

بررسی عوامل موثر بر استخراج پلی فنول‌ها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی چای سبز

اکرم آریان فر^۱ - فخری شهیدی^{۲*} - رسول کدخدایی^۳ - مهدی وریدی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۵/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۳۰

چکیده

چای با نام علمی *Camellia sinensis* از دمنوش‌های رایج و معروف در دنیا محسوب می‌گردد. مهم‌ترین ترکیب شیمیایی چای پلی‌فنول‌ها (کاتچین‌ها) هستند که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی بوده و در جلوگیری از بروز بیماری‌های قلبی مفید می‌باشد. هدف از این پژوهش، بررسی اثر عوامل مختلف از جمله دما در چهار سطح (۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد)، زمان (در چهار سطح ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه)، توان امواج مایکروویو (۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ درصد) و شدت امواج فراصوت (۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد) بر میزان استخراج پلی فنول‌ها از برگ چای سبز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره در سه روش هیئت رفلاکس، مایکروفر و فراصوت بوده است. نتایج نشان داد که با افزایش دما تا ۸۰°C، زمان تا ۴۵ دقیقه، افزایش شدت امواج فراصوت از ۴۰ تا ۸۰ درصد و افزایش توان امواج مایکروویو از ۳۰۰ تا ۶۰۰ درصد، میزان پلی فنول‌های استخراج شده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره در هر سه روش افزایش یافته و پس از آن تقریباً بدون تغییر بوده است. ($\alpha = 0/05$)

واژه‌های کلیدی: چای سبز، ترکیبات پلی فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، هیئت رفلاکس، فراصوت، مایکروویو

مقدمه

دارای نقش سلامتی زا هستند (Harbowy et al., 1997)
کاتچین‌ها^۶ (فلاوان-۳-ال) نوعی آنتی‌اکسیدان و از مهم‌ترین فلاوانول‌ها به شمار می‌روند. کاتچین‌های چای سبز شامل اپی‌کاتچین^۷، اپی‌کاتچین‌گالات^۸، اپی‌گالوکاتچین^۹ و اپی‌گالوکاتچین‌گالات^{۱۰} می‌باشند. فراوان‌ترین و فعال‌ترین کاتچین (فعالیت آنتی‌اکسیدانی)، اپی‌گالوکاتچین‌گالات می‌باشد (Komes et al., 2010).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاتچین‌ها به کیفیت برگ چای (موقعیت جغرافیایی کشت، آب و هوا، شرایط برداشت و ذخیره سازی) و شرایط فرایند و عمل آوری آن بستگی دارد (Shisuoka et al., 1986).

چای سبز خطر مرگ در اثر بیماری قلبی را بیش از بیست و پنج درصد کاهش می‌دهد و در جلوگیری از بروز بسیاری از بیماری‌ها به‌ویژه سرطان‌های مختلف بسیار حائز اهمیت است که علت آن

چای با (*Camellia sinensis*) گیاهی است بومی که چین و شمال هندوستان می‌باشد. از برگ‌های خشک این گیاه به اشکال گوناگون در تهیه انواع دمنوش‌ها استفاده می‌شود. چای یکی از دمنوش‌های رایج و معروف در دنیا، از جمله کشور ایران بوده و پس از آب پر مصرف‌ترین نوشیدنی دنیا است (Komes et al., 2010).

ترکیبات متشکله برگ چای شامل فلاوانول‌ها، فلاوانول‌ها، اسیدهای فنولیک، کافئین، تئوبرومین، پروتئین، اسیدهای آمینه، اسیدهای آلی، مونو و پلی ساکاریدها، لیگنین، چربی، کلروفیل و سایر رنگدانه‌ها، خاکستر و مواد معطر می‌باشند که ترکیبات فلاوانوئیدی (پلی فنول‌ها) از مهم‌ترین آن‌ها محسوب می‌گردند و

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران

۲ و ۴- به ترتیب استاد و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۳- دانشیار گروه نانوفناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی

(*- نویسنده مسئول: (Email: Niloofar1373@yahoo.com)

6 - Catechines

7 - Flavan-3-ol

8 - Epicatechin

9 - Epicatechingalat

10 - Epigallocatechin

11 - Epigallocatechingalat

گالوکاتچین گالات C ۹۰° به مدت ۴۰ دقیقه و کاتچین را C ۹۰° به مدت ۸۰ دقیقه گزارش کردند (Ziaedini et al., 2010).

Shisuoka (۱۹۸۶)، اثر دما، فشار اکسیژن و pH بر اتواکسیداسیون و اپی مریزاسیون اپی گالوکاتچین، تحت شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده و نشان داده است که با افزایش دما حساسیت این ترکیب به سایر شرایط محیطی افزایش یافته و تجزیه خواهند شد. همچنین اثر دما و pH بر واکنش‌های سنتتیک کاتچین‌ها در دم نوش چای سبز مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شده است که اکثر کاتچین‌ها تقریباً تا دمای C ۸۰ پایدار بوده و پس از آن دچار واکنش‌های اپی مریزاسیون و اکسیداسیون می‌گردند (Komatsu et al., 1992). Manzocco و همکاران (۱۹۹۸)، اثر فرآیند پاستوریزاسیون و زمان نگهداری را بر خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره چای بررسی کردند و دریافتند تحت این شرایط ممکن است دلیل تولید محصولات واسطه حاصل از اکسیداسیون کاتکین‌ها و فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتر این ترکیبات نسبت به اپی کاتکین‌ها، خواص آنتی اکسیدانی افزایش یابد.

امروزه از روش‌های نوین، جهت استخراج ترکیبات موثره گیاهی از جمله پلی فنول‌های چای استفاده می‌شود. این روش‌ها عبارتند از: مایکروویو^۱، امواج فراصوت^۲، دی اکسیدکربن فوق بحرانی^۳ و فشار بالای هیدروستاتیک^۴.

در سال‌های اخیر استفاده از امواج مایکروویو در صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از تکنیک‌های سنتی در استخراج ترکیبات از منابع گیاهی مستلزم صرف زمان و حلال می‌باشد، همچنین این روش‌ها از لحاظ دمایی ایمن نیستند و باعث تجزیه تعدادی از ترکیبات موجود می‌گردند. Wang و همکاران (۲۰۰۶)، استخراج با امواج مایکروویو (MAE) جهت استخراج ترکیبات فعال بیولوژیکی و اسانس‌های روغنی از علف‌ها و استخراج پلی فنول‌ها و کافئین از برگ چای سبز مورد بررسی قرار دادند از مزایای استخراج با امواج مایکروویو مصرف پایین انرژی و حلال، زمان کوتاه استخراج و همچنین محافظت از ترکیبات حساس به حرارت می‌باشد. امواج مایکروویو، امواج الکترومغناطیسی با فرکانس ۰/۳ تا ۳۰۰ گیگاهرتز هستند. مایکروویوهای خانگی و صنعتی معمولاً در فرکانس ۲/۴۵ گیگاهرتز کار می‌کنند. در استخراج با امواج مایکروویو امواج جذب شده توسط نمونه موجب تولید گرما می‌گردد که این گرما موجب تبخیر آب نمونه و اعمال فشار روی دیواره سلولی نمونه می‌گردد که منجر به تخریب دیواره و رهایی ترکیبات درون سلول می‌گردد (Quan et al.,

خاصیت آنتی اکسیدانی پلی فنول‌های چای می‌باشد. چای سبز در مقایسه با چای سیاه دوره تخمیر و اکسیداسیون کوتاه تری داشته و بنابراین آنتی اکسیدان‌های موجود در آن نسبت به چای سیاه بهتر حفظ می‌شود (Nurulain et al., 2006).

تولید و عرضه نوشیدنی چای سبز در مقایسه با سایر نوشیدنی‌های رایج در بازار به دلیل نقش سلامتی زایی بالای آن بسیار حائز اهمیت است. یکی از مراحل اساسی تولید نوشیدنی چای، فرایند استخراج عصاره از برگ چای می‌باشد. با توجه به اهمیت ترکیبات پلی فنولی، عصاره حاصل باید دارای حداکثر ترکیبات پلی فنولی باشد. بنابراین بکارگیری یک روش استخراج مناسب جهت استخراج حداکثر این ترکیبات بدون آسیب حرارتی، بسیار حائز اهمیت است.

روش‌های استخراج عصاره از برگ چای شامل استخراج گرم، پرکولاسیون، استخراج مداوم (سوکسله) و هیت رفلکس با استفاده از حلال‌های آلی می‌باشند که سرعت استخراج در این روش‌ها پایین است. ضمن اینکه با افزایش دمای استخراج بسیاری از ترکیبات چای از جمله پلی فنول‌ها و ترکیبات معطر آسیب دیده و سبب کاهش خواص آنتی اکسیدانی، عطر و طعم عصاره، افزایش استخراج پروتئین و پکتین و در نتیجه افزایش کدورت و تغییر ویژگی‌های حسی عصاره می‌گردند (Lin et al., 2008).

شرایط استخراج عصاره به ویژه دما، زمان، توان امواج مایکروویو، شدت امواج فراصوت، نوع حلال و نسبت ماده خشک به حلال بر کارایی استخراج و کیفیت عصاره حاصل نقش به سزایی دارند. جهت حفظ ویژگی‌های حسی و تغذیه‌ای عصاره چای سبز، عصاره گیری باید در شرایط دمایی ملایم و در حداقل زمان ممکن صورت پذیرد تا اپی مریزاسیون و ایزومریزاسیون ترکیبات فنولی و سایر آسیب‌های حرارتی به حداقل ممکن کاهش یابد (Sang et al., 2005).

Amra و همکاران (۲۰۰۶)، اثر نوع حلال، دما و زمان را بر کارایی استخراج پلی فنول‌ها و کاتکین‌های چای سبز را مورد بررسی قرار داده‌اند. همچنین کومز و همکاران (۲۰۱۰)، اثر شرایط استخراج و زمان نگهداری بر میزان ترکیبات پلی فنولی و ظرفیت آنتی اکسیدانی دم نوش چای سبز در سه حالت کیسه ای، پودری و برگ چای مورد بررسی قرار داده و دریافتند که بهترین شرایط برای استخراج حداکثر ترکیبات پلی فنولی C ۸۰ به مدت ۱۵ دقیقه در حالت کیسه ای، ۵ دقیقه در حالت پودری و ۳۰ دقیقه برای برگ چای می‌باشد (Komes et al., 2010). ضیاءالدینی و همکاران (۲۰۱۰)، اثر دما و زمان بر حلالیت کاتچین‌ها و کافئین از برگ سبز چای ایرانی و همچنین سنتتیک انتقال جرم و مدل سازی استخراج مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران شرایط بهینه استخراج کافئین را C ۸۰ به مدت ۲۰ دقیقه، اپی کاتچین و اپی گالوکاتچین C ۸۰ به مدت ۲۰ دقیقه، اپی

- 1- Microwave Assisted Extraction (MAE)
- 2 - Ultrasound Assisted Extraction (UAE)
- 3 - Supercritical Co₂
- 4 - High Hydrostatic Pressure

مواد و روش‌ها

مواد

عمده ترین مواد اولیه مورد استفاده در این پژوهش برگ چای سبز از گونه *Camellia Sinensis* بود که از مزارع لاهیجان تهیه شد. حلال مورد استفاده نیز آب دیونیزه بوده است. مواد شیمیایی مورد استفاده جهت اندازه گیری پلی فنول‌های عصاره چای سبز شامل فولین سیو کالچو، کربنات سدیم و اسید گالیک با درجه خلوص آزمایشگاهی از سیگما آلدردیج و معرف ۲و۲ دی فنیل ۱ پیکریل هیدرازیل (DPPH) و متانول از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

روش‌ها

مراحل تولید عصاره شامل آماده سازی برگ خشک چای سبز و سپس عصاره گیری به سه روش HRE، MAE، UAE می‌باشد. برگهای خشک چای سبز جهت افزایش سطح تماس حلال با ماده خشک و در نتیجه افزایش راندمان عصاره گیری کاملاً خرد شده و سپس با الک با مش ۱۶ الک شدند. جهت عصاره گیری، یک گرم از ذرات الک شده با صد میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط شدند (نسبت ۱/۱۰۰) در عصاره گیری به روش HRE، مخلوط حاصل در یک بالن ته گرد متصل به کندانسور مخلوط شده و توسط حمام آب گرم تحت حرارت قرار گرفتند.

در عصاره گیری به روش MAE از دستگاه میکروسنت آزمایشگاهی (Milestone- ACT-36-Revol) استفاده شد. این دستگاه در فرکانس ۵۰ هرتز و خروجی ۲۴۵۰ مگا هرتز با توان خروجی ۱۰۰-۱۰۰۰ وات و حداکثر دمای ۱۸۰°C کار می‌کند. علت استفاده از این دستگاه به جای میکروووفر خانگی، کنترل همزمان دما، زمان و توان می‌باشد. مخلوط برگ چای و آب دیونیزه با نسبت ۱/۱۰۰ در لوله‌های تفلون ریخته و کاملاً مخلوط شدند. لوله‌های تفلون در پوسته‌های محافظ HTC قرار گرفته و درب آنها کاملاً بسته شد.

در استخراج به روش فراصوت (UAE) از دستگاه مولد امواج فراصوت (VCX 750 ساخت شرکت Sonics & Materials) آمریکا با فرکانس ۲۵ کیلوهرتز و حداکثر توان اسمی ۷۵۰ وات استفاده شد. از پروب انتقال امواج فراصوت مدل S & M 630-0457، ساخت شرکت Sonics & Materials آمریکابه قطر ۱۵ میلی متر و حمام بن ماری با سیستم سرمایش و سیرکولاسیون خارجی مدل F 26، ساخت شرکت Julabo کشور آلمان استفاده شد.

مخلوط برگ چای و آب دیونیزه با نسبت ۱/۱۰۰ در محفظه دوجداره دستگاه فراصوت پر شده و سونوترود دستگاه ۱/۵ سانتی متر زیر سطح مایع غوطه ور شد.

(Wang et al., 2006; Wang, 2009). بنابراین استفاده از امواج میکروویو مقدار ترکیبات استخراج شده را بهبود می‌بخشد. پن و همکاران (۲۰۰۳)، اثر عوامل موثر بر استخراج شامل نوع و غلظت حلال، زمان، نسبت جامد به مایع، زمان خیساندن قبل از استخراج بر میزان استخراج پلی فنول-ها و کافئین از چای سبز به روش (MAE) مورد بررسی قرار داده و بهترین زمان استخراج در این روش ۴ دقیقه گزارش کرده اند. همچنین مشخص شده است که این روش نسبت به روشهای سنتی کارایی بیشتری دارد. Wang و همکاران (۲۰۱۰) اثر پارامترهای زمان، نوع و غلظت حلال بر میزان استخراج پلی فنولها از چای سبز مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش از اتانول ۶۰ درصد استفاده شده است و بهترین شرایط را دمای ۸۰°C به مدت ۱۰ دقیقه با توان ۶۰۰ وات گزارش کرده اند (Wang et al., 2010).

در سال‌های اخیر از امواج فراصوت (UAE) به عنوان روشی جهت استخراج ترکیبات موثره مانند اسانس‌ها، روغن‌ها و مکمل‌های رژیمی استفاده می‌شود. این امواج دارای فرکانس‌های بالاتر از ۲۰ کیلوهرتز هستند که در محیط‌های جامد، مایع و گاز ارتعاشات مکانیکی ایجاد میکنند. امواج فراصوت در محیط ماده پخش شده و چرخه‌های انبساط و انقباض ایجاد می‌کنند که در حالت انبساط حباب‌هایی در محیط مایع ایجاد شده و فشار منفی تولید می‌گردد. ترکیدن حباب‌ها سبب متلاشی شدن سلول‌ها می‌شوند. بنابراین تخریب سلولی و انتقال جرم دو فاکتور موثر بر افزایش راندمان استخراج در این روش می‌باشد. این روش استخراج نسبت به روش‌های استخراج سنتی سبب بهبود کیفیت عصاره استخراج شده و جهت استخراج ترکیبات حساس به حرارت مناسب می‌باشد. بطور کلی یک روش ارزان و ساده و جایگزین مناسب برای روش‌های سنتی می‌باشد. ترکیبات مختلف از جمله آنتی اکسیدان‌ها، طعم و آروما، رنگدانه‌ها و... با این روش استخراج شده اند (Chemat et al., 2011; Zbigniew et al., 2007) مطالعاتی در زمینه استخراج عصاره چای سبز با امواج فراصوت صورت گرفته و نتایج بدست آمده نشان می‌دهد این روش سبب حفظ کیفیت کاتچین‌های عصاره می‌شود Xia و همکاران (۲۰۰۶)، اثر امواج فراصوت را بر کارایی استخراج و ویژگیهای حسی و شیمیایی دم نوش چای مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که کارایی استخراج اکثر ترکیبات شیمیایی چای در این روش نسبت به روش‌های سنتی بیشتر، اما میزان استخراج پکتین و پروتئین در این روش کمتر بود. همچنین عطر و طعم عصاره حاصل از این روش نیز بیشتر است (Xia et al., 2006).

هدف از این پژوهش بررسی اثر عوامل مختلف از جمله دما، زمان، توان میکروویو و شدت امواج فراصوت بر میزان استخراج پلی فنول‌ها از برگ چای سبز در سه روش هیت رفلاکس، میکروووفر و فراصوت می‌باشد.

نتایج و بحث

اثر دما بر میزان استخراج پلی فنول‌های چای سبز

روش استخراج HRE: نتایج آنالیز واریانس نشان می‌دهد که با افزایش دمای استخراج از ۴۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد درصد استخراج پلی فنول‌ها و درصد بازدارنده‌های آزاد DPPH بطور معنی‌داری افزایش یافته و پس از آن ثابت بود ($p < 0/05$). همانطور که در شکل (a,b) مشاهده می‌شود با افزایش دمای استخراج تا ۸۰ °C ترکیبات پلی فنولی و درصد بازدارنده به ترتیب به میزان ۲۳/۵۳٪ و ۴۳٪ افزایش یافته و سپس ثابت بوده است. با افزایش دمای استخراج انتشار ترکیبات پلی فنولی از داخل سلول افزایش می‌یابد. علت عدم تغییر میزان پلی فنول‌ها در دماهای بالاتر از ۸۰ °C تجزیه کاتکین‌ها در این دما و اشیاع حلال از حل شونده می‌باشد (Jhoo et al., 2005; Komatsu et al., 1992). نتایج نشان می‌دهد درصد بازدارنده‌های آزاد DPPH با میزان ترکیبات پلی فنولی عصاره رابطه مستقیم دارند. امرا و همکاران در سال ۲۰۰۶ اثر نوع حلال، دما و زمان را بر کارایی استخراج پلی فنول‌ها و کاتکین‌های چای سبز بررسی کردند و به نتایج مشابهی در این زمینه دست یافتند (Amra et al., 2006).

Koms و همکاران (۲۰۱۰)، در بررسی اثر شرایط استخراج و زمان نگهداری بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی دمنوش چای سبزه نتایج مشابهی دست یافتند که ارتباط مستقیم بین میزان پلی فنول‌های عصاره را با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تایید می‌کنند.

روش استخراج UAE: همان‌طور که در شکل (a,b) ۲،

مشاهده می‌شود با افزایش دمای استخراج از ۴۰ °C تا ۸۰ °C میزان پلی فنول‌ها و درصد بازدارنده‌های آزاد DPPH بطور معنی‌داری افزایش یافته اما افزایش دما از ۸۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد اثر معنی‌داری بر هیچ‌کدام از متغیرها نداشته است ($p < 0/05$).

پارامترهای قابلیت انتشار و حلالیت ترکیبات چای و ویسکوزیته و فشار بخار حلال تحت تاثیر دما می‌باشند. با افزایش دمای استخراج، تا حدی حفره زایی حبابها افزایش یافته و در زمان متلاشی شدن انرژی بالاتری تولید می‌کنند اما با افزایش بیشتر دما و فشار بخار، با وجود تشکیل حباب‌های بیشتر، انرژی حاصل از متلاشی شدن حباب‌ها کمتر است همچنین با افزایش دما تا نقطه جوش حلال به دلیل افزایش فشار بخار داخل ریز حباب‌ها و در نتیجه فرونشاندن موج شوک و کاهش کشش سطحی سونیکاسیون غیر موثر رخ داده و حفره زایی تقریباً به صفر می‌رسد و به همین دلیل با افزایش دمای استخراج از ۸۰ °C، میزان پلی فنول‌های استخراجی و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی تقریباً ثابت می‌ماند (Charalampos et al., 2010).

در هر سه روش ذکر شده از همزن مغناطیسی با دور ۵۰۰ دور در دقیقه در طول مدت عصاره‌گیری استفاده شد. عصاره‌گیری در دماهای ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در زمانهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه صورت گرفت. شدت امواج فراصوت ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد و توان امواج میکروویو ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ بودند. عصاره‌های حاصل توسط فیلتر خلاء صاف و در ۴ °C (یخچال) نگهداری شدند. میزان ترکیبات پلی فنولی عصاره‌های حاصل به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از معرف فولین سیو کالچو اندازه‌گیری شد (استاندارد ملی ایران، شماره ۱-۸۹۸۶).

یک میلی لیتر از عصاره صاف شده با صد میلی لیتر آب دیونیزه رقیق شده و یک میلی لیتر از عصاره رقیق شده با پنج میلی لیتر معرف فولین سیو کالچو ۱۰ درصد مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه جهت مخلوط شدن کامل و رتکس شد. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در یک مکان تاریک نگهداری شده و رنگ آبی ایجاد شده در طول موج ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-160 Shimadzu اندازه‌گیری شد. منحنی کالیبراسیون اسید گالیک نیز ($0/05$ تا $0/05$ میلی گرم بر لیتر اسید گالیک) رسم شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری نیز بر پایه معادله این منحنی، به صورت اکی والان اسید گالیک در هر گرم نمونه بیان شد. $R^2 = 0/99$ (۱)

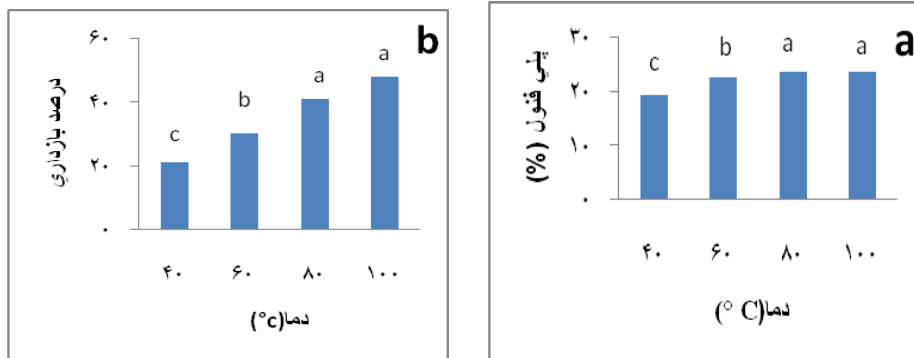
$$Y = 62.94 X - 0.67$$

خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل بر اساس فعالیت به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک میلی لیتر از عصاره صاف شده با یک میلی لیتر معرف DPPH (۱/۱ میلی مول در اتانول) مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر اتانول ۹۵٪ به عنوان شاهد با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-160 Shimadzu اندازه‌گیری شد (Brand-Williams et al., 2010).

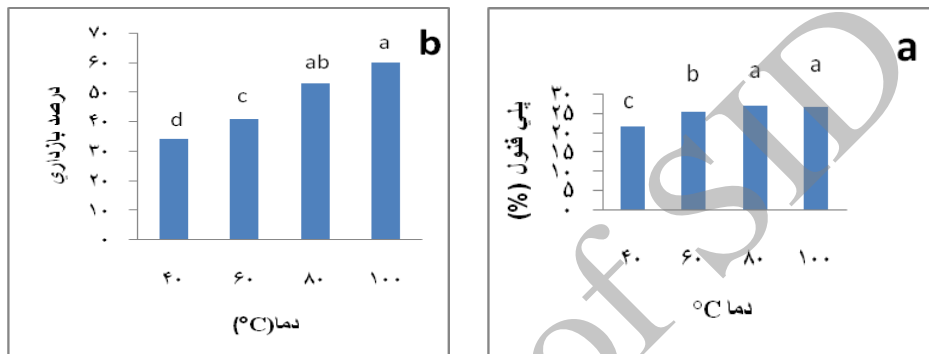
$$\text{درصد بازدارندگی} = \left[\frac{(A_{517\text{blank}} - A_{517\text{sample}})}{A_{517\text{blank}}} \right] \times 100 \quad (2)$$

تجزیه و تحلیل آماری: در این پژوهش اثر چهار سطح دما،

چهار سطح زمان و سه سطح توان میکروویو سه سطح توان دستگاه مولد امواج فراصوت بر میزان استخراج ترکیبات پلی فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه واریانس نتایج با آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. کلیه آزمون‌ها در سه تکرار و میانگین تکرارها در قالب آزمون دانکن در سطح آماری ۵٪ مورد مقایسه قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار Minitab 16 انجام شد.



شکل ۱- اثر دما بر میزان استخراج پلی فنول ها (a) و در صد بازداری رادیکال DPPH (b) چای سبز در روش HRE



شکل ۲- اثر دما بر میزان استخراج پلی فنول ها (a) و در صد بازداری رادیکال DPPH (b) چای سبز در روش UAE

نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره به دلیل کاهش پایداری آن ها در مقابل دما و تجزیه حرارتی و در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره کاهش می یابد (Wang et al., 2010; Zhu et al., 1997).

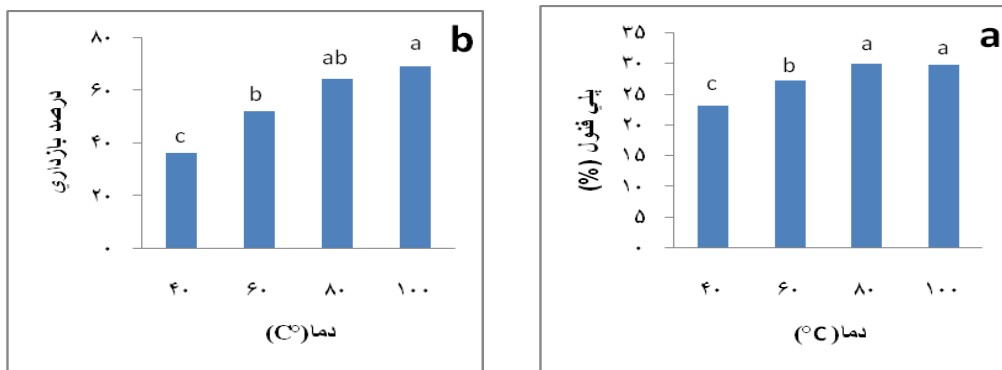
اثر زمان بر میزان استخراج پلی فنول های چای سبز

روش استخراج HRE: همان طور که در شکل ۴(a,b) مشاهده می شود، افزایش زمان استخراج از ۱۵ تا ۴۵ دقیقه اثر معنی داری بر میزان پلی فنول های استخراج شده و درصد بازداری رادیکال های آزاد DPPH از چای سبز داشته است بطوری که میزان پلی فنول از ۱۸/۸٪ به ۲۳/۵٪ و درصد بازداری از ۱۲٪ به ۴۰٪ افزایش یافته است ($p < 0.05$). با افزایش زمان استخراج، مدت زمان تماس حلال و حل شونده افزایش می یابد. اما با افزایش زمان استخراج از ۴۵ دقیقه به بالا افزایش معنی داری در میزان پلی فنول ها مشاهده نمی شود که علت آن اشباع شدن حلال از حل شونده می باشد و در نتیجه درصد بازداری رادیکال های آزاد DPPH نیز ثابت می ماند (Lin et al., 2008; Xu et al., 2004 & Manzocco et al., 1998).

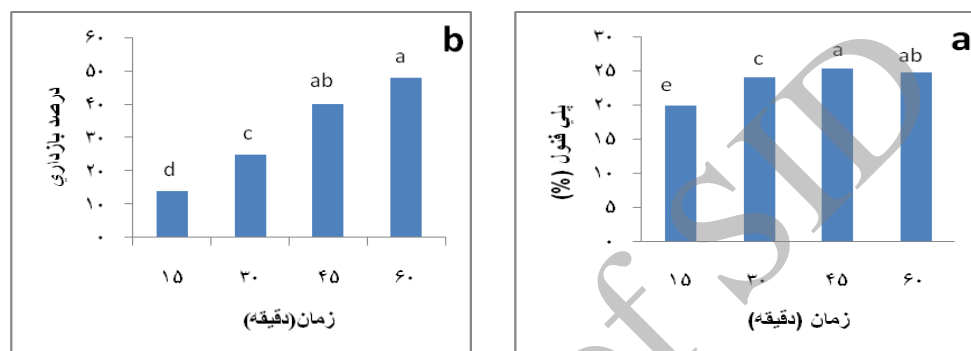
روش استخراج MAE: نتایج آنالیز واریانس گویای معنی دار

بودن اثر دما بر میزان استخراج پلی فنول ها و درصد بازداری رادیکال های آزاد DPPH از چای سبز بود ($p < 0.05$). شکل ۳(a,b) نشان می دهد که با افزایش دمای استخراج از ۴۰ C تا ۸۰ C میزان پلی فنول ها و درصد بازداری رادیکال های آزاد DPPH افزایش می یابد، اما در دماهای ۸۰ C تا ۱۰۰ C افزایش معنی داری مشاهده نمی شود. با افزایش دما و جذب آب توسط ذرات چای، فشار بخار داخل سلول ها افزایش یافته و با افزایش فشار داخل سیتوپلاسم سلولی، سلول ها باد کرده و به دیواره سلولی فشار وارد می کنند و بنابراین خروج محتویات سلولی از داخل سلول ها افزایش می یابد. با افزایش بیشتر دما، واکنش های بین مولکولی در حلال، مهاجرت ملکولی و قابلیت دسترسی و حلالیت پلی فنول ها افزایش و در نتیجه باز جذب ترکیبات پلی فنولی از داخل سلول نیز زیاد می شود (Wang et al., 2010; Wang et al., 2008).

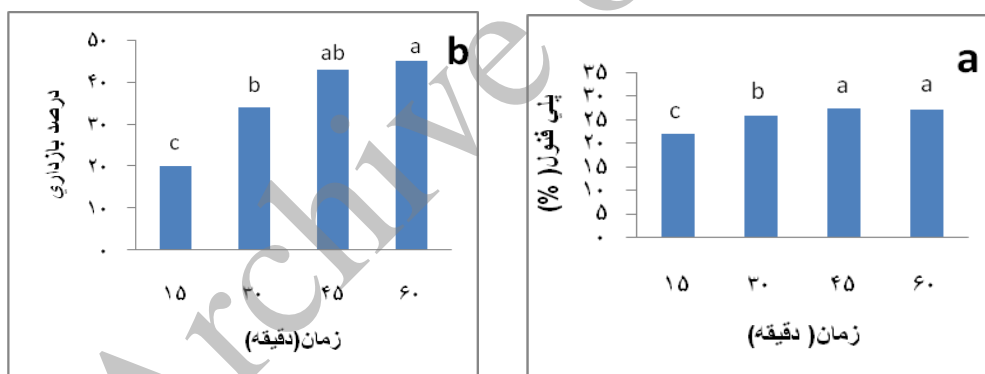
در دماهای بالا ظرفیت حلال جهت حل کردن ترکیبات پلی فنولی افزایش و کشش سطحی و ویسکوزیته حلال کاهش می یابد و در نتیجه نفوذ حلال به درون ماتریکس سلول و مرطوب شدن ذرات افزایش می یابد. در دماهای بالاتر از ۸۰ C میزان پلی فنول ها و در



شکل ۳- اثر دما بر میزان استخراج پلی فنول‌ها (a) و درصد بازداری رادیکال DPPH (b) چای سبز در روش MAE.



شکل ۴- اثر زمان بر میزان استخراج پلی فنول‌ها (a) و درصد بازداری رادیکال DPPH (b) چای سبز در روش HRE.

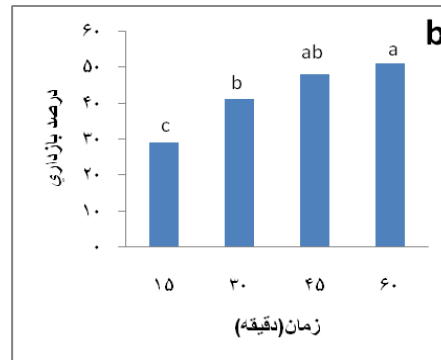
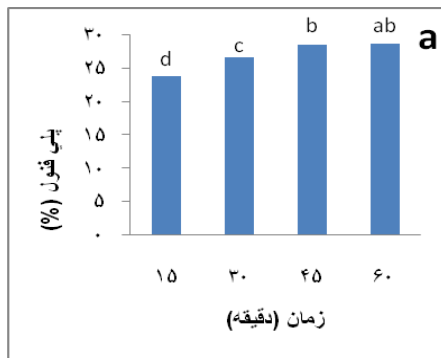


شکل ۵- اثر زمان بر میزان استخراج پلی فنول‌ها (a) و درصد بازداری رادیکال DPPH (b) چای سبز در روش UAE.

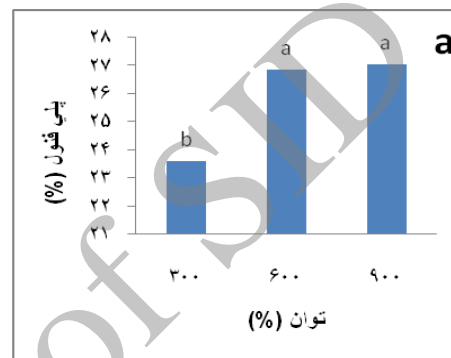
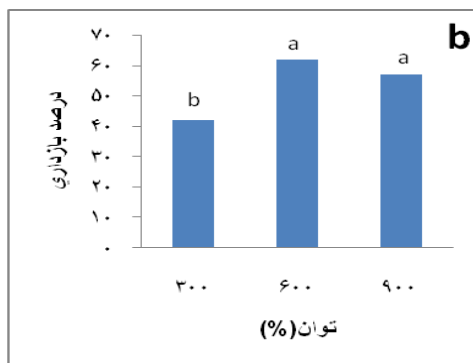
یکی از فاکتورهای مؤثر بر میزان استخراج پلی فنول‌ها و درصد بازداری رادیکال‌های آزاد DPPH می‌باشد. همان‌طور که در شکل (a,b) مشاهده می‌شود، افزایش زمان تشعشع از ۱۵ تا ۳۰ دقیقه اثر معنی داری بر میزان پلی فنول‌های استخراج شده و درصد بازداری رادیکال‌های داشته است، اما با افزایش زمان استخراج از ۴۵ دقیقه، افزایش معنی داری مشاهده نمی‌شود ($p < 0.05$). نتایج تحقیقات ونگ و همکاران (۲۰۱۰)، نشان داد که با افزایش زمان استخراج تا ۲ دقیقه میزان استخراج پلی فنول‌ها افزایش یافته و سپس تغییری نکرده است.

روش استخراج UAE: شکل (a,b) ۵، اثر زمان استخراج بر میزان پلی فنول‌ها و درصد بازداری رادیکال‌های آزاد DPPH را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس حاکی از این است که با افزایش زمان سونیکاسیون میزان کل پلی فنول‌ها و درصد بازداری به ترتیب تا ۲۷/۳٪ و ۴۳٪ افزایش می‌یابد که این افزایش ناشی از تخریب بیشتر دیواره سلولی، تماس بیشتر حلال و حل شونده و در نتیجه افزایش میزان پلی فنول‌ها می‌باشد (Vinatoru et al., 2001). ($p < 0.05$)

روش استخراج MAE: مدت زمان تشعشع امواج میکروویو نیز



شکل ۶- اثر زمان بر میزان استخراج پلی فنول‌ها (a) و در صد بازداری رادیکال DPPH (b) چای سبز در روش MAE.



شکل ۷- اثر توان امواج بر میزان استخراج پلی فنول‌ها (a) و در صد بازداری رادیکال DPPH (b) چای سبز در روش MAE.

آنتی‌اکسیدانی مشاهده نمی‌شود زیرا با افزایش توان از این حد دما نیز افزایش یافته و با تجزیه پلی‌فنول‌ها همراه خواهد بود و در نتیجه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نیز کاهش می‌یابد (Nkhili et al., 2010; Wang et al., 2009).

اثر شدت امواج فراصوت بر میزان استخراج پلی‌فنول‌های چای سبز

میزان پلی‌فنول‌های استخراج شده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بطور معنی‌داری تحت تاثیر شدت امواج می‌باشد. شکل ۸ (a,b) با افزایش شدت صوت از ۴۰ تا ۱۰۰ درصد حباب‌های بیشتری تشکیل و متلاشی می‌شود. فشار و دمای داخل حباب‌ها افزایش یافته و حباب‌ها در مدت زمان کوتاه‌تری متلاشی می‌گردند. بنابراین موج شوک قوی‌تر و فواره‌های با سرعت بالا^۱ تولید شده و نفوذ حلال به نیز زیاد می‌شود. همچنین با افزایش شدت صوت، دما افزایش یافته و سرعت پاره شدن دیواره سلول‌ها را افزایش می‌دهد و در نتیجه خروج محتویات داخل سلولی به حلال (سرعت انتقال جرم)

همچنین هانگ-یو و همکاران (۲۰۱۰)، نشان دادند که با افزایش زمان استخراج تا ۲۵ دقیقه میزان استخراج افزایش و پس از آن کاهش یافته است. علت تفاوت زمان حداکثر استخراج تفاوت در توان و دمای بکار رفته در فرایند استخراج می‌باشد (Hong-Yu et al., 2010; Wang et al., 2010; Spigno et al., 2009 & Pan et al., 2003).

اثر توان امواج مایکروویو بر میزان استخراج پلی‌فنول‌های چای سبز

اثر توان امواج مایکروویو بر میزان استخراج پلی‌فنول‌ها و درصد بازداری رادیکال‌های آزاد DPPH در شکل ۷ (a,b) مشاهده می‌گردد. بر اساس نتایج آنالیز واریانس، افزایش توان از ۳۰۰ تا ۶۰۰ اثر معنی‌داری بر هر دو متغیر داشته است. اما با افزایش توان از ۶۰۰ به ۹۰۰ اثر معنی‌داری مشاهده نشده است. اثر توان امواج مایکروویو به ثابت دی الکتریک حلال بستگی دارد که آب ثابت دی الکتریک بالایی دارد. در واقع با افزایش توان، انرژی امواج به دلیل چرخش دو قطبی و هدایت یونی افزایش و بنابراین میزان تحرک ملکولی و دما افزایش می‌یابد و در نتیجه استخراج پلی‌فنول‌ها افزایش می‌یابد اما با افزایش توان از ۶۰۰ به ۹۰۰ تغییری در میزان پلی‌فنول‌ها و ظرفیت

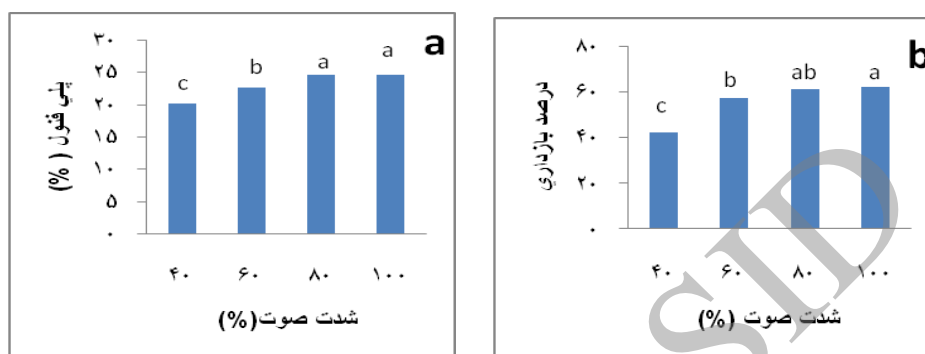
1 - Violent shock wave
2 - High Speed Jet

پلی فنول‌ها افزایش می‌یابد و سپس به دلیل اشباع حلال از حل شونده، تجزیه حرارتی کاتچین‌ها و سونیکاسیون غیر موثر (در روش فراصوت) ثابت می‌مانند. شدت امواج فراصوت و توان امواج مایکروویو نیز تا حدی میزان استخراج پلی فنول‌ها و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش داده و پس از آن اثر معنی‌داری نداشته‌اند. نتایج حاکی از این است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی ارتباط مستقیم با میزان پلی فنول‌های عصاره دارد.

افزایش یافته، و در نتیجه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش می‌یابد (Xia et al., 2006; Mason et al., 1994).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج نشان داد که با افزایش دما و زمان استخراج در هر سه روش HRE، UAE و MAE میزان استخراج پلی فنول‌ها از داخل سلول‌ها و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، به‌دلیل افزایش سرعت انتشار



شکل ۸- اثر شدت امواج بر میزان استخراج پلی فنول‌ها (a) و در صد بازدارندگی رادیکال DPPH (b) چای سبز در روش UAE

منابع:

- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. تعیین مقدار کل پلی فنول‌های چای سبز و سیاه به روش رنگ سنجی استاندارد ۱-۸۹۸۶ ایران
- Amra, P.U., M, Skrget., and Z, knez. 2006. Extraction of active ingredients from green tea: Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *J. Food Chemistry*. 96: 597-605.
- Brand-Williams, W, Cavellier, M. E. and Bereset. C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *J. Food Sci. Technol. (London)*. , 28:25-30.
- Charalampos, P., and M, Komitis,. 2006. Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants : Comparison with conventional extraction technics. *J. Food Quality*. 29: 567-582.
- Chemat, F., M, Kamran Khan., 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction *J. Ultrasonics Sonochemistry*. 18 : 813-835.
- Harbowy, M and D, Balentin., 1997. Tea chemistry. *Critical Rev. J. Food Sci Nut*. 16: 415-480.
- Hitochi, k and m, Nobuyosh. 2007. Extraction of catechin from green tea using ultrasound. *J. Application physic*. 46: 4936-4938.
- Hong-Yu, L., W, Bin., Y, Chun-Guang., X, Yin-Feng. 2010. Optimization of Microwave-assisted Extraction of Polyphenols from *Enteromorpha prolifra* by Orthogonal Test. *J. Chinese Herbal Medicines*. 2(4): 321-325
- Jhoo, J.W., C.Y, Lo., S, Li., S ,Sang., T, Heinze and T. C, Ho. 2005. Stability of Black Tea Polyphenol, Theaflavin, and Identification of Theanaphthoquinone as Its Major Radical Reaction Product. *J. Agric. Food Chem*. 53: 6146-6150.
- Komatsu, Y., S, Suematsu., Y, Hisanobu., H, Saigo ., and R ,Matsuda. 1992. Effect of PH and Temperature on Reaction Kenetics in Green Tea Infusion. *J. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 57(6): 907-910
- Komes, D., D, Horzic ., A, Belscak., K, Kovacevic., and I, Vulic. 2010. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *J. Food Research International*. 43: 167-176
- Lin, D.s., E.H, Lio ., and J.L, Mau. 2008. Effect of different brewing methods on antioxidant properties of steaming green tea. *J. Food Science and Technology*. 41: 1616-1623.
- Mason, T. J and Y, Zhao. 1994. Enhanced extraction of teasolids using ultrasound. *J. Ultrasonics*. 32(5): 375-377

- Manzocco, L., M, Anese ., and M. C. Nicoli. 1998. Antioxidant Properties of Tea Extracts as Affected by Processing. *J of Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 31(7): 694-698.
- Nkhili, E ., V, Tomao., H, El Hajji., E.S, El Boustani., F, Chematb., and O D,anglesb. 2009. Microwave-assisted Water Extraction of Green Tea Polyphenols. *J. Phytochemical Analysis.* 20: 408-415.
- Nurulain T.Z. 2006. Green tea and its polyphenolic catechins: medical uses in cancer and non cancer applications. *J. Life Science.*78: 2073-2080.
- Pan, X., G, Niu., and H, Liu. 2003. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *J. Chem Eng Processing.* 42: 129-133.
- Quan, P.T., T.V, Hang., Ha, and T.N, Tuyen. 2006. Microwave-assisted extraction of polyphenols from fresh tea shoot. *J. Food Science and Technology Development.*9(8) .
- Sang, S., M.J, Lee., Z, Hou., C.T, Ho., and C. S, Yang., 2005. Stability of Tea.
- Shisuoka, S. 1986. Process for the production of tea catechins, US patent 4.613.672.
- References and further reading may be available for this article. To view references and further reading you must purchase this article.
- Spigno, G., and D.M , Faveri. 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *J. Food Engineering.* 2: 210-217.
- Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasoniclly assisted extraction of bioactive principles from herbs. *J. Ultrason. Sonochem.* 8: 303-313.
- Wang, L. and C. Weller, 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *J. Trends in food Science and Technology.*17(6): 300-312.
- Wang, R., W, Zhou., and X, Jiang. 2008. Reaction Kinetics of Degradation and Epimerization of Epigallocatechin Gallate (EGCG) in Aqueous System over a Wide Temperature Range. *J. Agric. Food Chem.* 56: 2694-2701
- Wang, L., P, Qin., and Y, Hu., 2010. Study on the microwave-assisted extraction of polyphenols from tea. *J. Chem. Eng. China.* 4(3): 307-313.
- Xia, T., S ,Shi., X, Wan. 2006. Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion . *J. of Food Engineering.* 74 : 557-560.
- Xu, JZ., SY, Yeung., Q, Chang., Y, Huang., and ZY, Chen.2004. Comparison of antioxidant activity and bioavailability of tea epicatechins with their epimers. *British Journal of Nutrition.* 91(6) : 873-881.
- Zbigniew J. Dolatowski, Joanna Stadnik, Dariusz Stasiak. 2007. Application of ultrasound in food technology. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 6(3): 89-99.
- Zhu, Q.Z., A, Zhang., D, Tsang., Y, Huang., and Z.Y, Chen. , 1997. Stability of Green Tea Catechins. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4624-4628.
- Ziaedini , A, Jafari, A, Zakeri, A. 2010. Extraction of Antioxidants and Caffeine from Green Tea (*Camelia sinensis*) Leaves: Kinetics and Modeling . *J International Food Science and Technology .*16 (6) : 505-510

Evaluation of factors effecting on extraction of the green tea polyphenols and antioxidant properties

A. Arianfar¹- F. Shahidi^{2*}- R. Kadkhodae³- M. Varidi⁴

Received: 02-08-2012

Accepted: 18-02-2013

Introduction: Tea (*Camellia sinensis*), is the most widely beverage after water across the world. The most important chemical composition in tea is phenolic compounds (catechins) that have antioxidant and anticarcinogenic properties and are benefited for cardiovascular disease. There are two major kinds of tea, black tea and green tea. Green Tea, is originated in China and dates back to several thousand years ago. In the production of green tea, young leaves are rolled and oxidized to decreasing oxidation but in production of black tea, tea leaves are oxidized (fermented) for 90-120 min after rolling and then catechins are converted to complex compounds (theaflavins and thearubigins). The conventional method for extraction of green tea polyphenols compounds are heating, boiling, cold and heating reflux extraction, with long extraction periods and low extraction efficiency. In this study 3 techniques for extraction of polyphenol compounds from Green tea leaves were investigated and compared together. The main objective of this study was to determine the effects of different extraction conditions, temperature (40, 60, 80 and 100 °C), different time (15, 30, 45 and 60 min), microwave power (300, 600 and 900 %) and ultrasound amplitude (40, 60, 80 and 100 W) on Green tea polyphenol content and antioxidant activity in three methods including Heat Reflux Extraction (HRE), Microwave Assisted Extraction (MAE) and Ultrasound Assisted Extraction (UAE).

Materials and Methods: Dried green tea leaves (supplied from Lahijan (Iran)) were grinded for increasing the contact surface area between the solvent and solute. 1 g of green tea was extracted with 100 mL of water at various methods, Heating Reflux Extraction (HRE), Microwave Assisted Extraction (MAE), by microsynth laboratory system (Milestone-ACT-36-Rev01) at 50 Hz and output 2450 MHz with adjustable power output (100-1000 W), temperature 180 °C and Ultrasound Assisted Extraction (UAE) in double jacket vessel by using a 25 kHz ultrasonic system (model VCX 750, Sonics & Materials, Inc., USA), at a maximum nominal power output of 750W. All measurements were carried out in triplicate. The results were analysed statistically using the Minitab 16 Program to determine the average value and standard error. Variance analysis, with a significant level of $\alpha=0.05\%$ was performed to determine the effect of time, temperature, microwave power and ultrasound amplitude on polyphenols content and antioxidant activity. Total phenol were determined spectrophotometrically by Folin-Ciocalteu method at 765 nm (Hewlett-Packard spectrophotometer model 8452A, Rockville). The antioxidant activity evaluated with the DPPH test spectrophotometrically at 517 nm.

Results and Discussion: These results showed that polyphenol content is increased with increasing the time, temperature, ultrasound amplitude and microwave power of extraction. By increasing temperature to 80°C, time to 45 min, ultrasound amplitude from 40 to 80 and microwave power from 300 to 600, polyphenol content and antioxidant activity was increased and after that was constant. These results showed that, H.R.E require long extraction time and have low efficiency. Polyphenol compounds are thermally unstable and maybe degraded in thermal processing. Also, the best method for extraction was MAE, because of higher yield, higher contents of polyphenol and shortend time and this method was very efficient in the extraction of polyphenol compounds. The efficiency of extraction by UAE method is higher than HRE and lower than MAE method.

Conclusion: UAE method compared to HRE method is enhanced the extraction of polyphenol, facilitating solvent penetration and increase the product releasing from intracellular. This method agitated the solvent to material and

1- PhD student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Agriculture Faculty and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

2, 4- Professor and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad.

3- Associate Professor, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST)

(*-Corresponding Author Email: Niloofar1373@yahoo.com)

increased the contact surface between material and solven, and penetration of solvent in to the green tea leaves. UAE canbe carried out at a lower temperature than HRE and decreased thermal damage.

Keyword: Antioxidant Activity, Green tea, Heat Reflux Extraction(HRE), Microwave Assisted Extraction(MAE), Polyphenol compounds, Ultasound Assisted Extraction(UAE).

Archive of SID