فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، دوره ۵، شماره ۱، صفحه ۶۴-۴۹، پاییز ۱۳۹۶

بهینه‌سازی و بررسی مقایسه‌ای محتوای فنولی ترکیبات زیست فعال استخراج شده از برگ گیاه فیجوا (*Feijoa sellowiana*) به کمک امواج فراصوت

یاسمن پودی[1]، ماندانا بی‌مکر [2*]، علی گنجلو[2]، سهیلا زرین قلمی[2]

1. دانشجو کارشناسی ارشد، فناوری مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان
2. استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

(تاریخ دریافت: 96/2/19، تاریخ بازنگری: 96/3/26، تاریخ پذیرش: 96/3/29)

چکیده

در این پژوهش به‌منظور بررسی، مدل‌سازی و بهینه‌سازی اثر متغیرهای مستقل فرایند استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت شامل شدت امواج فراصوت به میزان 714/00، 1428/50 و 2143/00 W/cm^2، چرخه کاری به میزان 50، 75 و100٪ و دمای استخراج به میزان 30، 45 و 60 °C، بر محتوای فنولی ترکیبات زیست فعال استخراج‌شده از برگ گیاه فیجوا از روش‌شناسی سطح پاسخ بر اساس طرح باکس-بنکن استفاده شد. میزان کل ترکیبات فنولی توسط روش فولین-سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. با استفاده از تجزیه و تحلیل رگرسیون خطی چندگانه، مدل چندجمله‌ای درجه دوم کامل برای میزان کل ترکیبات فنولی به‌دست آمد. با استفاده از تکنیک بهینه‌سازی عددی شرایط بهینه به‌صورت 1749/34 W/cm^2، 86/39٪ و 32/49 °C تعیین شد. فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات فنولی به‌دست‌آمده تحت شرایط بهینه با روش‌های DPPH و ABTS اندازه‌گیری شد. عصاره ترکیبات زیست‌فعال دارای میزان کل ترکیبات فنولی 381/20±0/12 mg GAE/g و فعالیت ضد رادیکالی 0/10 ± 81/43٪ مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و 0/26 ± 86/63٪ مهار رادیکال‌های آزاد ABTS بود. مدل ارائه‌شده برای پیش‌بینی مقدار پاسخ نتیجه بسیار نزدیکی با داده‌های تجربی داشت. تکنیک استخراج با حلال متلاطم جهت بررسی مقایسه‌ای مورد مطالعه قرار گرفت که در این تکنیک تأثیر متغیر شدت دور در دامنه 50-300 rpm بر میزان کل ترکیبات فنولی مطالعه شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، با استفاده از تکنیک حلال متلاطم بالاترین میزان کل ترکیبات فنولی (352/95 ± 0/12 mg GAE/g) در شدت دور 200 rpm به‌دست آمد. ترکیبات به‌دست‌آمده دارای فعالیت ضد رادیکالی 73/33 ±0/16٪ مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و 82/20±0/12% مهار رادیکال‌های آزاد ABTS بودند. با توجه به نتایج بررسی مقایسه‌ای می‌توان بیان نمود که با استفاده از امواج فراصوت امکان دستیابی به ترکیبات زیست فعال فنولی بیش‌تر و فعالیت ضد رادیکالی بالاتر در مدت‌زمان کوتاه‌تری وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: فیجوا، حلال به کمک امواج فراصوت، روش‌شناسی سطح پاسخ، میزان کل ترکیبات فنولی، فعالیت ضدرادیکالی، حلال متلاطم.

* نویسنده مسئول: mandana.bimakr@znu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

1- مقدمه

استرس ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن نقش مهمی در بروز بسیاری از بیماری‌های مزمن و تحلیل برنده مانند بیماری‌های قلبی و عروقی، سرطان، دیابت، پیری و بیماری‌های عصبی ایفا می‌کند [1]. انواع رایج فعال اکسیژن شامل رادیکال سوپر اکسید، هیدروژن پراکسید، رادیکال آزاد هیدروکسیل، اکسیژن تک و نیتریک اکسید، مولکول‌های بسیار واکنش‌پذیر و سمی هستند که به‌طور معمول طی متابولیسم در سلول‌ها ایجاد می‌شوند [2]. این رادیکال‌ها می‌توانند به‌طور مستقیم منجر به جهش DNA، تغییر بیان ژن، پراکسیداسیون چربی و پروتئین شوند. مهار این‌گونه ترکیبات یک اقدام مؤثر برای کاهش استرس اکسیداتیو ایجادشده در سلول‌ها می‌باشد [1]. در سال‌های اخیر علاقه‌مندی به پژوهش درباره ترکیبات زیست فعال به‌خصوص ترکیبات پلی فنولی با منشأ گیاهی (میوه‌ها، سبزی‌ها، غلات و گیاهان) به‌دلیل محدودیت استفاده از ترکیبات ضداکسایش مصنوعی مانند هیدروکسیل آنیزول بوتیلات و هیدروکسی تولوئن بوتیلات در مواد غذایی با توجه به امکان اثرات سوء آن‌ها بر سلامتی انسان به‌طور چشمگیری افزایش‌یافته است [3]. طبق گزارش‌های در دسترس مصرف میوه‌ها و سبزی‌ها به‌طور معکوس با خطر بروز بسیاری از بیماری‌ها مانند بیماری‌های قلبی و عروقی و سرطان در ارتباط می‌باشد. ترکیبات ضداکسایش طبیعی موجود در سبزی‌ها و میوه‌ها نظیر ویتامین‌ها و پلی فنول‌ها مسئول این جنبه سلامت بخشی می‌باشند [1].

ترکیبات فنولی یک گروه مهم از ترکیبات زیست‌فعال هستند و از جمله متابولیک‌های ثانویه می‌باشند که در بخش‌های مختلف گیاهان وجود دارند [1، 4]. این ترکیبات دارای یک حلقه آروماتیک با یک یا چند گروه هیدروکسیل می‌باشند. بسیاری از ترکیبات فنولی ویژگی‌های بیولوژیکی مفیدی مانند فعالیت‌های ضد اکسایشی، ضد میکروبی، ضد سرطانی و ضدالتهابی از خود نشان می‌دهند [5، 6]. در برخی منابع آورده شده است که می‌توان از ترکیبات فنولی گیاهان به‌عنوان نگه‌دارنده مواد غذایی استفاده نمود [7-10]. این دسته از ترکیبات در ویژگی‌های حسی و رنگی میوه‌ها و سبزی‌ها نیز شرکت دارند که مجموع این ویژگی‌ها آن‌ها را برای کاربردهای صنعتی مختلف نظیر استفاده در رنگ‌ها و نگه‌دارنده‌های طبیعی مواد غذایی، کاغذ و مواد آرایشی مناسب می‌سازد [4]. از این‌رو طی سال‌های گذشته تا به امروز توجه زیادی به بررسی محتوای فنولی منابع گیاهی شده است.

فیجوا بانام علمی *Acca sellowiana* متعلق به خانواده موردیان است و ارتباط نزدیکی با گوآوا (*Psidium guajava L.*) دارد [11، 12]. فیجوا بومی آمریکای جنوبی است و در مناطق مرتفع پاراگوئه، برزیل، اروگوئه و آرژانتین رشد می‌کند [13]. این درختچه در سال 1351 از طریق جمهوری آذربایجان وارد ایران شد و در موسسه تحقیقات مرکبات کشور (رامسر) کشت گردید. تنها ناحیه پرورش این درختچه در شمال کشور است [14، 15]. فیجوا گیاهی همیشه سبز با ارتفاع 2- 4 متر، دارای شاخه‌های خاکستری، جوانه‌های بیضوی و گل‌های سفید و قرمز می‌باشد. میوه‌های آن گرد یا تخم‌مرغی با طول 8-3 سانتی‌متر هستند[16، 17]. در سال‌های اخیر علاقه جهانی به این میوه به‌دلیل عطر و طعم منحصربه‌فرد و قابلیت سلامت بخشی، به‌طور چشمگیری افزایش‌یافته است؛ اما طبق مطالعات انجام‌شده تاکنون تحقیقی پیرامون ترکیبات فنولی برگ‌های این گیاه که به‌عنوان ضایعات در نظر گرفته می‌شود صورت نگرفته است.

استخراج یک مرحله بسیار مهم در جداسازی، شناسایی و استفاده از ترکیبات ارزشمند گیاهان مختلف است [18]. روش‌های سنتی استخراج نظیر خیساندن و سوکسله به‌طور معمول زمان‌بر هستند و به مقدار زیادی نمونه، حلال‌های آلی و دمای بالا نیاز دارند و هم‌چنین به‌دلیل استفاده از حلال‌های آلی تأثیرات مخربی بر محیط‌زیست و سلامت انسان دارند [19، 20]. در سال‌های اخیر به‌دلیل خطرات ایمنی، سمیت برخی حلال‌ها بر سلامتی انسان و محیط‌زیست و توجه به بهبود کیفیت محصول نهایی علاقه‌مندی محققان به توسعه روش‌های استخراج دوستدار طبیعت[1] افزایش‌یافته است. چندین روش نوین استخراج مانند استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت[2]، استخراج با حلال به کمک امواج ماکروویو[3]، استخراج با سیال فوق بحرانی[4] و استخراج با حلال

1. Environmental friendly techniques
2. Ultrasound assisted extraction (UAE)
3. Microwave assisted extraction (MAE)
4. Supercritical fluid extraction (SFE)

Arhive of SID

www.SID.ir

تسریع شده[1] به‌منظور استخراج ترکیبات زیست فعال از منابع گیاهی توسعه‌یافته‌اند که به‌عنوان روش‌های دوستدار طبیعت نیز شناخته‌شده‌اند. در بین این روش‌ها استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت یکی از ساده‌ترین، مؤثرترین و ارزان‌ترین روش‌ها است [20، 21]. در مطالعات متعددی از روش استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت جهت جداسازی ترکیبات زیست‌فعال فنولی از منابع گیاهی استفاده‌شده است [22-26].

رسیدن به بهترین تلفیق بین عوامل مؤثر بر فرایند استخراج، همواره یکی از چالش‌های پژوهشگران بوده است و یکی از روش‌های رسیدن به این هدف، استفاده از طرح و روش‌های بهینه‌سازی مانند روش سطح پاسخ است. این روش، مجموعه‌ای از روش‌های ریاضی و آماری است که برای مدل‌سازی و تجزیه و تحلیل مسائلی مورد استفاده قرار می‌گیرد که در آن‌ها پاسخ موردنظر تحت تأثیر چندین متغیر مختلف قرار دارد. هدف از اعمال این روش، یافتن بهترین مجموعه از سطوح متغیرهای موردمطالعه به‌منظور رسیدن به پاسخ مورد مطالعه است [27-29].

با توجه به اطلاعات در دسترس تاکنون مطالعه‌ای درزمینه بررسی و بهینه‌سازی محتوای فنولی ترکیبات زیست‌فعال استخراج‌شده از برگ گیاه فیجوا با استفاده از روش حلال به کمک امواج فراصوت صورت نگرفته است. لذا هدف از انجام این پژوهش بررسی، مدل‌سازی و بهینه‌سازی اثر متغیرهای مستقل فرایند استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت شامل شدت امواج فراصوت، چرخه کاری و دمای استخراج بر میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده با استفاده از روش‌شناسی سطح پاسخ بر اساس طرح باکس-بنکن است. فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات زیست‌فعال به‌دست‌آمده تحت شرایط بهینه مورد ارزیابی قرار گرفت. در ادامه به‌منظور بررسی مقایسه‌ای، اثر تکنیک حلال متلاطم بر میزان کل ترکیبات فنولی و فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات حاصل از برگ گیاه فیجوا انجام پذیرفت. تأثیر متغیر شدت دور بر میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده با استفاده از تکنیک حلال متلاطم موردمطالعه و بررسی قرار گرفت.

1. Accelerated solvent extraction (ASE)

2- مواد و روش‌ها

2-1- آماده‌سازی برگ‌ها

برگ‌های گیاه فیجوا در فصل بهار 1395 از شهرستان رامسر، استان مازندران تهیه شدند. برگ‌های تهیه‌شده با آب تمیز شسته شدند و پس از حذف آب اضافی در آون مدل 25K.J، پارس آزما، ساخت کشور ایران در دمای ^{o}C 40 تا رسیدن به میزان رطوبت (0/15 ± 6/8٪) خشک شدند، برگ‌های خشک‌شده در فریزر ^{o}C 18- نگه‌داری شدند و قبل از انجام آزمایش توسط دستگاه خرد کن مدل GSC-911، ساخت کشور چین خرد شدند و پس از عبور از الک با مش 18 برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. در این پژوهش تمامی موارد مورد استفاده دارای خلوص بالا بوده و از شرکت‌های معتبر مرک و سیگما خریداری شدند.

2-2- استخراج با استفاده از روش حلال متلاطم

جهت استخراج ترکیبات زیست‌فعال فنولی از برگ گیاه فیجوا با استفاده از تکنیک حلال متلاطم ابتدا مقدار g 2/0 از نمونه‌های آماده‌شده را با mL 40 اتانول 99٪ با رعایت نسبت 1 به 20 وزنی/حجمی مخلوط نموده و در دستگاه انکوباتور شیکردار مدل 1Sher-600، نورصنعت، ساخت کشور ایران قرار گرفت. دما و زمان فرایند بر اساس مطالعات اولیه انجام‌شده به‌ترتیب ^{o}C 40 و h 5 در نظر گرفته شد. تأثیر شدت دور در سطوح 50، 100، 150، 200، 250 و rpm 300 بر میزان کل ترکیبات فنولی استخراج شده مورد مطالعه قرار گرفت. پس از به پایان رسیدن زمان فرایند استخراج نمونه به‌دست‌آمده را توسط کاغذ صافی واتمن، شماره 4، صاف نموده و در ادامه به‌منظور حذف حلال مورد استفاده، نمونه در دستگاه تبخیرکننده چرخشی تحت خلاء مدل Buchi Rotavapor R-205 ساخت کشور سوئیس در دمای ^{o}C 45 قرار داده شد. عصاره به‌دست‌آمده تا زمان انجام آزمون‌های مورد نظر در تاریکی و در دمای ^{o}C 18- نگه‌داری گردید. به‌منظور افزایش دقت در نتایج حاصله در این پژوهش برای هر آزمون سه تکرار در نظر گرفته شد.

2-3- استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت

استخراج ترکیبات زیست‌فعال فنولی از برگ گیاه فیجوا با

Arrive of SID

www.SID.ir

حلال به کمک امواج فراصوت با استفاده از دستگاه فراصوت مدل Hielscher ساخت کشور آلمان دارای توان 200 W، فرکانس 24 KHz و مجهز به پروبی با قطر 3 mm از جنس تیتانیوم برای انتشار امواج فراصوت انجام شد. جهت استخراج با این روش ابتدا مقدار 2/0 g از نمونه را با مقدار 40 mL از حلال اتانول (99٪) با رعایت نسبت 1 به 20 وزنی/حجمی مخلوط نموده و از امواج فراصوت با شدت‌های 714/28، 1428/57 و 2142/85 W/cm^2، چرخه کاری 50، 75و100٪ و دامنه دمایی 30، 45 و 60 °C برای استخراج ترکیبات زیست فعال فنولی استفاده گردید. انتخاب سطوح بالا و پایین متغیرهای مستقل مورد مطالعه بر اساس مطالعات اولیه انجام پذیرفت. زمان فرایند استخراج به مدت 30 min در همه تیمارها ثابت بود و به‌منظور کنترل دما طی فرایند از دماسنج استفاده شد. نمونه بعد از تیمار از کاغذ صافی واتمن، شماره 4، عبور داده شد و سپس حذف حلال از نمونه به‌دست‌آمده توسط دستگاه تبخیرکننده چرخشی تحت خلاء مدل Buchi Rotavapor R-205 ساخت کشور سوئیس در دمای 45 °C صورت گرفت. عصاره به‌دست‌آمده تا زمان انجام آزمون‌های موردنظر در تاریکی و در دمای 18- °C نگه‌داری گردید.

2-3-1- محاسبه شدت امواج فراصوت

شدت امواج فراصوت پراکنده‌شده از پروب دستگاه در محیط حلال با استفاده از معادله (1) محاسبه گردید [30].

$$I\left(\frac{W}{cm^2}\right)=\frac{P}{\pi r^2} \quad (1)$$

به صورتی که r قطر پروب (cm) و P توان ورودی دستگاه (W) می‌باشد. در این پژوهش، سطوح توان ورودی 25، 50 و 75% کل توان ورودی دستگاه (200 W) تنظیم گردید که به‌ترتیب معادل مقدار 50/00، 100/00 و 150/00 W می‌باشد. شدت امواج فراصوت مربوطه به‌ترتیب معادل 714/00، 1428/50 و 2143/00 W/cm^2 می‌باشد.

2-3-2- محاسبه چرخه کاری

مدت‌زمان اعمال پالس و فواصل استراحت میان اعمال پالس‌ها به‌ترتیب به‌عنوان زمان‌های روشن و خاموش دستگاه فراصوت در نظر گرفته شد. جهت ترکیدن حباب‌های تشکیل‌شده توسط امواج فراصوت، زمان استراحت در نظر گرفته شد. دوره زمانی اعمال یک پالس به‌علاوه زمان استراحت به‌عنوان یک چرخه کاری[1] تعریف می‌شود. یک چرخه کاری که برحسب درصد بیان می‌شود به‌صورت معادله (2) بیان می‌شود [30].

$$\text{چرخه کاری (درصد)} = \frac{\text{مدت زمان روشن (ثانیه)}}{\text{مدت زمان خاموش (ثانیه)+مدت زمان روشن (ثانیه)}} \times 100 \quad (2)$$

2-4- اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد به روش 2و2- دی فنیل 1- پیکریل هیدرازیل (DPPH·)

بررسی فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH یک روش رایج، سریع و ارزن قیمت به‌منظور تعیین میزان فعالیت ضد رادیکالی است که در این روش با احیای رادیکال‌های آزاد DPPH رنگ محلول از رنگ بنفش به زرد تغییر می‌کند [31]. میزان رنگ‌بری توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول‌موج 517 nm اندازه‌گیری می‌شود. درجه بی‌رنگ شدن بیانگر قدرت مهار رادیکال‌های آزاد توسط ترکیبات ضد رادیکال مربوطه می‌باشد. توانایی به دام انداختن رادیکال‌های آزاد DPPH توسط نمونه‌های به‌دست‌آمده از برگ گیاه فیجوا طبق روش بی مکر و همکاران، با اندکی اصلاحات مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این آزمایش 2 mL از نمونه مورد نظر رقیق‌شده با متانول (غلظت نهایی 0/5 mg/mL) با 2 mL محلول DPPH (0/1 mM) مخلوط شد. پس از 30 min قرار گرفتن مخلوط در محیط تاریک میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل SPECORD 250 ساخت کشور آلمان در طول‌موج 517 nm اندازه‌گیری گردید. قدرت مهار رادیکال‌های DPPH (درصد) با استفاده از معادله (3) محاسبه شد [31].

$$\text{مهار رادیکال آزادDPPH (درصد)} = \frac{A_i - A_t}{A_i} \quad (3)$$

در این رابطه A_i و A_t به‌ترتیب میزان جذب نمونه و میزان جذب محلول DPPH می‌باشند.

1. Duty cycle

Archive of SID

www.SID.ir

2-5- اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد به روش 2و ´2 آزینوبیس (3 - متیل بنزو تیازولین - 6 - سولفونیک اسید) (ABTS˙+)

توانایی مهار رادیکال‌های ABTS˙+ توسط ترکیبات زیست‌فعال به‌دست‌آمده از برگ گیاه فیجوا طبق روش بی‌مکر و همکاران، با اندکی اصلاحات مورد بررسی قرار گرفت. در این روش با رایش رادیکال سبز آبی ABTS˙+ محلولی بی‌رنگ ایجاد می‌شود. شدت کاهش رنگ اندازه‌گیری شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مقدار رادیکال مهار شده توسط ترکیبات ضد رادیکال موجود در نمونه را نشان می‌دهد[32]. جهت تهیه رادیکال ABTS˙+، محلول 7 mM ABTS با پتاسیم پرسولفات 2/45 mM مخلوط شده و به مدت 24 h در تاریکی و در دمای اتاق قرار گرفت. سپس محلول ABTS˙+ تا رسیدن به میزان جذب 0/02 ± 0/700 در طول‌موج 734 nm با اتانول رقیق می‌شود. مقدار 2 mL از محلول ABTS˙+ با 0/1 mL نمونه حاصل از برگ گیاه فیجوا مخلوط شد. بعد از مدت 6 min میزان جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل SPECORD 250 ساخت کشور آلمان در طول موج 734 nm خوانده شد. قدرت مهار رادیکال‌های ABTS˙+ با استفاده از معادله (4) اندازه گیری شد:

$$\text{مهار رادیکال آزاد ABTS}^{\cdot+}\text{ (درصد)} = \frac{A_b - A_s}{A_b} \qquad (4)$$

در این رابطه A_s و A_b به‌ترتیب جذب نمونه و جذب نمونه شاهد می‌باشند.

2-6- اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنولی[1] (TPC)

میزان کل ترکیبات فنولی نمونه‌های به‌دست‌آمده از برگ گیاه فیجوا با استفاده از روش فولین- سیکالتیو مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. این روش بر مبنای رنگ سنجی عمل می‌کند و اساس کار در این روش، احیای معرف فولین سیکالتو توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی‌رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج 765 nm نشان می‌دهد. ترکیبات فنولی کل طبق روش بی مکر و همکاران، با اندکی اصلاحات اندازه‌گیری گردید [18]. از گالیک اسید به‌عنوان استاندارد این آزمون استفاده شد. نتیجه نهایی به‌صورت معادل میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن عصاره (mg GAE/g) بیان شد. در این روش 0/5 mL عصاره با غلظت مشخص به لوله آزمایش منتقل‌شده، سپس 2/5 mL از شناساگر فولین- سیکالتیو، که قبلاً با نسبت 1 به 10 با آب دیونیزه شده رقیق‌شده است، اضافه و مخلوط گردید. مخلوط به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس 2 mL از سدیم‌کربنات 7/5 ٪(وزنی- حجمی) به مخلوط اضافه شده و به آرامی هم زده شد. پس از نگه‌داری مخلوط نهایی به مدت 90 min در دمای اتاق میزان جذب در طول‌موج 765 nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل SPECORD 250 ساخت کشور آلمان ثبت گردید.

2-6-1- رسم منحنی استاندارد گالیک اسید

به‌منظور رسم منحنی استاندارد گالیک اسید جهت بیان میزان کل ترکیبات فنولی به‌صورت معادل میلی‌گرم گالیک اسید برگرم عصاره، ابتدا غلظت‌های 20-80 ppm از گالیک اسید تهیه شد و مطابق با روش ذکرشده محلول‌ها اضافه‌شده و میزان جذب در طول‌موج 765 nm ثبت گردید. معادله خط به‌دست‌آمده با ضریب همبستگی بالا (0/999) به‌صورت $Y = 0/007\ X + 0/255$ بود.

2-7- طرح آزمایشات و تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه جهت بررسی، مدل‌سازی و بهینه‌سازی سه متغیر مستقل استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت شامل شدت امواج فراصوت (X_1)، چرخه کاری (X_2) و دمای فرایند (X_3) بر میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده از برگ گیاه فیجوا از روش‌شناسی سطح پاسخ بر اساس طرح باکس - بنکن استفاده شد. مقادیر کد شده متغیرهای مستقل 1، 0 و 1- بود. در جدول (1) متغیرهای مستقل استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت و مقادیر سطوح آن‌ها آورده شده است. سطوح بالا و پایین متغیرها بر اساس مطالعات اولیه انتخاب گردید. در جدول (2) آزمون‌های موردمطالعه به‌صورت کاملاً تصادفی ارائه‌شده است. در این مطالعه از نمودارهای سه‌بعدی سطح پاسخ به‌منظور نشان دادن تأثیر هم‌زمان دو متغیر مستقل

1. Total Phenolic Content

Archive of SID

www.SID.ir

جدول (1) متغیرهای مستقل فرایند استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت و سطوح آن‌ها

متغیرهای مستقل	متغیرهای مستقل و سطوح مختلف آن‌ها		
	+1	0	-1
شدت امواج فرصوت (X_1، W/cm^2)	2143/00	1428/50	714/00
چرخه کاری (X_2، ٪)	100/00	75/00	50/00
دمای استخراج (X_3، °C)	60/00	45/00	30/00

جدول (2) آزمون‌های تصادفی آزمایش در طرح باکس- بنکن و داده‌های تجربی مرتبط با آن‌ها

آزمون	شدت امواج فراصوت (W/cm^2)	چرخه کاری (%)	دمای استخراج (°C)	محتوای کل ترکیبات فنولی (mg GAE/g)
1	714/00	50/00	45/00	300/10
2	1428/50	75/00	45/00	380/05
3	1428/50	100/00	60/00	340/80
4	714/00	75/00	60/00	353/34
5	1428/50	75/00	45/00	381/20
6	2143/00	100/00	45/00	323/35
7	2143/00	75/00	30/00	380/12
8	714/00	75/00	30/00	310/28
9	1428/50	75/00	45/00	380/00
10	1428/50	50/00	30/00	340/50
11	2143/00	50/00	45/00	361/79
12	1428/50	50/00	60/00	368/33
13	1428/50	75/00	45/00	380/00
14	714/00	100/00	45/00	341/20
15	1428/50	75/00	45/00	379/88
16	2143/00	75/00	60/00	330/36
17	1428/50	100/00	30/00	370/90

روی یک پاسخ درحالی‌که متغیر مستقل دیگر ثابت در نظر گرفته‌شده است استفاده گردید.

در روش‌شناسی سطح پاسخ برای هر پاسخ یک مدل تعریف می‌شود که مقدار پاسخ را می‌توان با استفاده از مدل چندجمله‌ای درجه دوم (رابطه 5) به‌دست آورد.

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^{k}\beta_j X_j + \sum_{j=1}^{k}\beta_{jj} X_j^2 + \sum\sum_{i<j}\beta_{ij} X_i X_j \quad (5)$$

در این رابطه β_0 ضریب ثابت، β_i ضریب خطی، β_{ii} ضریب درجه دوم و β_{ij} ضریب اثرات متقابل و X_i و X_j متغیرهای مستقل موردمطالعه و k تعداد متغیرهای مستقل می‌باشد.

برای تعیین میزان تطابق داده‌ها با مدل به‌دست‌آمده از آزمون فقدان برازش ، ضریب تغییرات، مقادیر ضریب همبستگی R^2، R^2 اصلاح شده استفاده شد و عدد p در سطح اطمینان 95% موردبررسی قرار گرفت. سپس، برای تعیین شرایط بهینه از تکنیک بهینه‌سازی عددی باهدف به حداکثر رساندن میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده از برگ گیاه فیجوا استفاده شد. از نرم‌افزار(Design Expert 7.0.3 (Minneapolis, USA

Arhive of SID

www.SID.ir

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارهای سه‌بعدی استفاده گردید. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح اطمینان 95 درصد انجام شد.

3- نتایج و بحث

3-1- مدل‌سازی فرایند استخراج ترکیبات فنولی با حلال به کمک امواج فراصوت

آزمون‌های تصادفی آزمایش در طرح باکس-بنکن و داده‌های تجربی مرتبط با میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده در جدول (2) ارائه شده است. هم‌چنین، نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مدل سطح پاسخ پیش‌بینی‌شده برای میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده از برگ گیاه فیجوا با حلال به کمک امواج فراصوت در جدول (3) نشان داده‌شده است. میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده از برگ گیاه فیجوا در دامنه 300/10 - 381/20 mg GAE/g می‌باشد. مدل چندجمله‌ای درجه دوم کامل پیشنهادی دارای مقدار معنی‌دار آزمون فقدان برازش ($p> 0/05$) و هم‌چنین مقادیر بالای R^2 (0/9996) و R^2 اصلاح شده (0/9990) می‌باشد که نشان‌دهنده مناسب بودن

جدول (3) نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مدل سطح پاسخ به‌دست آمده برای میزان کل ترکیبات فنولی استخراج شده از برگ گیاه فیجوا با حلال به کمک امواج فراصوت

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	ضریب رگرسیون	مقادیر F	مقادیر p
مدل	9	11503/96	380/23	1863/99	>0/0001
خطی	3				
X_1	1	1028/31	11/34	1499/56	>0/0001
X_2	1	3/82	0/69	5/57	0/0490
X_3	1	10/06	-1/12	14/67	0/0065
درجه دوم	3				
X_{12}	1	3817/76	-30/11	5567/34	>0/0001
X_{22}	1	1441/71	-18/50	2102/42	>0/0001
X_{32}	1	182/81	-6/59	266/59	>0/0001
برهمکنش	3				
XX_{12}	1	1581/65	-19/89	2306/48	>0/0001
XX_{13}	1	2153/89	-23/21	3140/96	>0/0001
XX_{23}	1	838/97	-14/48	1223/45	>0/0001
مانده ها	7	4/80			
فقدان برازش	3	3/60		3/99	0/1072
خطای خالص	4	1/20			
کل	16	11508/76			
میانگین		354/25			
انحراف معیار		0/83			
C.V.%		0/23			
R^2		0/9996			
Adj R^2		0/9990			
Pred R^2		0/9948			

Archive of SID

www.SID.ir

مدل پیشنهادی برای پیش بینی میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده از برگ گیاه فیجوا با حلال به کمک امواج فراصوت می‌باشد [33]. ضرایب رگرسیونی مدل چندجمله‌ای درجه دوم پیشنهادی در جدول (3) نشان داده شده است. در معادله (6) مدل چندجمله‌ای درجه دوم کامل به‌دست‌آمده به‌منظور پیش‌بینی میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده ارائه شده است.

(6)

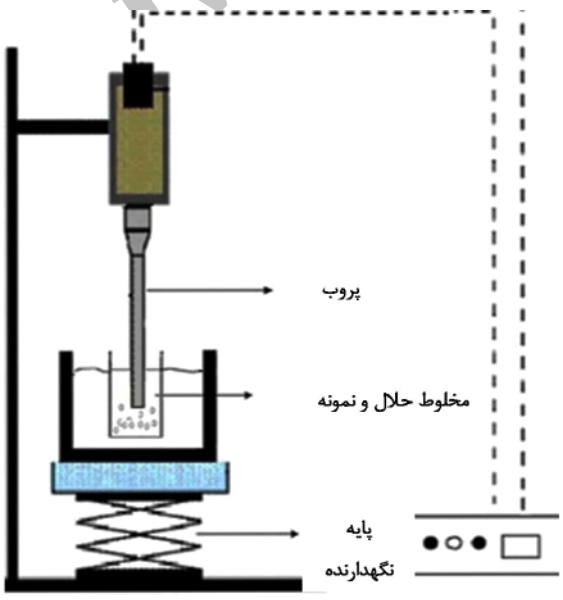
$$\text{میزان کل ترکیبات فنولی (میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم)} = ۲۳/۳۸۰ + ۳۴/۱۱X_1 + ۶۹/۰X_2 - ۱۲/۱X_3 - ۱۱/۳۰X_1^2 - ۵۰/۱۸X_2^2 - ۵۹/۶X_3^2 - ۸۹/۱۹X_1X_2 - ۲۱/۲۳X_1X_3 - ۴۸/۱۴X_2X_3$$

در رابطه فوق X_1، X_2 و X_3 به‌ترتیب شدت امواج فراصوت، چرخه کاری و دما استخراج می‌باشند.

2-3- بررسی تأثیر متغیرهای مستقل بر میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده باحلال به کمک امواج فراصوت

تأثیر متغیرهای مستقل مورد مطالعه بر میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده از برگ گیاه فیجوا با حلال به کمک امواج فراصوت به‌صورت نمودارهای سه‌بعدی در شکل (2) (الف – ج) نشان داده‌شده است. بررسی نتایج حاکی از آن است که تمام نمونه‌های به‌دست‌آمده دارای ترکیبات زیست‌فعال فنولی می‌باشند که این امر بیانگر توانایی امواج فراصوت در استخراج ترکیبات فنولی از برگ گیاه فیجوا می‌باشد. با توجه به شکل 2-الف و 2-ب که به‌ترتیب نشان‌دهنده نمودار سه‌بعدی تأثیر هم‌زمان شدت امواج فراصوت و چرخه کاری در مقدار ثابت دما استخراج (45 °C) و تأثیر هم‌زمان شدت امواج فراصوت و دما استخراج در مقدار ثابت چرخه کاری (75٪) می‌باشد می‌توان مشاهده نمود که با افزایش شدت امواج فراصوت از 714/00 تا 1785/75 W/cm² بر میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده افزوده می‌شود. همان‌طور که در شکل‌های 2-الف و 2-ب قابل‌مشاهده است با افزایش شدت امواج فراصوت در سطوح بالاتر از تا 1785/75 W/cm² میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده به‌تدریج کاهش می‌یابد. یکی از پدیده‌های مهم در فرایند استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت پدیده حفره‌زایی[1] می‌باشد. به هنگام انتشار امواج فراصوت سیکل‌های انبساط و انقباض در محیط حلال ایجاد می‌شوند که اگر شدت امواج فراصوت کافی باشد انبساط و انقباض ایجادشده می‌تواند حباب‌هایی را در درون مایع به‌وجود آورد که به نام پدیده

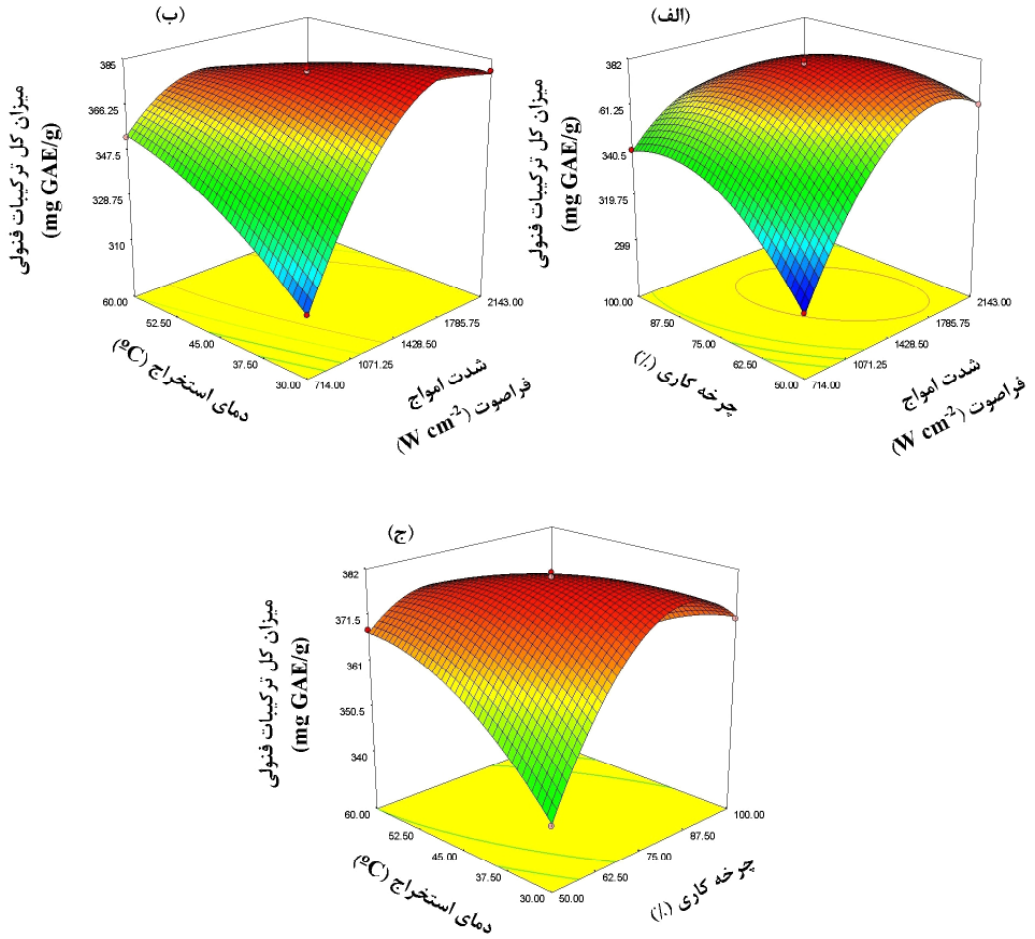
1. Cavitation



شکل (1) طرح شماتیک دستگاه مورد استفاده برای روش استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت

Archive of SID

www.SID.ir



شکل (2) نمودارهای سه بعدی تاثیر متقابل متغیرهای مستقل فرایند استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت بر میزان کل ترکیبات فنولی (TPC) زیست فعال استخراج شده از برگ گیاه فیجوا الف) تاثیر متقابل شدت امواج فراصوت و چرخه کاری، ب) تاثیر متقابل شدت امواج فراصوت و دما استخراج و ج) تاثیر متقابل چرخه کاری و دمای استخراج

حفره‌زایی شناخته‌شده است. فروپاشی حباب‌ها در سطح سلول‌ها فشار و حرارت موضعی را ایجاد می‌کند که این امر سبب تخریب دیواره سلولی و خروج محتویات سلولی می‌شود [34]. به‌علاوه، هنگام فروپاشی حباب‌های ایجادشده، جریان سریعی از امواج فراصوت تولید می‌شود که می‌تواند به‌عنوان یک میکروپمپ عمل کرده و سبب انتقال اجباری حلال به درون سلول گیاهی و حل کردن ترکیبات موردنظر شود. بررسی منابع موجود نشان می‌دهد که تنش‌های برشی حاصل از امواج فراصوت باعث شکسته شدن مولکول‌های بزرگ و درنتیجه استخراج بهتر ترکیبات فنولی می‌شود. هم‌چنین تشدید انتقال جرم ناشی از فروپاشی حباب‌های حفره‌زایی در نزدیکی دیواره‌های سلولی که سبب تماس بهتر بین مواد گیاهی و حلال می‌شود باعث افزایش میزان استخراج ترکیبات زیست فعال فنولی می‌شود [35]. دلیل کاهش میزان ترکیبات فنولی درشدت‌های بالای امواج فراصوت (بالاتر از W/cm^2 1785/75) را می‌توان تخریب این ترکیبات توسط شدت بالای امواج تولیدی بیان نمود. از طرف دیگر با به‌کارگیری امواج فراصوت با شدت‌های بالاتر حباب‌های کوچک‌تر برای ایجاد حباب‌های بزرگ‌تر به یکدیگر می‌پیوندند که این امر سبب فروپاشی آن‌ها باقدرت کم‌تری می‌شود [34]. دی و همکاران، در مطالعه‌ای به بررسی تأثیر شدت امواج فراصوت بر جداسازی کاروتنوئیدها از گیاه *Spirulina platensis* با حلال به کمک امواج فراصوت پرداختند. آن‌ها نیز دریافتند که با افزایش میزان شدت امواج فراصوت مقدار انرژی بیش‌تری به محیط حلال منتقل می‌شود

Archive

www.SID.ir

که سبب وقوع پدیده حفره‌زایی با شدت بیش‌تری می‌شود [30]. آن‌ها گزارش نمودند که با افزایش هر چه بیش‌تر شدت امواج فراصوت تا مقدار مشخص، تعداد حباب‌های بیش‌تری تولید می‌شود که منجر به تولید جریان‌های سریع‌تری از امواج فراصوت می‌شود. در مطالعه دیگری قربانی و همکاران، به بررسی تأثیر شرایط عصاره‌گیری با امواج فراصوت بر عملکرد و خواص ضد اکسایشی عصاره گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) پرداختند. آن‌ها دریافتند که به‌منظور استخراج بیش‌تر عصاره گیاه رازیانه، استفاده از امواج فراصوت با شدت W 300 سبب دستیابی به بیش‌ترین مقدار ترکیبات فنولی می‌شود و در صورت استفاده از امواج فراصوت با شدت‌های بالاتر مقدار ترکیبات زیست‌فعال فنولی کاهش می‌یابد [35].

با توجه به شکل‌های 2-الف و 2-ج در رابطه با تأثیر چرخه کاری می‌توان بیان نمود که میزان کل ترکیبات فنولی استخراج شده با افزایش چرخه کاری تا مقدار مشخصی (حدود87/50%) افزایش یافت ولی با افزایش چرخه کاری به مقادیر بالاتر تغییر محسوسی در میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده مشاهده نشد. هررا و همکاران، تأثیر متغیر چرخه کاری بر جداسازی ترکیبات زیست فعال فنولی از توت فرنگی توسط حلال به کمک امواج فراصوت را مطالعه نمودند. آن‌ها بیان نمودند که چرخه کاری بر افزایش میزان جداسازی کل ترکیبات فنولی تأثیر معنی‌دار داشت [36]. بر اساس نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر می‌توان بیان نمود که با انتخاب مقدار صحیح و مناسب چرخه کاری می‌توان به بالاترین مقدار ترکیبات فنولی با استفاده از مقدار مصرف کم‌تر انرژی به علت استفاده از زمان خاموشی دست یافت. دی و همکاران، مقدار 61/50 % چرخه کاری را برای به‌دست آوردن بالاترین مقدار بتا کاروتن (1/00 mg/g) از گیاه *Spirulina platensis* را گزارش نمودند [30]. در مطالعه دیگری یلمه و همکاران، بهینه سازی شرایط استخراج رنگ از دانه آناتو توسط حلال به کمک امواج فراصوت را مطالعه نمودند و مقدار بهینه چرخه کاری را به‌منظور حصول بیشینه مقدار رنگ از دانه آناتو (6/35%) 80٪ گزارش نمودند [37].

با توجه به شکل 2-الف و 2-ج در رابطه با تأثیر دما استخراج می‌توان بیان نمود که در مراحل اولیه افزایش دما مقدار کل ترکیبات فنولی استخراج شده افزایش داشت و در ادامه به تدریج از شدت افزایش کاسته شد. در روش استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت یکی از پدیده‌هایی که نقش مهم و کلیدی دارد اثر دمایی می‌باشد. این اثر سبب باد کردگی و شل شدن ساختار سلولی و در نتیجه خروج بیش‌تر ترکیبات مورد نظر از سلول به محیط حلال می‌شود [38]. همان‌طور که در شکل 2-الف و 2-ج مشاهده می‌شود، با افزایش دما تا مقدار معلوم می‌توان مقدار استخراج ترکیبات زیست فعال فنولی را افزایش داد. افزایش زیاد دما به‌دلیل ناپایداری حرارتی ترکیبات زیست فعال فنولی می‌تواند سبب تخریب این ترکیبات و در نتیجه کاهش مقدار کل ترکیبات فنولی شود. در مطالعه‌ای بی مکر و همکاران، بهینه‌سازی فرایند استخراج ترکیبات زیست‌فعال از دانه‌های هندوانه زمستانی توسط حلال به کمک امواج فراصوت را مطالعه نمودند. آن‌ها دریافتند که با افزایش دما بر محتوای کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده افزوده می‌شود اما استفاده از دماهای بالاتر از ^{o}C 52 سبب کاهش ترکیبات زیست‌فعال فنولی می‌شود [18].

بر اساس مطالعه تانسل و یلماز، با هدف بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولی از میوه فیجوا با استفاده از روش سنتی مقدار ترکیبات فنولی معادل 1856 mg GAE/g d.w. به‌دست آمد. سیرینژیک، فرولیک، کوماریک و ترانس-سینامیک اسید به‌عنوان ترکیبات پلی فنولی عمده در میوه فیجوآ گزارش شده است [39]. این در حالی است که میزان پلی فنولی گزارش شده توسط وستون، و استراتیل و همکاران، در میوه فیجوآ به‌ترتیب 303 و 59 mg GAE/g d.w. می‌باشد[40، 41]. این اختلاف می‌تواند ناشی از روش استخراج به‌کار گرفته شده، اختلاف در رقم و میزان رطوبت ماده اولیه باشد. براساس بررسی منابع انجام شده تا کنون گزارشی در مورد میزان ترکیبات پلی فنولی موجود در برگ گیاه فیجوآ وجود ندارد در نتیجه نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر بر روی برگ گیاه فیجوا حاکی از آن است که برگ این گیاه نیز منبع غنی از ترکیبات زیست فعال فنولی می‌باشد. اختلاف مشاهده شده بین مقادیر ترکیبات فنولی موجود در برگ و میوه ممکن است به‌علت تفاوت ماهیت ترکیبات پلی فنولی موجود در برگ و بالاتر بودن حلالیت آن‌ها در حلال مورد استفاده در

Archive of SID

www.SID.ir

این مطالعه باشد. در ادامه بررسی منابع مشخص گردید تنها تعداد کمی از منابع گیاهی دارای مقادیر بالای فنولی بودند به‌طوری‌که بولیگون و همکاران، مقدار بالای ترکیبات فنولی (322/69 mgGAE/g) در برگ گیاه *Scutia buxifolia* را گزارش کردند [42]. به‌علاوه جانویک و همکاران، در بررسی ترکیبات فنولی برگ گیاه *Cariniana domestica* به مقدار بالایی معادل 510/00 mgGAE/g دست یافتند [43].

3-3- بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولی با حلال به کمک امواج فراصوت

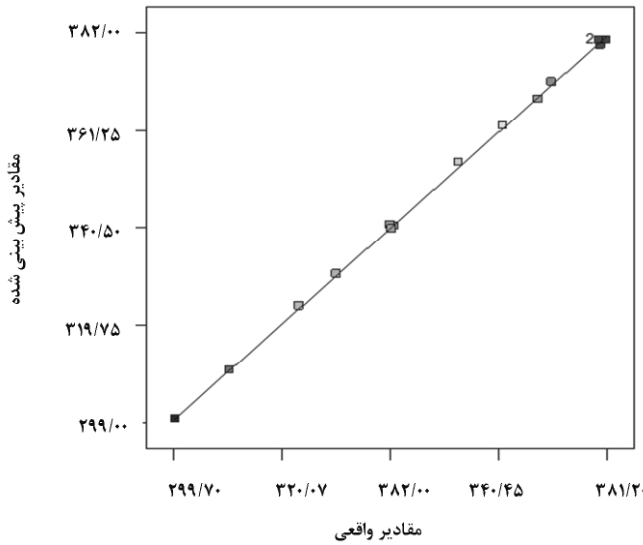
در این مطالعه به‌منظور دستیابی به شرایط بهینه برای به حداکثر رساندن میزان کل ترکیبات فنولی استخراج شده از برگ گیاه فیجوا با حلال به کمک امواج فراصوت از تکنیک بهینه‌سازی عددی استفاده شد. شدت امواج فراصوت 1749/34 W/cm^2، چرخه کاری 86/39٪ و دما استخراج 32/49 °C به‌عنوان شرایط بهینه استخراج تعیین گردید که تحت این شرایط میزان کل ترکیبات فنولی معادل 382/19 mg GAE/g پیش‌بینی گردید. عصاره ترکیبات زیست‌فعال به‌دست‌آمده تحت شرایط بهینه تعیین‌شده دارای میزان کل ترکیبات فنولی معادل 381/20±0/12 mg GAE/g بود که تفاوت معنی‌داری ($p < 0/05$) با مقدار پیش‌بینی‌شده توسط مدل پیشنهادی نداشت. در بهینه‌سازی با استفاده از روش سطح پاسخ تطابق بسیار خوب مدل پیشنهادی با نقاط مورد ارزیابی به‌منظور جلوگیری از نتایج ضعیف بعدی ضروری می‌باشد [33]. به‌منظور اعتبارسنجی مدل سطح پاسخ به‌دست‌آمده نمودار تطابق نتایج حاصل از مدل و داده‌های تجربی در شکل (3) ارائه شده است. تطابق نزدیک این مقادیر نشان‌دهنده مطلوبیت بالای مدل پیشنهادی می‌باشد.

4-3- تأثیر شدت دور بر میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده با روش حلال متلاطم

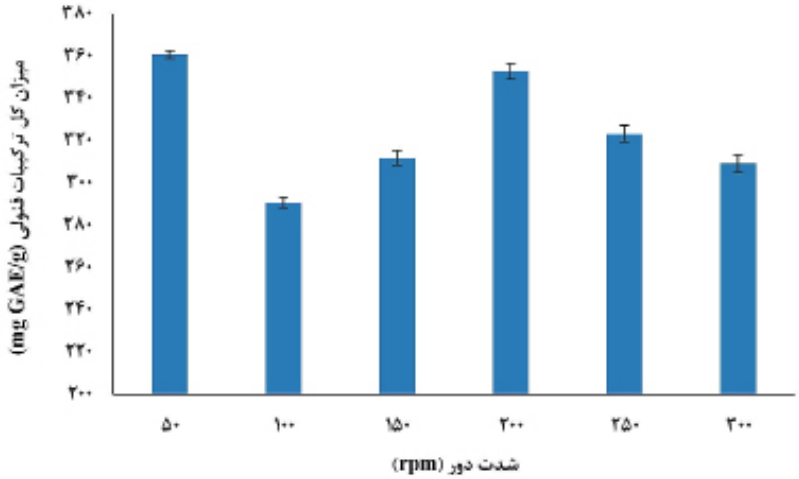
تأثیر شدت دور (300 rpm - 50) بر میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده از برگ گیاه فیجوا با روش حلال متلاطم در شکل (4) ارائه‌شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود شدت دور حلال مورد استفاده (اتانول) تأثیر معنی‌داری بر میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده دارد. به‌صورتی که با افزایش شدت دور از 50 به 200 rpm میزان کل ترکیبات فنولی از 260/74 ± 1/88 mg GAE/g به 352/95±3/75 mg GAE/g افزایش داشت. در ادامه با افزایش بیش‌تر شدت دور از میزان کل ترکیبات فنولی کاسته شد. به‌گونه‌ای که با به‌کارگیری شدت دور 300 rpm میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده تا مقدار 309/17 ± 4/20 mg GAE/g کاهش داشت. با توجه نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر می‌توان بیان نمود که با به‌کارگیری شدت دور 200 rpm می‌توان به حداکثر میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده دست‌یافت. همان‌طور که انتظار می‌رود استفاده از جریان متلاطم حلال سبب ایجاد پارگی سلولی و در نهایت تسریع خروج مواد حل شونده از ساختار سلولی به محیط حلال می‌شود. عمل تلاطم باعث انتقال بهتر حلال به ساختار سلول گیاهی و شویش بهتر و سریع‌تر ترکیبات موردنظر به درون حلال می‌شود. هم‌چنین استفاده هم‌زمان از دما و جریان متلاطم حلال می‌تواند از طریق ایجاد پارگی بیش‌تر در ساختار غشای سلولی منجر به تسریع خروج ترکیبات موردنظر شود [24]. در مطالعه حاضر تکنیک حلال متلاطم بر اساس مطالعات اولیه انجام‌شده در دمای ثابت 40 °C انجام پذیرفت. کاربرد دماهای بالاتر در این تکنیک سبب کاهش معنی‌دار میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده گردید که این امر می‌تواند به‌دلیل ماهیت ناپایدار حرارتی ترکیبات زیست فعال فنولی باشد. کاهش میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده با استفاده از شدت دورهای بالاتر از 200 rpm را می‌توان به کاهش نفوذ حلال به ساختار سلول گیاهی درنتیجه تلاطم زیاد نسبت داد. در مطالعه دیگری بی مکر و همکاران، استخراج ترکیبات با ارزش زیست‌فعال از برگ گیاه شاتوت را بررسی نمودند. آن‌ها به نتایج مشابهی دست یافتند و گزارش نمودند که با استفاده از شدت دور 235 rpm حداکثر میزان استخراج ترکیبات زیست‌فعال (20/05%) میسر می‌باشد. میزان کل ترکیبات فنولی و فعالیت ضد اکسایشی اندازه‌گیری شده با روش‌های دی‌فنیل پیکریل هیدرازین و هیدروژن پراکسید عصاره به‌دست‌آمده تحت این شرایط به‌ترتیب 38/12±0/15 mg GAE/g، 66/54±0/12% و 4/87±0/16٪ تعیین گردید [44].

Archive of SID

www.SID.ir



شکل (3) نمودار تطابق نتایج حاصل از مدل و داده های تجربی



شکل (4) تاثیر شدت دور (rpm) بر میزان کل ترکیبات فنولی (mg GAE/g) زیست فعال استخراج شده از برگ گیاه فیجوا با روش حلال متلاطم

5-3-بررسی مقایسه‌ای میزان کل ترکیبات فنولی وقدرت مهار رادیکال‌های آزاد ترکیبات زیست فعال استخراج شده با حلال به کمک امواج فراصوت و حلال متلاطم

به‌منظور بررسی کارایی استخراج ترکیبات پلی فنولی از برگ گیاه فیجوا با حلال به کمک امواج فراصوت نتایج به‌دست‌آمده از این روش با نتایج حاصل از کاربرد روش حلال متلاطم مقایسه گردیدند. نتایج به‌دست آمده برای دو روش استخراج با حلال متلاطم و حلال به کمک امواج فراصوت در جدول (4) ارائه‌شده است و نتایج حاکی از آن می‌باشد که امواج فراصوت توانایی بالایی در تولید عصاره‌های سرشار از ترکیبات زیست‌فعال فنولی دارند. به‌صورت کلی، در روش حلال متلاطم ضربات مکانیکی واردشده به دیواره سلولی در نتیجه تلاطم حلال و استفاده همزمان از دما سبب آسیب به دیواره سلولی، انتقال بهتر حلال مورد استفاده به سلول گیاهی و در نهایت شویش سریع‌تر و بهتر ترکیبات موردنظر توسط حلال از سلول گیاهی می‌شود. با استفاده از امواج فراصوت به هم خوردن‌های موضعی که درنتیجه پدیده حفره سازی ایجاد می‌شوند باعث ایجاد ضربات مکانیکی به دیواره سلولی می‌شوند. اثر ترکیبی پدیده حفره سازی و اثر دمایی در تکنیک استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت تأثیر حلال متلاطم ضربات مکانیکی واردشده به دیواره سلولی در نتیجه تلاطم حلال و استفاده همزمان از دما سبب آسیب

www.SID.ir

به دیواره سلولی، انتقال بهتر حلال مورد استفاده به سلول گیاهی و در نهایت شویش سریع‌تر و بهتر ترکیبات موردنظر توسط حلال از سلول گیاهی می‌شود. با استفاده از امواج فراصوت به هم خوردن‌های موضعی که درنتیجه پدیده حفره سازی ایجاد می‌شوند باعث ایجاد ضربات مکانیکی به دیواره سلولی می‌شوند. اثر ترکیبی پدیده حفره سازی و اثر دمایی در تکنیک استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت تأثیر چشمگیری در بهبود کارایی فرایند دارد. در این مطالعه با توجه به جدول (4) می‌توان نتیجه گرفت که میزان کل ترکیبات فنولی به‌دست‌آمده از برگ گیاه فیجوا با حلال به کمک امواج فراصوت تحت شرایط بهینه تعیین‌شده (1749/34 W/cm^2 شدت امواج، 86/39٪ چرخه کاری و 32/49 ^oC دما استخراج) بالاتر از مقدار به‌دست‌آمده با استفاده از روش حلال متلاطم است. هم‌چنین، لازم به ذکر می‌باشد که مدت زمان فرایند استخراج از 5 h درروش حلال متلاطم به 30 min درروش استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت کاهش‌یافته است. نتایج مشابهی پیرامون کارایی بالاتر امواج فراصوت به‌منظور جداسازی ترکیبات زیست‌فعال مختلف از منابع گیاهی متفاوت در بررسی منابع موجود می‌باشد. هرومادکوا و همکاران، دریافتند که می‌توان زمان مورد نیاز برای استخراج پلی فنول‌های جوانه گندم را از 80 min درروش کلاسیک به 5 min با استفاده از امواج فراصوت کاهش دهند [45]. با توجه به نتایج ارائه شده در جدول (4) مشاهده می‌شود که قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS توسط نمونه به‌دست آمده با استفاده از روش حلال به کمک امواج فراصوت بالاتر از روش حلال متلاطم می‌باشد که این امر می‌تواند ناشی از بالاتر بودن میزان کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده از برگ گیاه فیجوا با استفاده از روش حلال به کمک امواج فراصوت باشد.

4- نتیجه‌گیری

میزان استخراج ترکیبات زیست‌فعال فنولی به میزان قابل‌توجهی تحت تأثیر متغیرهای مستقل فرایند استخراج می‌باشند. در این مطالعه تأثیر متغیرهای مستقل فرایند استخراج توسط حلال به کمک امواج فراصوت شامل شدت امواج فراصوت، چرخه کاری و دمای فرایند بر محتوای کل ترکیبات فنولی مورد مطالعه قرار گرفتند. هم‌چنین تکنیک استخراج توسط حلال متلاطم جهت بررسی مقایسه‌ای مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهند که میزان استخراج ترکیبات فنولی به میزان قابل‌توجهی تحت تأثیر روش استخراج و متغیرهای مستقل فرایند استخراج می‌باشند. امواج فراصوت از طریق ایجاد نوسان‌های مکانیکی در محیط حلال و در نتیجه تسهیل و تسریع نفوذ حلال به درون سلول گیاهی سبب بهبود انتقال جرم و تسریع فرایند استخراج می‌شود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش روش استخراج توسط حلال به کمک امواج فراصوت در مقایسه با روش حلال متلاطم قادر به استخراج میزان بالاتری از ترکیبات کل فنولی در مدت‌زمان کوتاه‌تری می‌باشد. مدل به‌دست‌آمده در این پژوهش برای پیش‌بینی محتوای کل ترکیبات فنولی استخراج‌شده توسط حلال به کمک امواج فراصوت، دارای مقادیر R^2 و R^2 اصلاح شده بالایی بودند که در کنار آزمون فقدان برازش بی‌معنی و ضریب تغییرات پایین نشان‌دهنده کارایی مدل ارائه‌شده در پیش‌بینی پاسخ موردبررسی بود. با استفاده از بهینه‌سازی عددی شرایط بهینه فرایند استخراج توسط حلال به کمک امواج فراصوت به‌صورت 1749/34 W/cm^2 شدت امواج،

جدول (4) مقایسه دو روش استخراج با حلال متلاطم و استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت در استخراج ترکیبات زیست فعال فنولی از برگ گیاه فیجوا

روش استخراج	میزان کل ترکیبات فنولی (mg GAE/g)	توانایی مهار رادیکال های آزاد	
		قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (٪)	قدرت مهار رادیکال‌های آزاد ABTS (٪)
حلال متلاطم[1]	352/95 ± 3/75 [b]	73/33 ± 0/ 16 [b]	82/20 ± 0/12 [b]
حلال به کمک امواج فراصوت [2]	381/a20 ± 0/12 [a]	81/a43 ± 0/10 [a]	86/63 ± 0/26 [a]

[1] با استفاده از شدت rpm 200

[2] با استفاده از شرایط بهینه تعیین شده به صورت W/cm^2 1749/34 شدت امواج ، 86/39٪ چرخه کاری و $^\circ C$ 32/49 دما استخراج حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار در سطح اطمینان 95٪ است.

Arrive of SID

www.SID.ir

86/39٪ چرخه کاری و 32/49 °C دما استخراج به‌دست آمد. هم‌چنین مدل ارائه‌شده برای پیش‌بینی مقادیر متغیر وابسته نتایج بسیار نزدیکی با یافته‌های تجربی داشت. در مقایسه با تکنیک استخراج توسط حلال متلاطم با استفاده از شرایط بهینه استخراج توسط حلال به کمک امواج فراصوت امکان دست‌یابی به مقادیر بالاتری از ترکیبات با ارزش زیست‌فعال فنولی وجود دارد. از این‌رو می‌توان ادعا نمود که امواج فراصوت توانایی بالایی بر جداسازی ترکیبات زیست‌فعال فنولی از برگ گیاه فیجوا دارند و هم‌چنین برگ‌های این گیاه منبع غنی از ترکیبات فنولی با فعالیت ضداکسایش مطلوب می‌باشند که می‌تواند جهت کاربردهای بیش‌تر در صنایع غذایی و دارویی- بهداشتی موردمطالعه و بررسی قرار بگیرد.

منابع

[1] Fu, L., Xu, B.T., Xu, X.R., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xia, E.Q., Li, H.B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *J. Food Chem*., 129, 345-350.

[2] Baba, S. A., Malik, S. A. (2015). Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of Arisaema jacquemontii Blume. *J. Taibah Univ. Sci*., 9, 449-454.

[3] Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic, M., Velic, D. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J. Food Eng*., 81, 236-242.

[4] Bimakr, M., Russly, A.R., Ganjloo, A. (2015). Antioxidant and antimicrobial potential of polyphenols from foods, in: Preedy, V., (Ed.), Processing and impact on active components in foods. Elsevier publishing, New York, pp 407-414.

[5] Dubaa, K.S., Casazzab, A.A., Mohamedc, H.B., Peregob, P., Fiori, L. (2015). Extraction of polyphenols from grape skins and defatted grape seeds using subcritical water: Experiments and modeling. *Food Bioprod. Process.*, 94, 29-38.

[6] Paleologou, I., Vasiliou, A., Grigorakis, S., Makris, D.P. (2016). Optimisation of a green ultrasound-assisted extraction process for potato peel (Solanum tuberosum) polyphenols using bio-solvents and response surface methodology. *J. Biomass Conv. Bioref.*, 6, 289-299.

[7] Poojary, M.M., Putnik, P., Kovacevic, D.B., Barba, F.J., Lorenzo, J.M., Dias, D.A., Shpigelman, A., 2017. Stability and extraction of bioactive sulfur compounds from Allium genus processed by traditional and innovative technologies. *J. Food Comp. Anal.*, 61, 28-39.

[8] Valenzuela, A., Nieto, S., Cassels, B.K., Speisky, H. (1991). Inhibitory effect of boldine on fish oil oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68, 935-937.

[9] Cetin-Karaca, H., Newman, M.C. (2015). Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia Coli. *J. Food Bio. Sci*., 11, 8-16.

[10] Yang, G., Sato, M., Yamaguchi, T., Nakano, T., Xi, Y. (2017). Antioxidant activities of aqueous extract from Stevia rebaudiana stem waste to inhibit fish oil oxidation and identification of its phenolic compounds. *J. Food Chem.*, 232, 379-386.

[11] Romero-Rodriguez, M., Vazquez-Oderiz, M. L., Lopez-Hernandez, J., Simal-Lozano, J. (1994). Composition of babaco, feijoa, passionfruit and tamarillo produced in Galicia (North-west Spain). *J. Food Chem*., 49, 23-27.

[12] Weston, R. J. (2010). Bioactive products from fruit of the feijoa (Feijoa sellowiana, Myrtaceae): A review. *J. Food Chem*., 121, 923-926.

[13] Shaw, G. J., Allen, J. M., Yates, M. K. (1989). Volatile flavour constituents in the skin oil from Feijoa sellowiana. *J. Phytochem*., 28, 1529-1530.

Arhive of SID

www.SID.ir

Ultrasound assisted extraction of polyphenols and their distribution in whole mung bean, hull and cotyledon. *J. Food. Sci. Tech.*, 54, 921-932.

[23] Deng, J., Xu, Z., Xiang, C., Liu, J., Zhou, L., Li, T., Yang, Z., Ding, C. (2017). Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. *Ultrasonics Sonochem*., 37, 328-334.

[24] Jovanovic, A.A., Dordevic, V.B., Zdunic, G.M., Pljevljakusic, D.S., Savikin K.P., Godevac, D.M., Bugarski, B.M. (2017). Optimization of the extraction process of polyphenols from Thymus serpyllum L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *J. Sep. Purif. Technol*., 179, 369-380.

[25] Pradal, D., Vauchel, P., Decossin S., Dhulster, P., Dimitrov, K. (2016). Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization. *Ultrasonics Sonochem.*, 32, 137-146.

[26] Gonzalez-Centeno, M.R., Comas-Serra, F., Femenia, A., Rossello, C., Simal, S. (2015). Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera L.*): experimental kinetics and modeling. *Ultrasonic Sonochem*., 22, 506-514.

[27] Singh Yadav, B., Yadav, B. R., Jatain, M. (2012). Optimization of osmotic dehydration conditions of peach slices in sucrose solution using response surface methodology. *J. Food. Sci. Tech*., 49, 547-555.

[28] Noshad, M., Mohebbi, M., Shahidi, F., Mortazavi, S.A. (2012). Multi-Objective optimization of osmotic-ultrasonic pretreatments and hot-air drying of quince using response surface methodology. *Food Bioprocess Tech.*, 5, 2098-2110.

[29] Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escaleira, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965-977.

[14] Basile, A., Vuotto, M.L., Violante, U., Sorbo, S., Martone, G., Castaldo-Cobianchi, R. (1997). Antibacterial activity in Actinidia chinensis, Feijoa sellowiana and Aberia caffra. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 8, 199-203.

[15] Beyhan, O., Elmastas, M., Gedikli, F. (2010). Total phenolic compounds and antioxidant capacity of leaf, dry fruit and fresh fruit of feijoa (Acca sellowiana, Myrtaceae). J. Med. Plants Res., 4, 1065-1072.

[16] Vuotto, M. L., Basile, A., Moscatiello, V., Sole, P.D., Castaldo-Cobianchi, R., Laghi, E., Ielpo, M.T.L. (2000). Antimicrobial and antioxidant activities of Feijoa sellowiana fruit. *Int. J. Antimicrob. Agr.*, 13, 197-201.

[17] Sun-Waterhouse, D., Wang, W., Waterhouse, G.I.N., Wadhwa, S.S. (2013). Utilisation potential of feijoa fruit wastes as ingredients for functional foods. *Food Bioprocess Tech*., 6, 3441-3455.

[18] Bimakr, M., Abdul Rahman, R., Taip, F. S., Adzahan, N. M., Sarker, M. Z. I., Ganjloo, A. (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction of crude oil from winter melon (*Benincasa hispida*) seed using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity, total phenolic content and fatty acid composition. Molecules, 17, 11748-11762.

[19] Changxing, J., Li, X., Jiao, Y., Jiang, D., zhang, L., Fan, B., Zhang, Q. (2014). Optimization for ultrasound-assisted extraction of polysaccharides with antioxidant activity in vitro from the aerial root of Ficusmicrocrapa. *Carbohyd. Polym*., 110, 10-17.

[20] Tiwari, B.K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *J. Trends Anal. Chem.*, 71, 100-109.

[21] Hammi, K. M., Jdey, A., Abdelly, C., Majdoub, H., Ksouri, A. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian Zizyphus lotus fruits using response surface methodology. *J. Food Chem.*, 184, 80-89.

[22] Singh, B., Singh, N., Thakur, S., Kaur, A. (2017).

Arhive of SID

www.SID.ir

odology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965-977.

[30] Dey, S., Rathod, V. K. (2013). Ultrasound assisted extraction of β-carotene from Spirulina platensis. *Ultrasonics Sonochem*., 20, 271-276.

[31] Bimakr, M., Abdul Rahman, R., Taip, F. S., Adzahan, N. M., Sarker, M. Z. I., Ganjloo, A. (2016). Characterization of valuable compounds from winter melon (Benincasa hispida (thunb.) Cogn.) seeds using supercritical carbon dioxide extraction combined with pressure swing technique. *Food Bioprocess Tech.*, 9, 396-406.

[32] Mandana, B., Russly, A.R., Farah, S.T., Noranizan, M.A., Zaidul, I.S.M., Ali, G. (2013) Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from winter melon (*Benincasa hispida*) and its antioxidant activity and fatty acid composition. *Molecules*, 18, 997-1014.

[33] Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Smyth, T. J., O'Donnell, C. P. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive components from brown seaweed Ascophyllum nodosum using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochem.*, 23, 308-316.

[34] Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S., Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochem*., 34, 540-560.

[35] قربانی، م.؛ ابونجمی، م.؛ قربانی جاوید، م.؛ عرب حسینی، ا. (1396) تأثیر شرایط عصاره گیری با امواج فراصوت بر عملکرد و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه رازیانه . مجله علوم و صنایع غذایی، شماره 67، دوره 14، ص 63-73.

[36] Herrera, M.C., De Castro, M.L. (2004). Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. *Anal Biochem.*, 379, 1106-1112.

[37] یلمه، م.؛ حبیبی نجفی، م.؛ فرهوش، ر.؛ حسینی، ف. (1395) کاربرد روش سطح پاسخ در بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگ از دانه آناتو به کمک امواج فراصوت. مجله علوم و صنایع غذایی ، شماره 50، دوره 13، ص 41-51.

[38] Shirsath, S.R., Sable, S.S., Gaikwad, S.G., Sonawane, S.H., Saini, D.R., Gogate, P.R. (2017). Intensification of extraction of curcumin from Curcuma Amada using ultrasound assisted approach: Effect of different operating parameters. *Ultrasonics Sonochem.*, 38, 437-445.

[39] Tuncel, N.B., Yilmaz, N. (2015). Optimizing the extraction of phenolics and antioxidants from feijoa (Feijoa sellowiana, Myrtaceae). *Food Sci. Technol*., 52, 141-150.

[42] Boligon, A.A., Brum, T.F., Frohlich, J.K., Froeder, A.L.F., Athayde, M.L. (2012). HPLC/DAD profile and determination of total phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents of Scutia buxifolia Reissek stem bark. *Res. J. Phytochem.*, 6, 84-91.

[43] Janovik, V., Boligon, A.A., Bandeira, R.V., Athayde, M.L. (2011). HPLC/DAD analysis, determination of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity from the leaves of Cariniana domestica (Mart) Miers. *Res. J. Phytochem.*, 5, 209-215.

[40] Weston, R.J. (2010). Bioactive products from fruit of the feijoa (Feijoa sellowiana, Myrtaceae): a review. *Food Chem.*, 121, 923-926.

[41] Stratil, P., Klejdus, B., Kuban, V. (2007). Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*, 71, 1741-1751.

]44[بی مکر، م.؛ گنجلو، ع.؛ زرین قلمی، س.؛ انصاریان، الف. (1396) بهینه‌سازی استخراج ترکیبات باارزش زیست فعال از برگ شاتوت به‌روش حلال متلاطم. مجله علوم و صنایع غذایی، شماره 65، دوره 14، ص 343-353.

[45] Hromadkova, Z., Kostalova, Z., Ebringerova, A. (2008). Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of phenolics-rich heteroxylans from wheat bran. *Ultrasonics Sonochem.*, 15, 1062-1068.

Arhive of SID

www.SID.ir