# استخراج ترکیبات فنولی به وسیله آب مادون بحرانی از میوه زرشک بی‌دانه و بررسی خواص ضداکسایشی عصاره‌های استخراج شده

مرتضی محمدی[۱] *، عبدالمجید مسکوکی[۱]، سیدعلی مرتضوی[۲]، آرش کوچکی[۲]، منیره نهاردانی[۳]، زهرا پورفلاح[۳]

۱- گروه فرآوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.
۲- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، گروه علوم و صنایع غذایی، سبزوار، ایران.
**(تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۸)**

## چکیده

ضداکسایندهها در صنایع غذایی از گستره کاربرد وسیعی برخوردار می‌باشند. از این رو و از طرف دیگر به خاطر افزایش گرایش عمومی به استفاده از ضداکسایندههای طبیعی، در مطالعه پیش رو عصارههای ضداکسایندهٔ میوه زرشک بی‌دانه به وسیله سیال مادون بحرانی آب در دماهای ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد و تحت فشارهای ۱۰ تا ۵۰ بار، استخراج شده و قدرت رادیکال گیرندگی، احیاکنندگی، پایدارکنندگی روغن خوراکی و محتوای ترکیبات فنولی کل، در روش فولین، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که محتوای ترکیبات فنولی کل در محدوده ۲۰۷۳/۸۱ - ۲۵۵۳/۷۹ میلی‌گرم کالیک اسید در ۱۰۰ گرم ماده خشک زرشک، متغییر بود که بیشترین محتوای ترکیبات فنولی در دمای ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید و با افزایش دما از ۱۶۰ به ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، محتوای ترکیبات فنولی کاهش یافت درحالیکه قدرت رادیکال گیرندگی و پایدارکنندگی محیط روغن همواره با افزایش دما افزایش یافت. بهینه سازی فرآیند استخراج نیز در حالت‌های متفاوتی از دما و فشار، به منظور رسیدن به حداکثر مقدار ترکیبات فنولی و قدرت پایدارکنندگی، قدرت احیاءکنندگی و قدرت رادیکال گیرندگی انجام شد.

**کلید واژگان:** آب مادون بحرانی، زرشک بی‌دانه، ترکیبات فنولی، قدرت ضدرادیکالی، قدرت احیا کنندگی.

* مسئول مکاتبات: mohamadi2003@yahoo.com



Archive of SID
www.SID.ir

## ۱- مقدمه

امروزه با بررسی مطالعات انجام شده بر روی ترکیبات طبیعی سلامتی بخش، مشخص شده که حجم عمده‌ی این تحقیقات بر روی ترکیبات و غذاهای سلامتی‌زا و نگهدارنده‌های طبیعی بوده که با مشاهده اثرات زیان بار بسیاری از افزودنی‌های شیمیایی، این روند شدت گرفته است [۱]. سرطان یکی از مهمترین بیماری‌هایی است که امروزه در اثر مصرف ترکیبات شیمیایی سنتزی به وجود آمده و هرساله باعث مرگ و میر افراد بسیاری در سرتاسر دنیا می‌شود [۲].

رادیکال‌های اکسیژن مهمترین عامل ایجاد بسیاری از ناهنجاری‌های پزشکی از جمله سرطان، تصلب شرائین و بیماری‌های قلبی و عروقی می‌باشند. هر چند ضداکسایندهای سنتزی برای جلوگیری از عمل رادیکال‌های آزاد به کار می‌روند اما در سال‌های اخیر گرایش عمومی به استفاده از ضداکسایندهای طبیعی افزایش یافته است [۳].

میوه‌های کوچک منبع خوبی از ضداکسایندهای طبیعی هستند. عصاره گونه‌های مختلفی از میوه توت سیاه، تمشک، انگور فرنگی و زرشک به عنوان مهارکننده رادیکال‌های آزاد شناخته شده‌اند [۴]. یکی از منابع سرشار ضداکسایندهای طبیعی، گیاه زرشک می‌باشد که تا کنون مطالعات بسیاری بر روی قسمت‌های مختلف این گیاه از جمله ریشه، ساقه، برگ و میوه آن انجام شده است. در طب سنتی عصاره‌های بدست آمده از گونه‌های مختلف این گیاه از جمله بربریس آکوئی‌فولیوم، بربریس وولگاریس و بربریس آریستاتا (*Berberis aquifolium*، *Berberis vulgaris* و *Berberis aristata*)، برای درد مفاصل و التهاب‌های بافتی استفاده می‌شده است [۵]. بررسی ترکیب بندی شیمیایی و خصوصیات ایمنولوژیکی زرشک بی‌دانه نشان داده است که ترکیبات آلکالوئیدی، مهمترین اثرات را دارا می‌باشند [۶]. مطالعات بسیاری نشان داده است که قسمت‌های مختلف گیاه زرشک دارای خصوصیات سلامتی بخش بسیاری از جمله اثرات ضد میکروبی، ضد حساسیت و ضد قارچی بوده و به عنوان داروی تب بر و ضد خارش استفاده شده و منظم کننده ضربان قلب می‌باشد.

استخراج ضداکسایندهها از بافت‌های گیاهی معمولا به وسیله فرآیندهای سنتی استخراج مانند روش‌های استخراج در سیستم جامد – مایع به وسیله متانول، اتانول، استون و آب مقطر انجام می‌شود. اخیرا گرایش به استفاده از تکنولوژی‌های سبز که قادر به افزایش کیفیت و کمیت عصاره‌های استخراجی می‌باشد و همچنین فاقد هرگونه اثرات سوء حلال‌های مورد استفاده در روش‌های سنتی نیز هستند، افزایش یافته است. از این رو استخراج به وسیله سیال فوق بحرانی گاز کربنیک و استخراج به وسیله سیال مادون بحرانی آب، مورد توجه قرار گرفته است [۷].

استخراج به وسیله سیال مادون بحرانی آب، روشی است که در آن از آب داغ، تحت فشارهای مورد نیاز برای باقی ماندن آب در فاز مایع استفاده می‌شود. که در این حالت خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب دچار تغییر می‌شود [۸]. آب در محدوده دمایی ۱۰۰ تا ۳۷۴ درجه سانتی‌گراد و تحت فشار مورد نیاز برای باقیماندن در فاز مایع، به یک سیال مادون بحرانی تبدیل می‌شود [۹]. تحت این شرایط باندهای هیدروژنی ضعیف و سست شده، قطبیت آب به میزان قابل توجهی کاهش یافته و ثابت یونیزاسیون آب ($K_w$) افزایش می‌یابد [۱۰و۱۱]. آب مادون بحرانی نشان داده است که قابلیت استخراج انتخابی ترکیبات با قطبیت متفاوت را دارا می‌باشد به طوری که ترکیبات با قطبیت بیشتر در دماهای پایین و ترکیبات دارای قطبیت کم، در دماهای بالا استخراج می‌شوند. این خصوصیت استخراج به وسیله سیال مادون بحرانی آب، شرایط رسیدن به حداکثر قدرت ضداکسایندگی با تغییر شرایط فرآیند را فراهم می‌آورد [۱۲و۱۳].

هدف از انجام این پژوهش بررسی مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده از میوه زرشک بی دانه و همچنین سنجش قدرت ضداکسایندگی عصاره‌های حاصله به وسیله سیال مادون بحرانی آب بود.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد اولیه

میوه زرشک بی‌دانه به عنوان ماده اولیه اصلی برای استخراج ضداکسایندهه، از گیاهان کشت شده در باغات اصلاح نژاد پارک علم و فناوری خراسان تهیه و تحت شرایط مناسب (به دور از نور



Archive of SID

www.SID.ir

و حرارت و در سایه) خشک و تا زمان مصرف، درون ظرف‌های دربدار آلومینیومی در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد. در هنگام استخراج، نمونه‌ها توسط آسیاب آزمایشگاهی (Tos Shekan T8300) خرد شده و مورد استفاده قرار گرفتند.

## ۲-۲- استخراج با استفاده از آب مادون بحرانی

عصاره‌گیری از میوه زرشک بی‌دانه توسط دستگاه استخراج مادون بحرانی آب، طراحی و ساخته شده در آزمایشگاه فن‌آوری‌های نوین پژوهشکده علوم و صنایع غذایی (RIFST[1]) انجام گرفت. در این روش، فرآیند استخراج در دامنه دمایی ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد) و در نسبت اختلاط ثابت ۱:۳۰ (یک واحد میوه زرشک بی‌دانه در برابر ۳۰ واحد آب مقطر)، در فشارهای ۱۰ تا ۵۰ بار و در مدت زمان ۳۰ دقیقه صورت گرفت. دمای مورد نظر به وسیله المنت‌های الکتریکی تأمین و توسط کنترل کننده دما (Digital Thermocontroller, Abtin Mfg Eng CO, Iran) کنترل شد. فشار مورد نظر نیز توسط پمپ آب (Comet Type: MTP Ax 2/70 m) تأمین شد.

## ۲-۳- اندازه‌گیری محتوای ترکیبات فنولی کل به روش فولین سیوکالتو[2]

غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ و ۳۰ و ۴۰ و ۵۰ و ۶۰ میلی گرم بر لیتر از اسید گالیک در آب مقطر تهیه و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از هر غلظت به لوله‌های آزمایش منتقل و ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو ده بار رقیق شده در آب مقطر، به لوله‌ها منتقل و در نهایت ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵٪ اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. در پایان جذب نمونه، در سل‌های ۱ سانتی‌متری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-Visible Shimadzu–Recording) در طول موج ۷۶۵ نانو متر قرائت گردید. برای نمونه شاهد از ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد [۱۴]. بعد از ترسیم معادله درجه بندی، غلظت مناسبی از عصاره‌ها به صورتیکه جذب محلول نهایی در رنج نمودار استاندارد ترسیم شده باشد، تهیه و مطابق روش فوق، مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره‌ها بر مبنای میلی‌گرم کالیک اسید در ۱۰۰ گرم ماده خشک زرشک، محاسبه گردید.

## ۲-۴- اندازه‌گیری قدرت حذف رادیکال

قدرت ضدرادیکالی عصاره‌های استخراجی و ضداکسایندهها، با استفاده از روش توصیف شده توسط برند – ویلیامس و همکاران، با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد. در این روش ۰/۰۰۲ گرم از DPPH در ۵۰ میلی‌لیتر متانول حل شد بطوریکه جذب محلول حاصل در طول موج ۵۱۷ نانومتر، بین ۰/۹ – ۱ باشد. ۰/۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌های ضداکسایندگی به همراه ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول DPPH در لوله‌های آزمایش دربدار و فویل پیچ شده، ریخته به طوریکه حجم نهایی ۴ میلی‌لیتر باشد. پس از قرار دادن لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در مکانی تاریک و دمای محیط، جذب محلول نهایی در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید. در دستگاه اسپکتروفتومتر در برابر نمونه‌ها، از متانول به عنوان شاهد استفاده شد. جذب‌های بدست آمده با استفاده از فرمول زیر به درصد توانایی جذب رادیکال[3] تبدیل و در ترسیم منحنی‌های رادیکال گیرندگی استفاده شدند [۱۵].

(۱)

$$RSA\% = \frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}} \times 100$$

برای مقایسه قدرت ضدرادیکالی عصاره‌های ضداکسایندهه، از فاکتور $IC_{50}$ که برابر است با غلظت موثر برای جذب ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد موجود در محیط، استفاده شد.

## ۲-۵- تعیین قدرت احیا کنندگی آهن

ابتدا غلظت‌های مختلفی از هر عصاره تهیه و ۲/۵ میلی‌لیتر از هر غلظت به لوله‌های آزمایش دربدار منتقل و سپس ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۲ مولار و pH=۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید ۱٪ تهیه شده در آب مقطر، به لوله‌ها اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از آن لوله‌ها بلافاصله سرد و ۲/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک‌اسید ۱۰٪ به لوله‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور بر دقیقه، سانتریفوژ شدند (EBA 20–Hettich). در پایان ۵ میلی‌لیتر از لایه بالایی با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر محلول فریک کلراید ۰/۱٪ مخلوط و جذب آن در ۷۰۰ نانومتر قرائت شد [۱۶].

1. Research Institute of Food Science & Technology (RIFST).
2. Folin Ciocalteo
3. Radical Scavenging Ability (RSA %)



Archive of SID
www.SID.ir

نتایج به غلظت موثر[4] در احیاکنندگی آهن تبدیل و به منظور مقایسه از معیار $EC_{50}$ استفاده شد. $EC_{50}$ برابر است با غلظتی از ضداکسایینده که قادر است۵۰٪ از آهن سه ظرفیتی موجود در محیط را به آهن دو ظرفیتی تبدیل کند.

### ۲-۶- آزمون رنسیمت

به منظور پایداری اکسایش روغن از دستگاه رنسیمت (Metrohm 743) استفاده شد. در این روش از شرایط تشدید شده اکسایش مانند دمای بالا و جریان هوا استفاده می‌شود. اکسایش نمونه ها در ظروف مخصوص و در محفظه مجهز به گرم کن انجام می‌گیرد. در این حال جریانی از هوا از محل واکنش اکسایش به ظرف محتوی آب هدایت و ضریب هدایت الکتریکی آب بر حسب میکروزیمنس بر سانتیمتر (µs/cm) محاسبه می‌گردد. افزایش هدایت الکتریکی آب به عنوان شاخصی از پیشرفت اکسایش در نظر گرفته می‌شود.

روش کار به این صورت بود که غلظت ثابت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، از پودر عصاره‌ها در آب، به کمک ماده حد واسط پروپیلن گلایکول که در صنعت روغن، به منظور توزیع BHT در روغن کاربرد دارد، در روغن سویای تصفیه، بوگیری و رنگبری شده بدون ضداکسایینده، تهیه و ۴ گرم از نمونه آماده شده به درون لوله‌های مخصوص دستگاه منتقل شد. پس از آن لوله‌ها در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد و با شدت جریان هوای ۲۰ لیتر بر ساعت، درون دستگاه قرار گرفتند. زمان لازم برای رسیدن روغن به شرایط اکسید شده، بر حسب ساعت، تحت عنوان دوره القا[5] بیان گردید [۱۷]. نتایج مربوط به دوره القا به وسیله فرمول زیر به فاکتور $P_f$ تبدیل شدند:

(۲)

$$P_f = \frac{IP_{antioxidant}}{IP_{control}}$$

که در آن $IP_{antioxidant}$ و $IP_{control}$ به ترتیب دوره القا روغن حاوی ضداکسایینده و نمونه شاهد می‌باشد [۱۸].

### ۲-۷- طرح آزمایش و تحلیل آماری

روش شناسی سطح پاسخ (RSM)، با استفاده از یک طرح چرخش پذیر مرکب مرکزی برای ارزیابی پارامترهای ثابت مطالعه، دما ($x_1$) و فشار ($x_2$) استخراج، بر روی مقدار ترکیبات فنولی کل (TPC)، قدرت رادیکال گیرندگی ($IC_{50}$)، قدرت احیاکنندگی ($EC_{50}$) و قدرت پایدارکنندگی محیط روغن خوراکی ($P_f$) عصاره‌ها، به عنوان پارامترهای متغیر، مورد استفاده قرار گرفت. توابع پاسخ (Y) در مورد پارامترهای اندازه گیری شده با استفاده از یک چند جمله‌ای ساده (معادله ۴) و چند جمله ای درجه دوم ( معادله ۵) مورد بررسی قرار گرفتند.

(۳)

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1.x_2$$

(۴)

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1.x_2$$

که در آنها (معادله‌های ۴ و۵)، $b_0$، عرض از مبدا، $b_1$ و $b_2$، ضرایب اثرات اصلی، $b_{11}$ و $b_{22}$، ضرایب اثرات درجه دوم و $b_{12}$، ضریب اثر متقابل متغیرهای ثابت مطالعه می‌باشند. آنالیز آماری توسط نرم افزار Design Expert نسخه 6.0.2 صورت گرفت.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- انتخاب مدل

مدل چند جمله ای ساده در مورد قدرت پایدارکنندگی روغن خوراکی و مدل چند جمله‌ای درجه دوم در مورد مقدار ترکیبات فنولی کل، قدرت رادیکال گیرندگی و قدرت احیاکنندگی، در برازش داده‌ها نسبت به سایر مدل‌های پیشنهادی، اختلاف معنی-داری داشتند ($P<0.01$، جدول ۱). مدل مناسب با توجه به معنی دار بودن آزمون F ($P<0.01$) و معنی دار نبودن مقدار عدم برازش ($P>0.01$) در مورد آن و همچنین مقادیر $R^2$ و $R^2$ اصلاح شده و ضریب تغییرات انتخاب شد. با توجه به جدول ۲ و مقادیر بالای $R^2$، شاهد برازش مناسب داده‌ها توسط مدل‌های انتخابی بودیم. مقدار $R^2$، برای مقدار ترکیبات فنولی کل، قدرت رادیکال گیرندگی، قدرت پایدارکنندگی محیط روغن خوراکی و قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها به ترتیب ۰/۹۰، ۰/۹۹، ۰/۹۹، ۰/۹۱، بود. ضریب تغییرات بسیار پایین نیز دلیل دیگری بر این مدعاست که مدل‌ها، برازش مناسبی از داده‌ها داشتند. پارامترهای موثر در

1. Efficient Concentration
2. Induction Period



Archive of SID
www.SID.ir

مدل‌های بدست آمده با توجه به آنالیز واریانس انجام شده و جدول آنالز واریانس انتخاب و در مدل نهایی جایگذاری شدند.

**جدول ۱** انتخاب مدل برای مقدار ترکیبات فنولی کل، قدرت رادیکال گیرندگی، قدرت پایدارکنندگی و قدرت احیاکنندگی

| مدل‌ها | TPC | | $IC_{50}$ | | Pf | | $EC_{50}$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | مجموع مربعات | سطح احتمال | مجموع مربعات | سطح احتمال | مجموع مربعات | سطح احتمال | مجموع مربعات | سطح احتمال |
| عرض از مبدا | ۶۹۳۰۹۳۲۳ | | $۹/۵۷\times۱۰^{۷}$ | | ۶۴۲/۵۴ | | $۱/۴۳\times۱۰^{۶}$ | |
| مدل خطی | ۴۷۷۳۹/۶۷ | ۰/۲۵ | ۵۱۲۷۳۲ | ۰/۰۰۱ | ۵/۵۰ | ۰/۰۰۰۱> | ۳۵۴۳/۲۶ | ۰/۱۶ |
| ای‌چندجمله | ۲۹۰۱/۸۷ | ۰/۶۸ | ۵۴۲۵۹/۸۸ | ۰/۰۷ | ۰/۰۷ | ۰/۰۰۵ | ۹/۵۷ | ۰/۹۲ |
| ای درجه دوم‌چندجمله | ۱۲۷۲۶۲/۱ | ۰/۰۰۰۸ | ۱۰۹۲۱۹ | ۰/۰۰۰۱> | ۰/۰۲ | ۰/۱۵ | ۶۸۲۵/۴۸ | ۰/۰۰۱ |
| ای درجه سوم‌چندجمله | ۵۹۷/۷۰ | ۰/۹۲ | ۴۴/۳۹ | ۰/۹۸ | ۰/۰۰۸ | ۰/۹۳ | ۵۷/۶۳ | ۰/۸۷ |
| باقیمانده | ۱۸۳۰۵/۰۴ | | ۷۱۴۹/۸۲ | | ۰/۰۳ | | ۱۰۰۴/۹۸ | |
| کل | $۶/۹۵\times۱۰^{۷}$ | | $۹/۶۴\times۱۰^{۸}$ | | ۶۴۸/۱۶ | | $۱/۴۴\times۱۰^{۶}$ | |

| ضریب تغییرات | $R^2$-adj | $R^2$ | مجموع | خطای خالص | فقدان برازش | باقیمانده | اثر متقابل | پارامتر درجه دوم | | پارامتر خطی | | عرض از مبدا | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | $b_{12}$ | $b_{22}$ | $b_{11}$ | $b_2$ | $b_1$ | | | |
| | | | ۱۲ | ۴ | ۳ | ۷ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | درجه آزادی | ۵ | |
| ۲/۲۵ | ۰/۸۳ | ۰/۹۰ | ۱۹۶۸۰۶/۴ | ۱۰۷۶۴/۰۹ | ۸۱۳۸/۶۴ | ۱۸۹۰۲/۷۳ | – | −۰/۴۱ | −۰/۲۱ | – | ۶۸/۱۴ | ضریب | −۲۷۷۱/۶۱ | TPC |
| | | | | | | | – | ۷۲۷۷۰/۶۹ | ۱۰۱۵۰۴/۵ | – | ۴۵۲۹۷/۴۱ | مجموع مربعات | ۱۷۷۹۰۳/۷ | |
| | | | | | ۰/۴۸ | | – | ۰/۰۰۱۳ | ۰/۰۰۰۵ | – | ۰/۰۰۴۶ | سطح احتمال | ۰/۰۰۱۹ | |
| ۱/۱۸ | ۰/۹۸ | ۰/۹۹ | ۶۸۳۴۰۵/۱ | ۲۴۳۲/۴۵ | ۴۷۶۱/۷۶ | ۷۱۹۴/۲۱ | −۰/۱۹ | ۰/۳۴ | ۰/۰۹ | ۰/۷۷ | −۲۹/۹۲ | ضریب | ۵۵۷۶/۷۴ | $IC_{50}$ |
| | | | | | | | ۵۴۲۵۹/۸۸ | ۵۰۸۱۷/۷۸ | ۱۸۹۲۳/۷۱ | ۱۵۳۵۳۴/۴ | ۳۵۹۱۹۷/۶ | مجموع مربعات | ۶۷۶۲۱۰/۹ | |
| | | | | | ۰/۱۹ | | ۰/۰۰۰۲ | ۰/۰۰۰۲ | ۰/۰۰۴ | ۰/۰۰۰۱> | ۰/۰۰۰۱> | سطح احتمال | ۰/۰۰۰۱> | |
| ۱/۰۲ | ۰/۹۹ | ۰/۹۹ | ۵/۶۲ | ۰/۰۲ | ۰/۰۲ | ۰/۰۵ | ۰/۰۰۰۲ | | | −۰/۰۵ | ۰/۰۲۳ | ضریب | ۳/۹۵ | $P_f$ |
| | | | | | | | ۰/۰۷ | | | ۰/۵۶ | ۴/۹۴ | مجموع مربعات | ۵/۵۷ | |
| | | | | | ۰/۰۶ | | ۰/۰۰۵ | | | ۰/۰۰۰۱ | ۰/۰۰۰۱> | سطح احتمال | ۰/۰۰۰۱> | |
| ۳/۷۱ | ۰/۸۴ | ۰/۹۱ | ۱۱۴۴۰/۹۳ | ۳۴۶/۰۰ | ۷۱۶/۶۱ | ۱۰۶۲/۶۲ | - | ۰/۰۸ | −۰/۰۵ | - | ۱۴/۷۱ | ضریب | −۶۱۳/۳۹ | $EC_{50}$ |
| | | | | | | | - | ۳۱۴۸/۶۲ | ۵۹۹۷/۱۱ | - | ۳۰۰۵/۱۱ | مجموع مربعات | ۱۰۳۷۸/۳۱ | |
| | | | | | ۰/۱۸ | | - | ۰/۰۰۲۶ | ۰/۰۰۰۴ | - | ۰/۰۰۳ | سطح احتمال | ۰/۰۰۱۷ | |

**جدول ۲** تجزیه واریانس پارامترهای مقدار ترکیبات فنولی کل، قدرت رادیکال گیرندگی، احیاکنندگی و پایدارکنندگی عصاره‌های استخراجی.



Archive of SID

www.SID.ir

## ۳-۲- مقدار ترکیبات فنولی کل

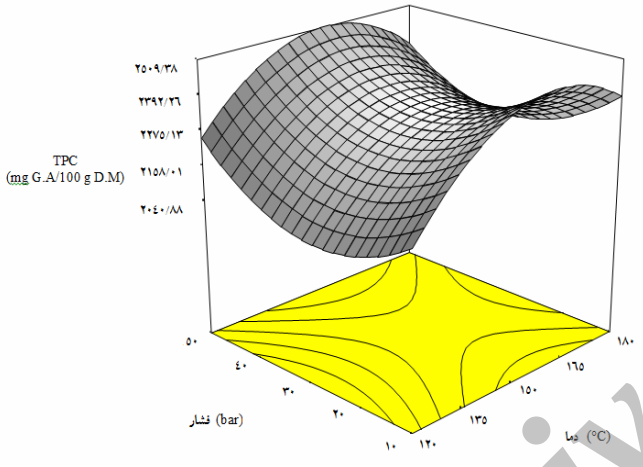
نتایج نشان داد که تغییرات دما هم بصورت خطی و هم بصورت درجه دوم، اثر معنی داری بر تغییرات ترکیبات فنولی داشته است اما تغییرات فشار فقط در حالت درجه دوم اثر معنی داری بر محتوای ترکیبات فنولی داشته است و بصورت خطی و هم چنین اثرمتقابل آن با دما، فاقد اثر معنی دار بر محتوای ترکیبات فنولی بوده است ($\alpha$=۰/۰۱). در نتیجه شکل نهایی مدل برازشی در مورد تغییرات محتوای ترکیبات فنولی بصورت زیر می‌باشد:

(۵)

$$TPC= -2771.61 + 68.41x_1 - 0.21x_1^2 + 0.41\ x_2^2$$

شکل ۱ نشان می‌دهد که افزایش دما از ۱۲۰ تا ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد، در تمامی فشارهای مورد مطالعه، منجر به افزایش محتوای ترکیبات فنولی شده و با افزایش دما از ۱۶۰ به ۱۸۰°C، مقدار ترکیبات فنولی کل دارای روند کاهشی بوده است. افزایش دما تا ۱۶۰°C به دلیل کاهش همواره قطبیت حلال منجر به افزایش قدرت سیال آب مادون بحرانی در استخراج ترکیبات غیرقطبی‌تر موجود در محیط فرآیند، از جمله ترکیبات فنولی موجود در میوه زرشک بی‌دانه می‌شود اما افزایش دما از ۱۶۰ به ۱۸۰°C به دلیل از هم‌گسیختگی دمایی ترکیبات استخراجی، علیرغم افزایش خاصیت غیرقطبی حلال، باعث کاهش محتوای ترکیبات فنولی گردید [۱۹].

بررسی روند تغییرات فشار نشان داد که افزایش فشار از ۱۰ تا ۳۰ بار منجر به کاهش محتوای ترکیبات فنولی شد و با افزایش فشار از ۳۰ تا ۵۰ بار، مقدار ترکیبات فنولی استخراجی افزایش داشته است. به نظر می‌رسد افزایش فشار باعث استخراج ترکیبات غیر موثر در تست اندازه گیری ترکیبات فنولی شده است. میزوسو و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که مقدار ترکیبات فنولی کل، با افزایش دما از ۱۰۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد دارای روندی مشابه با روند مشاهده شده در این مطالعه بوده است. بدین صورت که با افزایش دما، بیشترین مقدار ترکیبات فنولی در دمای ۱۵۰°C بدست آمد و با افزایش دما تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد از میزان ترکیبات فنولی کل کاسته شد. این درحالی بود که خاصیت ضداکسایندگی عصاره‌های استخراجی در این دامنه دمایی (۱۰۰ تا ۱۸۰°C) دارای روند افزایشی بوده است [۷]. کاکاکه[1] در سال ۲۰۰۶ نیز نشان داد که ترکیبات فنولی بیشتری از پوست بذرک در دمای ۱۴۰ نسبت به دمای ۱۶۰°C، با استفاده از روش سیال مادون بحرانی آب بدست می‌آید [۲۰]. مقایسه نتایج مربوط به مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده از میوه زرشک بی‌دانه که به وسیله آب در روش خیساندن عصاره گیری شده بود، ۱۰۰۰ میلی‌گرم در صد گرم گزارش شده است که در مقایسه با نتایج این مطالعه از مقدار کمتری برخوردار بوده است که نشان از کارآمد بودن روش استخراج به وسیله آب مادون بحرانی دارد با توجه به اینکه زمان فرآیند، نسبت به روش‌های سنتی استخراج بسیار کوتاه می‌باشد [۲۱].




**شکل 1** تغییرات مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره های استخراجی با تغییر دما و فشار.

## ۳-۳- قدرت رادیکال گیرندگی

رادیکال آزاد DPPH، یک رادیکال نیتروژن دار آلی پایدار می‌باشد که به صورت تجاری در دسترس بوده و دارای رنگ بنفش پر رنگ است. جدول ۱ نشان داد که مدل چند جمله‌ای درجه دوم در برازش داده‌های مربوط به قدرت رادیکال گیرندگی، که توسط فاکتور $IC_{50}$ اندازه‌گیری شد، اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر مدل‌ها داشته است ($P<0.01$). بررسی‌های اولیه بر روی جملات موجود در مدل مذکور، نشان داد که تمامی جملات دارای اثر معنی‌داری در تغییرات مقدار $IC_{50}$ بوده‌اند ($P<0.01$). از این رو شکل نهایی مدل بصورت زیر قابل تعریف می‌باشد:

(۶)

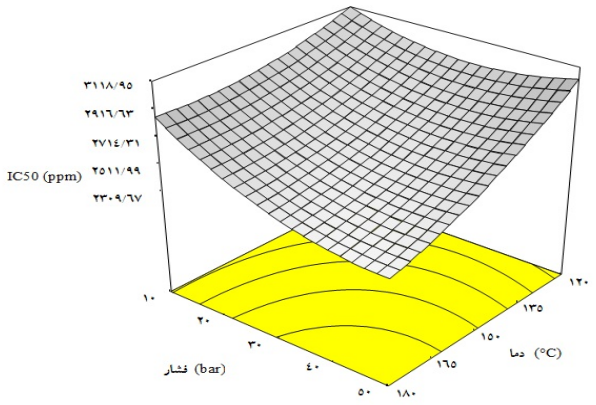
1. Cacace



Archive of SID
www.SID.ir

$$IC_{50}= 5576.54 - 29.92x_1 + 0.77x_2 + 0.09x_1^2 + 0.34x_2^2 - 0.19x_1.x_2$$

قدرت ضدرادیکالی عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف به RSA% یا قابلیت روبش رادیکال آزاد تبدیل و به وسیله فاکتور $IC_{50}$ که برابر است با غلظت موثر در روبش ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد موجود در محیط، مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش دما از ۱۲۰ به ۱۸۰°C، در تمامی فشارهای مورد مطالعه، قدرت رادیکال گیرندگی عصاره‌ها افزایش داشته است (به عبارت دیگر $IC_{50}$ کاهش یافت). افزایش دما علاوه بر کاهش قطبیت حلال و در نتیجه افزایش قدرت آن برای استخراج ترکیبات ضداکسایندگی باعث افزایش ثابت یونیزاسیون آب مادون بحرانی شده و در نهایت منجر به افزایش قدرت رادیکال گیرندگی عصاره‌ها می‌گردد [۱۱]. افزایش قدرت رادیکال گیرندگی در فشارهای بالا نسبت به فشارهای پایین از شدت بیشتری برخوردار بوده است. زیرا افزایش فشار باعث افزایش نفوذ حلال شده و اثر توأم افزایش دما و فشار منجر به شیب بیشتر منحنی در این حالت گردید. بررسی روند تغییرات فشار نشان داد که هم‌پوشانی مناسبی میان نتایج قدرت رادیکال گیرندگی در روند تغییرات دما و فشار وجود داشته است بصورتیکه قدرت رادیکال گیرندگی با افزایش فشار، افزایش داشته است که مقدار این افزایش در دماهای بالا نسبت به دماهای پایین از شدت بیشتری برخوردار بوده است. نکته‌ای که بایستی مورد توجه قرار گیرد این است که استخراج عصاره‌های ضداکسایندگی در دماهای بالا که در روش سیال مادون بحرانی از آن بهره گرفته می‌شود، لزوما منجر به کاهش خاصیت ضداکسایندگی ترکیبات استخراجی نخواهد شد، هرچند ممکن است مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده در دماهای بالا کاهش داشته باشد [۷].




**شکل ۲** تغییرات مقدار قدرت رادیکال گیرندگی عصاره های استخراجی با تغییر دما و فشار.

## ۳-۴- بررسی قدرت احیاکنندگی

با توجه به تجزیه و تحلیل انجام شده بر روی اطلاعات بدست آمده از تغییرات قدرت احیاکنندگی، مشخص گردید که اثر اصلی فشار و اثرمتقابل فشار و دما، اثر معنی داری بر تغییرات قدرت احیاکنندگی نداشته و از مدل نهایی حذف شدند و بیشترین اثر معنی دار بر مقدار $EC_{50}$ عصاره‌های استخراجی، به پارامتر درجه دوم دما مربوط بود و شکل نهایی مدل بصورت زیر ارائه گردید: (۷)

$$EC_{50}= -613.39 + 14.41x_1 - 0.05x_1^2 + 0.08x_2^2$$

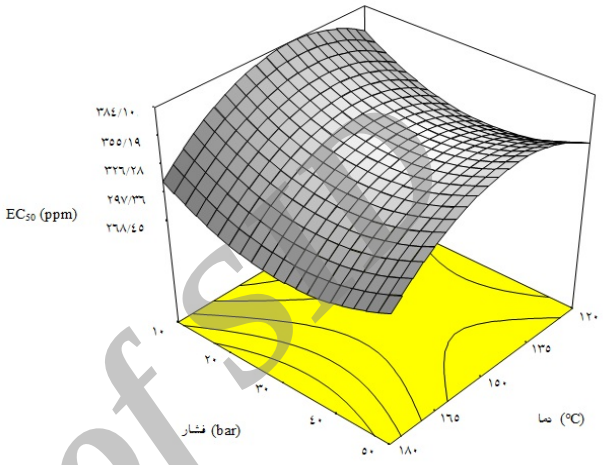
قدرت احیاکنندگی عصاره‌های استخراجی با تغییرات فشار از ۱۰ به ۳۰ بار، منجر به افزایش قدرت احیاکنندگی و از ۳۰ به ۵۰ بار، باعث کاهش قدرت احیاکنندگی شد. این روند در تمامی دماهای موردمطالعه مشاهده گردید. به نظر می‌رسد افزایش فشار تا ۳۰ بار، با افزایش ضریب نفوذ حلال به درون نمونه‌ها منجر به اثر مثبت در قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها شده اما با افزایش فشار تا ۵۰ بار و افزایش بیشتر ضریب نفوذ آب، قدرت حلال در استخراج ترکیبات غیر موثر در احیاکنندگی افزایش یافته و در نتیجه باعث افزایش مقدار $EC_{50}$ شده است. قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها با افزایش دما تا ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، کاهش یافت و با افزایش دما تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، مجددا قدرت احیاکنندگی افزایش پیدا کرد. به نظر می‌رسد با افزایش دما قطبیت حلال کاهش یافته و در نتیجه قدرت حلال برای استخراج ترکیبات غیر قطبی بیشتر می‌شود. این ترکیبات به دلیل تقارن مولکولی به



Archive of SID

www.SID.ir

سختی در واکنش‌های اکسایش-کاهش یون آهن سه ظرفیتی شرکت نموده و در نتیجه قدرت احیاکنندگی کاهش می‌یابد، اما با افزایش دما از ۱۵۰ به ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد و از هم‌گسیختگی این ترکیبات حجیم به ترکیبات کوچکتر، تقارن مولکولی کاهش یافته و به آسانی در واکنش احیا آهن سه ظرفیتی شرکت می‌کنند.




**شکل ۳** تغییرات قدرت احیاکنندگی عصاره‌های استخراجی با تغییر دما و فشار.

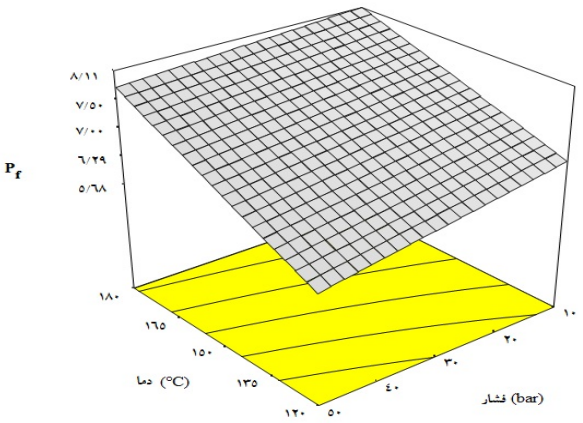
## ۳-۵- قدرت پایدارکنندگی محیط روغن خوراکی

مدل چندجمله‌ای ساده، بهترین پیش‌بینی را از تغییرات قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراجی، نسبت به سایر مدل‌های مورد بررسی داشت. این مدل که فاقد پارامترهای درجه دوم می‌باشد، با توجه به اینکه پارامترهای اثرات اصلی دما و فشار و همچنین اثرمتقابل دما و فشار معنی دار بوده است بصورت زیر قابل تعریف می‌باشد:

(۸)

$$P_f = 3.95 + 0.02x_1 - 0.05x_2 - 2\times10^{-4}x_1.x_2$$

شکل ۴ نمودار سه بعدی سطح پاسخ دمای استخراج (بر حسب درجه سانتی‌گراد) در برابر فشار (بر حسب بار) را برای قدرت پایدارکنندگی محیط روغن سویا نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌گردد با افزایش فشار از ۱۰ به ۵۰ بار، در تمامی دماهای مورد مطالعه، علیرغم اینکه افزایش فشار موجب افزایش ضریب نفوذ حلال شده است، اما به خاطر استخراج ترکیبات غیر موثر در قدرت پایدارکنندگی، ضریب $P_f$ کاهش یافته است هرچند که میزان این کاهش نسبت به روند تغییرات ضریب پایدارکنندگی با دما، زیاد نبوده است. شکل ۴ همچنین نشان می‌دهد که افزایش دما نیز در تمامی فشارهای مورد مطالعه، ضریب پایدارکنندگی محیط روغن سویای غنی شده به وسیله عصاره‌های ضداکسایندگی استخراج شده از میوه زرشک بی‌دانه را افزایش داده است.




**شکل ۴** تغییرات قدرت پایدارکنندگی عصاره های استخراجی با تغییر دما و فشار.

جدول ۳ بهینه سازی فرآیند استخراج عصاره‌های ضداکسایندگی میوه زرشک بی‌دانه برای رسیدن به حداکثر مقدار ترکیبات فنولی کل و حداکثر قدرت رادیکال گیرندگی، احیاکنندگی و پایدارکنندگی در شرایط مختلف فرآیند استخراج از نظر دما و فشار را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود بیشترین درجه مطلوبیت در اهداف ذکر شده با اعمال دما و فشار زمانی بدست آمد که این دو متغیر در محدوده مطالعه شده قرار داشتند و منجر به انتخاب دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد در فشار ۵۰ بار گردید. اما در مواردیکه دما یا فشار بالا (در محدوده مطالعه شده) از لحاظ تکنیکی و یا اقتصادی مقرون به صرفه نباشد می‌توان از سایر شرایط بهینه سازی استفاده نمود. در اینصورت در جایی که تامین فشار بالا مقدور نباشد ولی رسیدن به دماهای بالا امکان پذیر باشد می‌توان از دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد در فشار ۱۳/۷۸ بار، با درجه مطلوبیت نسبتا مناسبی استفاده نمود.

Archive of SID



www.SID.ir

**جدول ۳** جدول بهینه سازی استخراج در شرایط متفاوت عملیاتی فرآیند به منظور رسیدن به حداکثر مقدار ترکیبات فنولی، قدرت رادیکال گیرندگی، احیاکنندگی و پایدارکنندگی محیط روغن خوراکی.

| | دما (°C) | فشار (بار) | TPC (mg G.A/100 g D.M) | $EC_{50}$ (ppm) | $IC_{50}$ (ppm) | $P_f$ | درجه مطلوبیت |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| تامین دما و فشار حداکثر | ۱۸۰ | ۵۰ | ۲۳۷۳/۳۱ | ۲۹۴/۷۵ | ۲۳۰۹/۶۷ | ۷/۷۷ | ۰/۷۵ |
| تامین دما و فشار حداقل | ۱۶۳/۲۹ | ۲۱/۰۵ | ۲۳۵۲/۲۶ | ۳۲۹/۵۲ | ۲۶۴۲/۰۷ | ۷/۵۴ | ۰/۵۲ |
| تامین دمای حداکثری و فشار حداقلی | ۱۸۰ | ۱۳/۷۸ | ۲۳۲۹/۹۵ | ۲۹۷/۵۳ | ۲۷۶۳/۷۹ | ۸/۰۸ | ۰/۶۹ |
| تامین دمای حداقلی و فشار حداکثری | ۱۶۳ | ۲۱/۰۸ | ۲۳۵۲/۰۳ | ۳۲۹/۴۵ | ۲۶۴۱/۵۲ | ۷/۵۴ | ۰/۵۲ |

## ۴- نتیجه گیری

نتایج نشان داد که مدل‌های چندجمله‌ای ساده و درجه دوم، بهترین برازش را از تغییرات میزان ترکیبات فنولی و خاصیت ضداکسایندگی عصاره‌های استخراج شده از میوه زرشک بی‌دانه به وسیله سیال مادون بحرانی آب داشته‌اند. بیشترین میزان تغییرات ترکیبات فنولی، قدرت ضدرادیکالی، احیاکنندگی و پایدارکنندگی محیط روغن، به تغییرات دما مربوط می‌شد. به گونه‌ای که بیشترین ترکیبات فنولی و قدرت احیاکنندگی در دمای ۱۶۰°C مشاهده گردید اما قدرت ضدرادیکالی همواره با افزایش دما، افزایش داشت.

## ۵- منابع


[1] Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P. and Sakariah, K. K. (2001). Antioxidands activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. Food Chemistry, 73: 285-290.

[2] Motalleb, G., Hanachi, P., Fauziah, O. and Asmah, R. (2008). Effect of Berberis Vulgaris fruit extract on alpha-fetoprotein gene expression and chemical carcinogen metabolizing enzymes activities in hepatocarcinogenesis rats. Iranian Journal of Cancer Prevention, Vol 1 (1): 33-42.

[3] Al-Dabbas M. M., Suganuma, T., Kitahara, K., Xing Hou, D. and Fujii, M. (2006). Cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of Varthemia iphionoides Boiss. Extracts. Journal of Ethnopharmacology, 108: 287-293.

[4] Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A., and Diamantidis, G. (2006). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries Food Chemistry, 102: 777–783.

[5] Musumeci, R., Speciale, A., Costanzo, R., Annino, A., Ragusa, S., Rapisarda, A., Pappalardo, M. S. and Iauk, L. (2003). Berberis aetnensis C. Presl. extracts: antimicrobial properties and interaction with ciprofloxacin. International Journal of Antimicrobial Agents, 22: 48 -53.

[6] Rajaian, H.,Jalaee, J. and Aghajani, A. (2006). Berberis vulgaris as Growth Promoter in Broiler Chickens. International Journal of Poultry Science, 5 (4): 395-397.

[7] Rodrıguez-Meizoso, I., Marin, F. R., Herrero, M., Senorans, F. J., Reglero, G., Cifuentes, A. and Ibanez, E. (2006). Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 4: 11560–1565.

[8] Roudsari, M. H., Chang, P. R., Pegg, R. B. and Tyler, R. T. (2009). Analytical Methods Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. Food Chemistry, 114: 717-726.

[9] Dun Lin, S., Hui Liu, E., Leun Mau, J. (2008). Effect of different brewing methods on




Archive of SID

www.SID.ir

antioxidant properties of steaming green tea. LWT - Food Science and Technology, 41: 1616-1623.

[10] Latawiec, A. E. and Reid, B. J. (2010). Sequential extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons using subcritical water. Chemosphere, 78:1042–1048.

[11] Watchararuji, K., Motonobu, G., Sasaki, M. and Shotipruk, A. (2008). Value-added subcritical water hydrolysate from rice bran and soybean meal. Bio resource Technology, 99: 6207–6213.

[12] Fernandez Perez, M. M., Jimenez Carmona, M. D. and De Castro, L. (2000). An approach to the static–dynamic subcritical water extraction of laurel essential oil: comparison with conventional techniques. Analyst, 125: 481–485.

[13] Basile, A., Jimenez-Carmona, M. M. and Clifford, A. A. (1998). Extraction of rosemary by superheated water. Journal of Agricaltural and Food Chemystry, 46: 5205–5209.

[14] Xu, Q., Tao, W., and Ao, Z. (2002). Antioxidant activity of vinegar melanoidins. Food Chemistry, 102: 841–849.

[15] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berest, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss. Technol, 28: 25-30.

[16] Ingold, K. U. (1968). Inhibation of autoxidation. Adv Chem Ser, 75: 296-305.

[17] Fregaa, N., Mozzona, M. and Lerckerb, G. (1999). Effects of Free Fatty Acids on Oxidative Stability of Vegetable Oil. AOCS, 76: 325–329.

[18] Han, J., Weng, X. and Bi, K. (2010). Antioxidants from a Chinese medicinal herb – Lithospermum erythrorhizon. Food Chemistry, 106: 2–10.

[19] Ibanez, E., Kubatovoa, A., Senorans, F. J., Cavero, S., Reglero, G. and Hawthorne, S. B. (2003). Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from Rosemary Plants. J. Agric. Food Chem., 51: 375-382.

[20] Cacace, J. E. and Mazza, G. (2006). Pressurized low polarity water extraction of lignans from whole flaxseed. Journal of Food Engineering, 77: 1087–1095.

[21] Motalleb, G., Hanachi, P., Kua, S. H., Fauziah, O. and Asmash, R. (2005). Evaluation of phenolic content and total antioxidant activity in berberis vulgaris fruit extract. Journal of Biological Science, 5 (5): 648-653.

Archive of SID



www.SID.ir

# Extraction of phenolic compound from barberry by subcritical water and investigation of antioxidation properties of extracted juices

**Mohamadi, M. [1 *], Maskooki, A. M. [1], Mortazavai, S. A. [2], Kocheci, A. [2], Nahardani, M. [3], Pourfallah, Z. [3]**

1. Food Processing Department, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST).
2. Department of Food Science and Technology, University of Ferdowsi, Mashad, Iran.
3. Graduated Master, Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

**(Received: 92/8/23 Accepted: 92/10/8)**

Antioxidants have a wide range of application in food industry. Beside by attention to rising in universal attitude to use from natural antioxidants, at this study antioxidant extracts of barberry fruits extracted by subcritical water at 120 – 180 °C and 10 – 50 Bar and radical scavenging power, reduction power, stability power of edible oil matrix and amount of Total Phenolic Compounds (TPC) of extracts investigated in Folin method. Results showed that amount of Total Phenolic Compounds changed from 2073.81 until 2553.79 mg Gallic acid per 100 grams of Dry Material (mg G.A/100 g D.M) that maximum of Total Phenolic Compounds, observed at 160 °C and decreased with rising temperature, whereas radical scavenging power and stability power in edible oil of extracts increase with temperature. Optimization of extraction process did at different temperatures and pressures condition for receive to maximum amount of Total Phenolic Compounds, stability power, reduction and radical scavenging.

**Key words:** Subcritical water; Barberry; Phenolic compound; Radical scavenging; Reduction power

* Corresponding Author E-Mail Address: mohamadi2003@yahoo.com



Archive of SID

www.SID.ir