۰) و اتانول

فراریت اندک با پایداری قابل قبول در برابر اعمال حرارت استفاده می‌شود (Basturk et al., 2018). استفاده از امواج فراصوت در استخراج عصاره‌های گیاهی جزو روش‌های نوین عصاره‌گیری است که طی آن امواج فراصوت با فرکانسی معادل ۲۰ کیلوهرتز به درون سیال وارد شده و منجر به اعمال انقباض‌ها و انبساط‌های متوالی درون سیال می‌شوند که در اثر این پدیده حرارتی درون سیال ایجاد می‌شود. ایجاد این حفرات متعاقباً منجر به وقوع انفجارهایی در محیط می‌گردد. (Paz et al., 2015). این انفجارها دماها و فشارهای بسیار بالایی را به صورت محلی داخل سیال به وجود می‌آورند که منجر به تخریب غشای سلولی گیاهی می‌شود. در اکثر مواقع با کنترل شرایط می‌توان به عصاره‌گیری با بازدهی بالاتر در مدت زمانی کمتر نسبت به روش سوکسله دست یافت (Patil et al., 2017).

کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا (HPTLC) نوع ارتقا یافته کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) می‌باشد. چندین فاکتور در روش پایه‌ای کروماتوگرافی لایه نازک برای خودکار کردن مراحل مختلف جهت افزایش وضوح و در نتیجه دستیابی به سنجش دقیق‌تر، اصلاح شده است (Morlock et al., 2009).

با وجود گزارش‌های متعدد درباره استخراج عصاره از گیاه استویا ربادیانا، تاکنون گزارشی در مورد کاربرد HPTLC در بررسی کمی تأثیر امواج فراصوت در فرآیند عصاره‌گیری از استویا ربادیانا منتشر نشده است. بنابراین، هدف پژوهش حاضر بررسی کمی بهبود فرآیند عصاره‌گیری از گیاه استویا ربادیانا به کمک امواج فراصوت و با استفاده از آنالیز بسیار آسان و سریع HPTLC می‌باشد.

مواد و روش‌ها

گیاه استویا ربادیانا از مزرعه گیاهان دارویی واقع در رشت تهیه و توسط کارشناس گیاه‌شناسی و گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات مورد شناسایی و تایید قرار گرفت. سپس نمونه گیاهی در تاریکی و در دمای اتاق خشک شد (رطوبت اولیه ۶۲٪ و رطوبت نهایی ۵٪). در ادامه گیاه خشک شده ساییده و با استفاده از الک آزمایشگاهی با اندازه‌های ۱ mm یکدست شد. استاندارد استویوزید با استفاده از حلال با گرید آنالیزی از شرکت سیگما-آلدریج تهیه شد. صفحات آلومینیومی HPTLC

میکرون به عنوان فاز ساکن، مخلوط حلالی اتیل استات + متانول + استیک اسید (۳:۱:۱) به عنوان فاز متحرک، مدت زمان اشباع شدگی ۱۵ دقیقه، طول موج مورد استفاده ۵۰۰ نانومتر و نوع لامپ D2&W انجام شد. $5\ \mu\text{m}$ از محلول استاندارد استویوزید با استفاده از سمپلر اتوماتیک جفت شده با سرنگ هامیلتون $25\ \mu\text{m}$ (CaMAG, Muttenz, Switzerland) نقطه‌گذاری شده و در شرایط طول باند $7\ \text{mm}$ ؛ فاصله بین باندها $8/4\ \text{mm}$ ؛ فاصله از لبه صفحه $10\ \text{mm}$ ؛ و فاصله از انتهای صفحه $10\ \text{mm}$ مورد استفاده قرار گرفت. صفحات با استفاده از حلال ترکیبی اتیل استات: متانول: استیک اسید (۳:۱:۱) به عنوان فاز متحرک در CAMAG در فضای اشباع شده مورد استفاده قرار گرفتند. صفحات استفاده شده در مجاورت هوا خشک شده و سپس به کمک اسکنر CAMAG TLC مجهز به برنامه کروماتوگرافی قطبی winCATS (نسخه 1.01.5) که برای آنالیزهای چگالی‌متری، ثبت طیف‌ها و پردازش داده‌ها استفاده می‌شود، اسکن شد. حالت جذب/بازنشر با سرعت اسکن $20\ \text{mm/s}$ در طول موج $500\ \text{nm}$ برای ثبت طیف جذبی مورد استفاده قرار گرفت.

- آنالیز HPTLC عصاره‌های گیاهی

نمونه‌های به دست آمده از استخراج عصاره آبی استویا ریادینا با استفاده از کاغذ واتمن $0/45\ \mu\text{m}$ فیلتر شده و آنالیز HPTLC تحت شرایط بهینه برای ترکیب مورد نظر انجام شد. صفحات پس از استفاده در معرض هوا خشک شده و در طول موج‌های $254\ \text{nm}$ و $366\ \text{nm}$ مورد عکس‌برداری قرار گرفتند. صفحات با استفاده از اسپری کردن عامل NP-PEG و سپس تابش نور در حالت‌های مرئی و فلورسنس مورد بررسی قرار گرفتند. مقادیر استویوزید موجود در عصاره‌های گیاهی با استفاده از منحنی کالیبراسیون آن تعیین شد (Attimarad et al., 2011).

- اعتبارسنجی روش

روش مورد استفاده مطابق دستورالعمل‌های کنفرانس بین‌المللی هارمونیزاسیون اعتبارسنجی شد. خطی بودن با استفاده از محلول‌هایی با غلظت‌های گوناگون از محلول اصلی در گستره‌های $106\ \mu\text{g}/\text{band}$ تا $2/12\ \text{mg}/\text{band}$ برای استویوزید مورد مطالعه واقع شد. منحنی‌های

به مدت ۲۴ ساعت بدون حرکت قرار گرفتند (Martins et al., 2016). سپس، عصاره‌های استخراج شده به کمک کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شدند. محلول‌های زیر صافی با استفاده از روتاری BUCHI در دمای $45\ ^\circ\text{C}$ و فشار نزدیک به خلا خشک شده و برای آنالیز HPTLC آماده شدند (Martini et al., 2006).

- استخراج عصاره با روش سوکسله

مقدار ۱۰ گرم برگ خشک و پودری استویا در ۲۰۰ ml آب دیونیزه کاملاً پخش شده و در سوکسله تحت حرارت‌دهی قرار گرفت (Kolb et al., 2001) عمل استخراج با سوکسله در دمای $100\ ^\circ\text{C}$ در مدت زمان‌های ۲ h، ۴ h و ۶ h انجام شده و محلول حاصله پس از فیلتر شدن با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ در روتاری حلال‌پرانی شده و برای تعیین مقدار استویوزید حاصله برای آنالیز HPTLC ارسال و مقدار استویوزید به دست آمده از هر کدام مورد ارزیابی قرار گرفت (Attimarad et al., 2011).

- استخراج عصاره به کمک تابش امواج فراصوت

برای تعیین تاثیر امواج فراصوت در میزان استویوزید استخراج شده، ابتدا مقدار ۱۰ گرم از پودر خشک برگ‌های استویا به دقت $\pm 0/1$ گرم اندازه‌گیری شده و سپس به همراه ۲۰۰ ml آب دیونیزه در دستگاه تابش فراصوت SONOPULS BANDELIN قرار گرفت. توان‌های ۵۰، ۷۰ و ۹۰ وات در مدت زمان‌های ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه برای بدست آوردن شرایط بهینه استخراج مورد بررسی قرار گرفت. نمونه حاصل از هر یک از شرایط به کمک روتاری حلال‌پرانی شده و سپس برای آنالیز HPTLC ارسال شد (Attimarad et al., 2011).

- شرایط کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا (HPTLC)

آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا (HPTLC) در شرایط اتمسفریک و دمای اتاق در $24/2\ ^\circ\text{C}$ و رطوبت $41/3\ \%$ با استفاده از صفحات آلومینیومی HPTLC پوشش داده شده با سیلیکاژل $60\ \text{HF}_{254}$ با اندازه $10 \times 20\ \text{cm}$ و ضخامت $0/2\ \text{cm}$ و اندازه ذرات ۵-۶

پیک‌های متقارن و واضحی برای استاندارد استویوزید با $R_f = 0/25$ و ربادیوزید با $R_f = 0/33$ در عصاره به دست آمد (شکل ۳). استاندارد استویوزید و ربادیوزید با استفاده از عامل NP-PEG زیر نور مرئی نوارهای شاخصی را در کروماتوگرام HPTLC نشان داد (شکل ۳). منحنی کالیبراسیون استویوزید با استفاده از نقطه‌گذاری غلظت استویوزید در برابر مساحت پیک آن به دست آمد (شکل ۴). استاندارد استویوزید به هنگام رسم مساحت سطح زیر پیک بر حسب غلظت یک ضریب ارتباط مناسب $0/9912$ را نشان می‌دهد و بنابراین خطی بودن مناسبی را بین مساحت سطح زیر پیک و غلظت ایجاد می‌کند. جدول ۱ اطلاعات طول موج، گستره خطی بودن، معادله رگرسیون، ضریب ارتباط، حد تشخیص و حد مقدارسنجی را برای استاندارد استویوزید نشان می‌دهد:

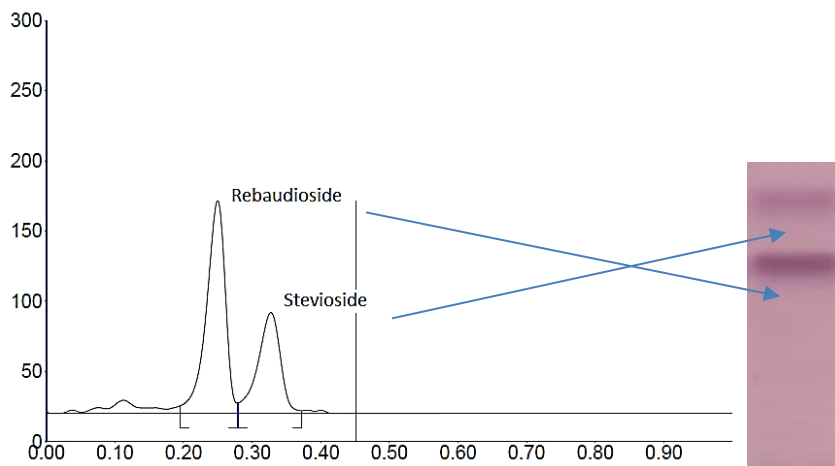
کالیبراسیون با استفاده از نقطه‌گذاری مساحت زیر پیک در برابر غلظت‌های گوناگون رسم شدند. مساحت‌های زیر پیک توسط توسط آنالیز رگرسیون خطی حداقل مربعات تصحیح شدند. حد تشخیص (LOD) و حد مقدار سنجی (LOQ) با استفاده از معادلات ۱ و ۲ تعیین شدند:

$$\text{از مبداء } LOD = \text{انحراف استاندارد عرض شیب منحنی کالیبراسیون} / 3/3 \times \text{انحراف استاندارد عرض شیب منحنی کالیبراسیون} / 10 \times \text{انحراف استاندارد عرض از مبداء } LOQ = \text{معادله ۱}$$

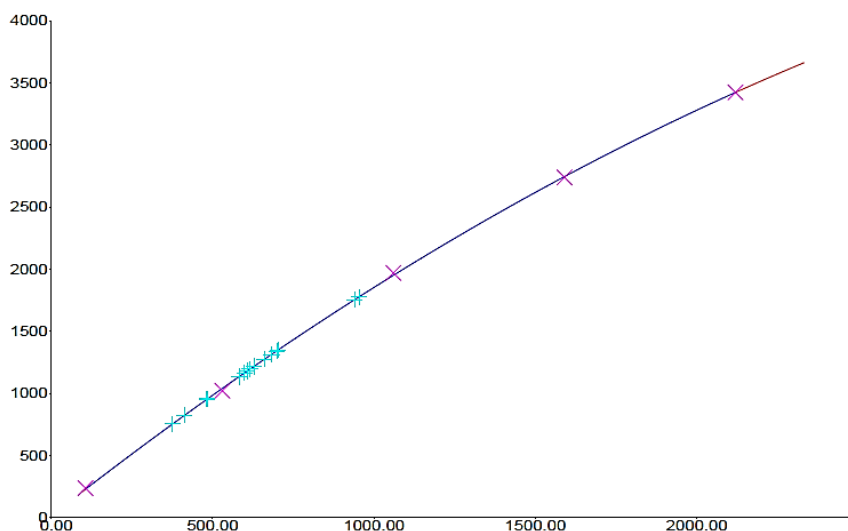
$$\text{از مبداء } LOQ = \text{معادله ۲}$$

یافته‌ها

با استفاده از صفحات HPTLC با ضخامت $0/2 \text{ mm}$ و تحت شرایط بهینه شده اندازه ذرات $5-6 \mu\text{m}$ و نسبت حلالی اتیل استات: متانول: استیک اسید (۳: ۳: ۱)



شکل ۳- کروماتوگرام HPTLC استویوزید استاندارد (۱۰۰۰ ng) و ربادیوزید استاندارد (۱۰۰۰ ng) در طول موج 254 nm و نوارهای مشاهده شده مربوط به آن‌ها در HPTLC



شکل ۴- منحنی کالیبراسیون استویوزید ترسیم شده با مساحت پیک در مقابل غلظت

جدول ۱- مشخصات دستگاه HPTLC برای آنالیز میزان استویوزید استخراج شده

پارامترها	استویوزید
۲۵۴	طول موج (نانومتر)
۱۰۰-۱۵۰۰	μg/band محدوده خطی بودن
$277/82x + 1/484y =$	معادله رگرسیون
۰/۹۹۱۲	ضریب همبستگی
۲۳۳/۲۶	μg/band حد تشخیص
۷۰۶/۸۷	μg/band حد مقدار سنجی
ویژه	ویژه بودن

در بررسی تاثیر استفاده از امواج فراصوت در استخراج استویوزید، توان‌های ۵۰، ۷۰ و ۹۰ وات در مدت زمان‌های ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۴). نتایج آنالیز HPTLC نشان می‌دهند که در توان ۹۰ وات و در مدت زمان ۲ دقیقه بیشترین غلظت استویوزید حاصل می‌گردد.

از بررسی داده‌های جدول ۴ می‌توان نتیجه گرفت که افزایش توان، تاثیر مطلوبی بر استخراج استویوزید گذاشته است. چنانچه بیشترین مقدار بازده در توان ۹۰ وات به دست آمده است. از سوی دیگر داده‌های جدول حاکی از آن است که فرآیند استخراج به شدت به زمان تابش فراصوت حساس است؛ طوریکه اعمال مدت زمان‌های بیشتر در توان ۹۰ وات منجر به کاهش تقریبی بازده استخراج استویوزید می‌شود.

بحث

امواج فراصوت نوعی امواج مکانیکی هستند که در اثر پراکندگی در محیط الاستیک فرکانس‌های موجی متفاوتی تولید می‌کنند. این امواج فرکانس‌هایی بالاتر از حد شنوایی انسان و پایین تر از فرکانس‌های میکروویو دارند. مکانیسم اصلی عملکرد استخراج با امواج فراصوت مبتنی بر پدیده حفره‌زایی مربوط می‌باشد. امواج صوتی به هنگام عبور از میان یک محیط الاستیک، باعث جابجایی طولی ذرات می‌شود و با عمل کردن مانند یک پیستون در سطح محیط، یک توالی انقباض و انبساط را به وجود می‌آورد (McClements, 1995). این امواج مراحل فرایند استخراج ترکیبات گیاهی، یعنی تورم بافت و نیز خروج ترکیبات از بافت به حلال را از راه ایجاد تخلخل و منافذ در دیواره سلولی بهبود می‌بخشد و باعث سرعت بخشیدن به پدیده انتقال جرم می‌شود (Vinatoru, 2012). حباب‌های ناشی

- بهینه‌سازی حلال برای فرآیند عصاره‌گیری

با استفاده از روش خیساندن، حلال‌های مختلف برای استخراج عصاره از گیاه استویا مورد آزمایش قرار گرفت (جدول ۲). طبق داده‌های موجود در جدول ۲، به ترتیب آب، مخلوط آب-متانول (۲۰:۸۰)، متانول، مخلوط آب-اتانول (۲۰:۸۰) و اتانول برای عصاره‌گیری مناسب شناخته شدند. با توجه کارایی چشمگیر آب به عنوان حلال و نظر به برتری آن به عنوان یک حلال بی‌خطر برای انسان و محیط زیست، از آن به عنوان حلال مناسب برای مراحل بعدی استفاده شد.

- استخراج عصاره با روش سوکسله

با استفاده از سوکسله فرآیند استخراج در دمای $100^{\circ}C$ در مدت زمان‌های ۲، ۴ و ۶ ساعت انجام گرفت (Kolb *et al.* 2001). آنالیز HPTLC نشان داد که غلظت استویوزید استخراج شده در مدت زمان ۲ ساعت بالاتر بوده و صرف زمان بیشتر منجر به کاهش غلظت استویوزید در اثر تخریب احتمالی می‌گردد. این پدیده می‌تواند به ناپایداری ساختار شیمیایی این مولکول در برابر حرارت اطلاق شود؛ به طوریکه از مقایسه جدول‌های ۲ و ۳ می‌توان دید که روش خیساندن بازده اندکی بالاتر نسبت به روش سوکسله از خود نشان داده است. هر چند مزیت روش سوکسله در کاهش مدت زمان استخراج از ۲۴ ساعت به ۲ ساعت نیابستی نادیده گرفته شود. نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه برای مقایسه سطح زیر پیک نشان می‌دهد که در مجموع بین زمان‌های استخراج استویوزید در روش سوکسله اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد ($P \text{ value} < 0/001$).

- استخراج عصاره به کمک تابش فراصوت

جدول ۲- نتایج حاصل از استخراج استویوزید در حضور حلال‌های مختلف

نمونه	حلال	سطح زیر پیک	غلظت (µg/ml)
۱	آب	۱۴۷۲/۶۸	۸۰۵/۱۶
۲	آب- متانول (۲۰:۸۰)	۱۱۵۸/۹۶	۵۹۳/۷۶
۳	متانول	۱۰۶۲/۶۴	۵۲۸/۸۵
۴	آب- اتانول (۲۰:۸۰)	۱۰۰۱/۳۷	۴۸۷/۵۶
۵	اتانول	۸۶۸/۷۴	۳۹۸/۱۹

جدول ۳- بررسی اثر مدت زمان‌های مختلف در استخراج استویوزید در روش سوکسله

نمونه	زمان (ساعت)	سطح زیر پیک	غلظت (µg/ml)
۱	۲	۱۳۸۷/۹۹	۷۹۵/۷۰
۲	۴	۱۳۸۱/۶۵	۷۹۱/۱۳
۳	۶	۱۲۷۲/۳۵	۷۱۲/۱۸

جدول ۴- بررسی تاثیر توان امواج فراصوت و زمان در استخراج استویوزید از برگ‌های گیاه/استویا ریادیانا

نمونه	توان (وات)	زمان (دقیقه)	سطح زیر پیک	غلظت (µg/ml)
۱	۵۰	۱	۱۱۳۴/۲۰	۵۷۷/۰۷
۲	۵۰	۲	۹۵۵/۵۹	۴۵۶/۷۱
۳	۵۰	۵	۱۱۹۵/۲۸	۶۱۸/۲۳
۴	۵۰	۱۰	۱۳۴۲/۸۸	۷۱۷/۶۹
۵	۵۰	۱۵	۱۳۱۳/۶۸	۶۹۸/۰۱
۶	۵۰	۲۰	۱۲۷۴/۳۶	۶۷۱/۵۲
۷	۵۰	۳۰	۷۵۳/۶۰	۳۲۰/۶۰
۸	۷۰	۱	۹۵۵/۶۷	۴۵۶/۷۷
۹	۷۰	۲	۸۷۱/۷۰	۴۰۰/۱۹
۱۰	۷۰	۵	۶۳۷/۳۶	۲۴۲/۲۷
۱۱	۷۰	۱۰	۵۵۳/۲۲	۱۸۵/۵۷
۱۲	۷۰	۱۵	۶۷۶/۷۹	۲۶۸/۸۴
۱۳	۷۰	۲۰	۷۸۷/۷۵	۳۴۳/۶۱
۱۴	۹۰	۱	۱۳۱۸/۱۲	۷۰۱/۰۱
۱۵	۹۰	۲	۱۴۸۲/۲۶	۸۱۱/۶۱
۱۶	۹۰	۵	۱۳۸۹/۳۰	۷۴۸/۹۷
۱۷	۹۰	۱۰	۱۱۸۳/۳۹	۶۱۰/۱۵
۱۸	۹۰	۱۵	۱۲۱۰/۵۱	۶۲۸/۴۹
۱۹	۹۰	۲۰	۱۱۰۲/۶۵	۵۵۵/۸۱

کارگیری امواج فراصوت با توان‌های پایین‌تر بازده‌های کمی را به دنبال داشت. نتایج بررسی نشان می‌دهد که افزایش زمان استخراج تا ۲ دقیقه مفید بوده اما بکارگیری زمان‌های بیشتر از آن منجر به بروز روند کاهشی در فرآیند استخراج می‌شود. به این دلیل از دیدگاه زمانی، استفاده از زمان‌های بیش از ۲ دقیقه توصیه نمی‌گردد. اعمال زمان‌های بیشتر احتمالاً منجر به تخریب ساختار استویوزید و تبدیل آن به فراکسیون‌های تشکیل دهنده می‌گردد. بررسی هر سه روش خیساندن، سوکسله و فراصوت، برتری چشم‌گیر روش استفاده از امواج فراصوت را نشان می‌دهد که از یک سو مدت زمان استخراج را به ۲ دقیقه کاهش داده و از طرفی دیگر بازده بالاتری نسبت به دو روش یاد شده ایجاد کرده است.

نتیجه‌گیری

تابش امواج فراصوت به عنوان ابزاری مفید و موثر در استخراج عصاره از گیاه *استویا ریبادیانا* می‌باشد که می‌تواند به عنوان جایگزینی برای روش‌های طولانی خیساندن و سوکسله مورد استفاده قرار گیرد. با استفاده از این روش، مدت زمان استخراج استویوزید از گیاه *استویا ریبادیانا* به ۲ دقیقه کاهش پیدا کرد و بازده مطلوبی از آن حاصل شد. از طرفی دیگر با استفاده از HPTLC به عنوان یک ابزار شناسایی کیفی و کمی، مدت زمان شناسایی و اندازه‌گیری کمی استویوزید بسیار کوتاه شد که در مقایسه با ابزارهای مشابه مانند HPLC توانایی و برتری این روش را نشان می‌دهد. نظر به افزایش توجهات عموم جامعه به استفاده از شیرین‌کننده استویا و جایگزینی آن با قند و شکر، این روش می‌تواند ابزاری سودمند برای تولید این شیرین‌کننده در مقیاس صنعتی باشد.

منابع

Abdullateef, R. A. & Osman, M. (2012). Studies on effects of pruning on vegetative traits in *Stevia rebaudiana* Bertoni (Compositae)". *International Journal of Biology*, 4 (1), 26-32.

Attimarad, M., Ahmed, K. K. M. & Harsha, S. (2011). High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug discovery. *Pharmaceutical Methods*, 2 (2), 71-75.

از پدیده فرفره‌زایی نزدیک به سطح مواد گیاهی متلاشی می‌شود و فشار و دمای حاصله در این فرآیند، دیواره‌های سلولی گیاهی را پاره می‌کند. محققان بسیاری از امواج فراصوت در استخراج عصاره‌های گیاهی، روغن‌ها، پروتئین‌ها و ترکیبات فعال زیستی استفاده کرده‌اند (Vinatoru, 2012). آنتراکینون‌ها ترکیبات فعالی هستند که تاثیرات درمانی از خود نشان داده و در کاربردهای دارویی ضدسرطانی استفاده می‌شوند. Hemwimol و همکاران (۲۰۰۶) از امواج فراصوت جهت بهبود استخراج آنتراکینون‌ها از ریشه گیاه *موریندا سیتریفولیا* استفاده کرده‌اند. فرآیند استخراج با کمک امواج فراصوت در حلال مخلوط آب-متانول، ۷۵٪ منجر به کاهش زمان و افزایش راندمان استخراج در مقایسه با نمونه‌های تیمار نشده با امواج فراصوت شد. Martiono و همکاران (۲۰۰۶) استخراج کومارین و سایر ترکیبات مشابه را از گیاه شبدر به کمک امواج میکروویو، فراصوت و سوکسله بررسی نمودند. آن‌ها نتیجه گرفتند که استخراج این ترکیبات با استفاده از حمام فراصوت در زمان ۶۰ دقیقه و با حلال اتانول آبی ۵۰٪ بازدهی استخراج بالاتری داشت. در مطالعه‌ای دیگر از امواج فراصوت در استخراج روغن از دانه‌های آسیاب شده زیتون استفاده شد و مشخص گردید که در حضور این امواج، دیواره سلول‌ها و بافت‌های گیاهی تخریب شده و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بیشتری به داخل روغن راه یافتند (Jimenez et al., 2007). افزایش راندمان استخراج در اثر افزایش توان تابش فراصوت را می‌توان به بهبود فرآیند انتقال جرم ناشی از افزایش حلالیت استویوزید و همچنین کاهش ویسکوزیته حلال نسبت داد. کاهش بازده ناشی از افزایش مدت زمان استخراج که در روش سوکسله و فراصوت دیده می‌شود می‌تواند ناشی از ناپایداری شیمیایی ساختار استویوزید در برابر شوک انرژی حرارتی و فراصوتی باشد که منجر به تخریب ساختار آن می‌شود. ضمناً کاهش بازده ناشی از افزایش مدت زمان استخراج که در روش فراصوت دیده می‌شود را می‌توان به افزایش دمای مخلوط و در نتیجه کاهش تعداد حباب‌های کائوتاسیون تولید شده در اثر تابش امواج فراصوت نسبت داد. بیشترین بازده استخراج در مدت زمان ۲ دقیقه به دست آمده است؛ این مساله به دلیل تخریب مناسب دیواره سلولی و قابلیت خروج و در دسترس بودن گلیکوزیدها از جمله استویوزید است. به

Baştürk, A., Ceylan, M. M., Çavuş, M., Boran, G. & Javidipour, I. (2017). -Ultrasound assisted rapid extraction and kinetic modelling of influential factors: Extraction of camptothecin from *Nothapodytes nimmoniana* plant. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37 (12), 582-591.

Cardello, H. M. A. B., Da Silva, M.A.P.A. & Damasio, M. H. (1999). "Measurement of the relative sweetness of stevia extract, aspartame and cyclamate/saccharin blend as compared to sucrose at different concentrations". *Plant Foods for Human Nutrition*. 54 (2), 119-129.

Formigoni, M., Milani, P. G., Avíncola, A. d. S., Santos, V. J. D. & da Costa, S. C. (2018). Effects of some herbal extracts on oxidative stability of corn oil under accelerated oxidation conditions in comparison with some commonly used antioxidants. *LWT*, 89 (5), 358-364.

Sundlof, M. T. (2018). Has Stevia been approved by FDA to be used as a sweetener? US Food and Drug Administration.

Hemwimol, S., Pavasant, P. & Shotipruk, A. (2006). Ultrasonic-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13 (6), 543-548.

Jimenez, A. & Beltran, G. (2007). High-power ultrasound in olive paste pretreatment. Effect on process yield and virgin olive oil characteristics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(6), 725-731.

Kolb, N., Herrera, J. L., Ferreyra, D. J. & Uliana, R. F. (2001). Analysis of Sweet Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (10), 4538-4541.

Martino, E., Ramaiola, I. & Urbano, M. (2006). Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas Alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. *Journal of Chromatography A.*, 1125 (2), 147-151.

Martins, P. M., Thotat, B. N., Lanchote, A. D. & Freitas, L. A. (2016). Green extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bert.) with low solvent consumption: A desirability approach. *Resource-Efficient Technologies*, 2 (4), 247-253.

Martins, P. M., Lanchote, A. D., Thorat, B. N. & Freitas, L. A. P. (2017). Turbo-extraction of glycosides from *Stevia Rebaudiana* using a fractional factorial design, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27 (4), 510-518.

McClements D. J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science & Technology*, 6 (9), 293-299.

Misra, H., Soni, M., Silawat, N., Mehta, D., Mehta, B. K. & Jain, D. C. (2011). "Antidiabetic activity of medium-polar extract from the leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. (Bertoni) on alloxan-induced diabetic rats". *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3 (2), 242-248.

Morlock, G. E., Oellig, C., Bezuidenhout, L. W., Brett, M. J. & Schwack, W (2010). "Miniaturized planar chromatography using office peripherals". *Analytical Chemistry*. 82 (7), 2940-2946.

Myers, R.H. & Montgomery, D.C. (2002). Response surface methodology process and product optimization using designed experiments, Wiley Pub Inc, 51-83.

Nurok, D. (1989). "Strategies for optimizing the mobile phase in planar chromatography". *Chemical Reviews*, 89 (2): 363-375.

Parsons, W. T. & Cuthbertson, E. G. (2001). *Noxious Weeds of Australia*, 2nd ed. Collingswood, Australia: CSIRO Publishing. 289-294.

Patil, D. M. & Akamanchi K. G. (2015). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22 (4), 474-481.

Paz, J. E. W., Márquez, D. B. M. Ávila, G. C. G. & Cristoba R. E. B. (2009), *CAMAG Bibliography Service* 103, 5-25.

Salazar, V. A. G., Encalada, S. V., Cruz, A. C. & Campo, M. R. S (2018). Pretreatment with ethanol as an alternative to improve steviol glycosides extraction and purification from a new variety of stevia. *Food Chemistry*, 241 (15), 452-459.

Salazar, V. A. G., Encalada, S. V., Cruz, A. C. & Campos, M. R. S. (2018). *Stevia Rebaudiana*: A sweetener and potential bioactive ingredient in the development of functional cookies. *Journal of Functional Foods*, 44, 183-190.

Stones, M. (2011). "Stevia wins final EU approval". Food manufacture.co.uk. Retrieved 22 November 2011.

Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8 (3), 303-313.