



مدل سازی و بهینه‌سازی فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات استخراج شده به کمک امواج فراصوت از برگ گیاه زولنگ (*Eryngium caucasicum* Trautv)

عارف نوروزی^۱، ماندانا بی‌مکر^{۲*}، علی گنجلو^۲، سهیلا زرین قلمی^۲

۱. دانشجوی، کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
۲. استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

(تاریخ دریافت: 95/8/29، تاریخ پذیرش: 95/10/15)

چکیده

روش‌شناسی سطح پاسخ یک مجموعه از تکنیک‌های آماری و ریاضیات کاربردی برای ساخت مدل‌های تجربی است. در این پژوهش از روش‌شناسی سطح پاسخ بر اساس طرح باکس-بنکن به منظور بررسی، بهینه‌سازی و مدل‌سازی متغیرهای مستقل فرایند استخراج توسط حلال به کمک امواج فراصوت شامل شدت امواج فراصوت (25، 50 و 75٪)، دمای استخراج (30، 45 و 60 °C) و مدت زمان اعمال امواج فراصوت (20، 40 و 60 min) جهت دستیابی به حداکثر میزان فعالیت ضد رادیکالی از برگ گیاه زولنگ (*Eryngium caucasicum* Trautv) استفاده شده است. میزان فعالیت ضد رادیکالی به دو روش دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) و هیدروژن پراکسید (H_2O_2) اندازه‌گیری شد. نتایج به دست آمده نشان داد که تأثیرات خطی، درجه دوم و متقابل هر سه متغیر مستقل بر قدرت جذب رادیکال‌های آزاد DPPH و H_2O_2 معنی‌دار بود. برای هر پاسخ با استفاده از تجزیه و تحلیل رگرسیون خطی چندجمله‌ای درجه دوم به دست آمد. بر اساس بهینه‌سازی به روش عددی شرایط بهینه به صورت 50٪ شدت امواج فراصوت، دما 42 °C و زمان اعمال امواج فراصوت معادل 51 min به دست آمد. در این شرایط مقدار فعالیت ضد رادیکالی عصاره 20/50٪ مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و 26/55٪ مهار رادیکال‌های آزاد H_2O_2 پیش‌بینی گردید. مدل‌های ارائه شده برای پیش‌بینی مقادیر متغیرهای وابسته نتایج بسیار نزدیکی با داده‌های تجربی داشت. در نهایت نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از استخراج به روش سنتی (سوکسله) مقایسه گردید. نتایج حاکی از آن است که با استفاده از امواج فراصوت امکان دستیابی به ترکیبات ضد رادیکال بیش‌تر در مدت زمان کوتاه‌تری وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: زولنگ، امواج فراصوت، روش‌شناسی سطح پاسخ، فعالیت ضد رادیکالی، سوکسله.

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

1- مقدمه

9 گونه علفی خاردار وجود دارد که در سراسر ایران پراکنده شده است. از رایج‌ترین آن‌ها می‌توان به *E. caucasicum*، *E. billardieri* و *E. bungei* اشاره کرد [7]. این جنس، گیاهانی دو یا چندساله هستند که به دلیل رشد آن‌ها به صورت خودرو، کشت و کار آن‌ها رو به فراموشی است. گیاه زولنگ از جمله سبزی‌های برگی محلی شمال کشور ایران محسوب می‌شود که از عطرمایه معطری برخوردار است [8]. گیاه زولنگ با نام‌های مختلفی از جمله ششاک در شهسوار، شوشاخ در رامسر و چوچاق یا انارچوچاق در گیلان شناخته می‌شود [9]. استخراج، یک مرحله مهم در جداسازی ترکیبات زیست فعال از منابع گیاهی است [10]. از آنجایی که گیاهان حاوی ترکیبات زیست فعال متنوعی می‌باشند، لذا از عصاره‌های گیاهی به‌طور گسترده‌ای می‌توان در مواد غذایی، دارویی و آرایشی-بهداشتی استفاده نمود. بنابراین باید فنون استخراج به‌منظور به‌دست آوردن ترکیبات زیست فعال، به‌طور جامعی مورد بررسی قرار گیرند [11]. به‌طور معمول روش‌های متداول استخراج به زمان‌های طولانی، مقدار زیاد نمونه، حلال‌های آلی و دمای بالا نیاز دارند. علاوه بر این، بسیاری از ترکیبات طبیعی در برابر حرارت، ناپایدار بوده و در طی استخراج میزان آن‌ها کاهش می‌یابد [12]. شایان ذکر است که روش‌های متداول استخراج به دلیل استفاده از حلال‌های آلی تأثیرات مخربی بر محیط زیست و سلامت انسان نیز دارند [13]. در سال‌های اخیر روش‌های نوین استخراج مطرح شده‌اند که یکی از این روش‌ها استخراج توسط حلال به کمک امواج فراصوت است. مکانیسم استخراج توسط حلال به کمک امواج فراصوت، عمدتاً به دلیل وقوع پدیده حفره‌سازی است که سبب افزایش انتقال جرم می‌شود. هم‌چنین امواج فراصوت سبب افزایش قدرت نفوذ حلال به بافت گیاه و افزایش سطح تماس فاز مایع و جامد می‌شود. در میان دیگر روش‌های نوین استخراج نظیر استخراج با سیال فوق بحرانی و یا استخراج به کمک مایکروویو، استفاده از امواج فراصوت برای جداسازی ترکیبات ارزشمند از منابع گیاهی از جهاتی نظیر سهولت کار با دستگاه و هزینه پایین دارای مزیت است [14]. روش‌شناسی سطح پاسخ مجموعه‌ای از فنون آماری است که در بهینه‌سازی فرایندهایی به‌کار می‌رود که در آن‌ها پاسخ موردنظر تحت تأثیر تعداد زیادی متغیر مستقل است. در حالی که

امروزه در سراسر جهان با توسعه علم، نقش رادیکال‌های آزاد در ایجاد بیماری‌هایی نظیر تصلب شرایین، سرطان، پیری زودرس مشخص شده است و از آنجایی که ممکن است در طول دوره تولید، فروش و توزیع مواد غذایی این رادیکال‌ها به‌وجود آیند، لذا استفاده از نگه‌دارنده‌ها در مواد غذایی ضروری است. در بررسی‌های انجام‌شده توسط محققان مشخص شده است که سیستم دفاعی ضد اکسایشی بدن انسان، اغلب برای مقابله با رادیکال‌های آزاد تولید شده در بدن، به‌خصوص در مواقعی که تحت تأثیر استرس اکسیداتیو قرار می‌گیرند، عملکرد کافی را ندارد. لذا ورود ترکیبات ضد رادیکال به بدن ضروری است ولی از آنجایی که مطالعات صورت گرفته در سال‌های اخیر، عوارض نامطلوبی را از مصرف ترکیبات ضد رادیکال مصنوعی گزارش کرده‌اند، بنابراین لازم است تا ترکیبات ضد رادیکال طبیعی توسط مواد غذایی وارد بدن گردند [1، 2]. از طرفی، با افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان نسبت به سلامت افزودنی‌های غذایی سعی بر این است که از افزودنی‌های طبیعی که دارای توانایی مهار رادیکال‌های آزاد هستند، به‌جای افزودنی‌های مصنوعی استفاده شود. بنابراین امروزه استفاده از ترکیبات به‌دست آمده از گیاهانی که سرشار از ترکیبات زیست فعال با توانایی مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشند، می‌تواند جایگزین مناسبی برای مواد مصنوعی باشد [3]. رادیکال‌های آزاد به مولکول‌های بسیار واکنش‌پذیری اطلاق می‌شود که در خارجی‌ترین لایه خود دارای الکترون جفت نشده (منفرد) است. رادیکال‌های آزاد به دلیل داشتن الکترون جفت نشده، وضعیت ناپایداری داشته بنابراین با دیگر اتم‌ها و مولکول‌های مجاور خود واکنش می‌دهند تا به حالت پایدار درآیند. در نهایت افزایش این مواد در بدن سبب بروز بیماری‌هایی از قبیل آب مروارید و انحطاط عضلانی چشم‌ها، رماتیسم مفصلی، آسم، تخریب اسپرم‌ها و عقیمی، تخریب کبد و کاهش مقاومت در برابر عفونت‌ها و بیماری‌ها می‌شود [4].

گیاه زولنگ با نام علمی *Eryngium caucasicum* Trautv از جنس *Eryngium* L. و از خانواده چتریان¹ است [5]. این جنس شامل 317 گونه است که در قاره‌های اروپا، آسیا، آمریکا و شمال آفریقا پراکنده شده است [6]. از این جنس در ایران

1. Apiaceae

را به کارتوش انتقال داده و کارتوش در بخش استخراج کننده دستگاه سوکسله قرار داده شد و سپس مقدار 70 mL حلال اتانول با درجه آزمایشگاهی در درون بالن ریخته و به منظور عمل استخراج، دمای فرایند استخراج نقطه جوش اتانول و زمان استخراج 6 h در نظر گرفته شد. انتخاب شرایط استخراج با روش سوکسله بر اساس بررسی‌های اولیه صورت گرفت. به منظور حذف حلال مورد استفاده، نمونه به دست آمده در دستگاه تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء مدل Buchi Rotavapor R-205 (ساخت کشور سوئیس) در دمای 40°C قرار گرفت. عصاره به دست آمده تا زمان انجام آزمون‌های مورد نظر در محل تاریک و در دمای 18°C - نگهداری گردید.

2-4- استخراج توسط حلال به کمک امواج فراصوت

فرایند استخراج توسط حلال به کمک امواج فراصوت با استفاده از دستگاه فراصوت مدل UP 200 H, Hielscher (ساخت کشور آلمان) با توان 200 W، فرکانس 24 KHz، سونوتروود از جنس تیتانیوم با قطر 3 mm به صورت انتشار پیوسته امواج انجام شد. برای انجام فرایند استخراج مقدار 1/0 g از نمونه برگ را با مقدار 40 mL از حلال اتانول با درجه آزمایشگاهی مخلوط کرده و از امواج فراصوت با شدت‌های 25، 50 و 75٪، دامنه دمایی 30، 45 و 60°C و مدت زمان صوت‌دهی 20، 40- و 60 min برای استخراج ترکیبات ضد رادیکالی استفاده گردید. حذف حلال از عصاره به دست آمده توسط دستگاه تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء مدل Buchi Rotavapor R-205 (ساخت کشور سوئیس) صورت گرفت. عصاره به دست آمده تا زمان انجام آزمون‌های مورد نظر در محل تاریک و در دمای 18°C - نگهداری گردید.

2-5- اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد به روش

2و2- دی فنیل 1- پیکریل هیدرازیل (DPPH)

فعالیت مهار رادیکال‌های 2و2- دی فنیل 1- پیکریل هیدرازیل (DPPH) توسط ترکیبات استخراج شده از برگ‌های گیاه زولنگ طبق روش شایوو و هووانگ اندازه‌گیری شد [16]. به منظور انجام آزمایش 2/0 mL از محلول DPPH (با غلظت 0/1 mM) به 2/0 mL از عصاره (با غلظت 0/5 mg/mL)

با استفاده از این طرح تعداد آزمایش‌ها کاهش می‌یابد کلیه اثرات متقابل متغیرهای مستقل نیز قابل برآورد می‌باشند [15]. با توجه به اطلاعات در دسترس تاکنون مطالعه‌ای در زمینه بررسی فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات استخراج شده توسط حلال به کمک امواج فراصوت از برگ‌های گیاه زولنگ صورت نگرفته است. لذا هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر متغیرهای مستقل فرایند استخراج توسط حلال به کمک امواج فراصوت شامل شدت امواج فراصوت، دما و زمان اعمال امواج فراصوت بر فعالیت ضد رادیکالی عصاره، مدل‌سازی و بهینه‌سازی این متغیرهای مستقل با استفاده از روش‌شناسی سطح - پاسخ است. به علاوه نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از روش سوکسله مورد مقایسه قرار می‌گیرند.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد مورد نیاز

برگ‌های گیاه زولنگ قبل از مرحله گل‌دهی از مناطق جنگلی شهرستان رامسر در اوایل فصل بهار سال 1395 جمع‌آوری شدند. شناسایی گونه زولنگ (*E. caucasicum*) توسط مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان انجام گردید. در این پژوهش تمامی موارد مورد استفاده دارای خلوص بالا بوده و از شرکت‌های معتبر (مرک و سیگما) خریداری شدند.

2-2- آماده‌سازی برگ‌ها

برگ‌های تهیه شده پس از پاک شدن و شستشو، در دستگاه آون مدل K.M.85 (ساخت کشور ایران) با دمای 40°C تا رسیدن به رطوبت 8±0/5٪ خشک شدند و سپس برگ‌های خشک شده توسط دستگاه خردکن آزمایشگاهی مدل GSC-911 (ساخت کشور چین)، خرد و از صافی با مش 18 عبور داده شد و تا زمان استفاده در دمای 18°C - در بسته‌بندی مقاوم به هوا و رطوبت نگهداری شدند. برای انجام فرایند استخراج از دو روش استخراج توسط حلال به کمک امواج فراصوت و استخراج به روش سوکسله استفاده شد.

2-3- استخراج به روش سوکسله

برای انجام فرایند استخراج مقدار 1/0 g از نمونه خشک شده

شامل شدت امواج (X_1)، دمای استخراج (X_2) و مدت زمان اعمال امواج فراصوت (X_3) بر فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات استخراج شده از برگ‌های گیاه زولنگ و بهینه‌سازی فرایند از روش-شناسی سطح پاسخ طرح باکس - بنکن¹ استفاده شد. در جدول (1) متغیرهای مستقل استخراج توسط حلال به کمک امواج فراصوت و مقادیر سطوح آن‌ها نشان داده شده است. سطوح بالا و پایین متغیرها بر اساس پیش تیمارهای اولیه انتخاب گردید.

در جدول (2) تیمارهای مورد مطالعه به صورت کاملاً تصادفی (شامل 17 آزمون با 5 تکرار در نقطه مرکزی جهت تعیین خطا) ارائه شده است. در روش‌شناسی سطح پاسخ به‌طور معمول از معادله درجه دوم برای مدل‌سازی استفاده می‌شود. در این روش برای هر پاسخ مدلی تعریف می‌شود که در آن اثرات اصلی و متقابل متغیرهای مستقل بر روی هر پاسخ به‌صورت جداگانه بیان می‌شود. مدل درجه دوم را می‌توان به‌صورت زیر نوشت:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (3)$$

که β_0 و β_i و β_{ii} و β_{ij} ضرایب رگرسیونی برای به‌ترتیب عرض از مبدا، اثرات خطی، درجه دوم و متقابل و X_j و X_i متغیرهای مستقل هستند.

صحت مدل از طریق آزمون فقدان برازش، ضریب تغییرات، مقادیر ضریب همبستگی R^2 ، R^2 (adj) و عدد p در سطح اطمینان 95 درصد بررسی شد. در مرحله بعد، برای تعیین شرایط بهینه از تکنیک بهینه‌سازی عددی² با هدف به حداکثر رساندن فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات استخراج شده از برگ‌های گیاه زولنگ استفاده شد. از نرم‌افزار

افزوده و مخلوط به‌دست‌آمده به مدت 30 دقیقه در تاریکی قرار گرفت. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج 517 nm قرائت شد و در نهایت درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH[•] توسط عصاره با استفاده از رابطه (1) محاسبه گردید:

$$(1) \quad \text{مهار رادیکال‌های آزاد DPPH}^{\bullet} (\text{درصد}) = \left(\frac{Ac - As}{Ac} \right) \times 100$$

که در این رابطه Ac و As به‌ترتیب میزان جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند.

6-2- اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد به روش H_2O_2

توانایی به دام انداختن رادیکال‌های آزاد پراکسید هیدروژن توسط ترکیبات ضد رادیکالی استخراج شده از برگ‌های گیاه زولنگ طبق روش بولیک باچی-مخلوف و همکاران مورد بررسی قرار گرفت [17]. برای این منظور مقدار 1/5 mL از عصاره استخراج شده (با غلظت 2/0 mg/mL) را با 0/02 mL هیدروژن پراکسید 30٪ مخلوط کرده و میزان جذب در طول موج 530 nm طی زمان 5-60 min قرائت شد. کاهش جذب نمونه نشان‌دهنده افزایش فعالیت مهارکنندگی است. درصد مهارکنندگی رادیکال‌های H_2O_2 توسط رابطه (2) محاسبه شد:

$$(2) \quad \text{مهار رادیکال‌های آزاد } H_2O_2 (\text{درصد}) = \left(\frac{Ac - As}{Ac} \right) \times 100$$

که در این رابطه Ac و As به‌ترتیب میزان جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند.

7-2- طرح آزمایشی و تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش به‌منظور بررسی تأثیر سه متغیر مستقل

1. Box-Behnken design
2. Numerical optimization

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

متغیرهای مستقل و سطوح مختلف آن‌ها			متغیرهای مستقل
-1	0	+1	
25	50	75	شدت امواج (X_1) (%)
30	45	60	دمای استخراج (X_2) (°C)
20	40	60	مدت زمان اعمال امواج فراصوت (X_3) (min)

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

آزمون	متغیرهای مستقل		متغیرهای وابسته	
	شدت امواج (%)	دمای استخراج (°C)	زمان اعمال امواج فراصوت (min)	قدرت مهار رادیکال‌های آزاد
1	75	30	40	قدرت مهار رادیکال‌های آزاد H ₂ O ₂ (درصد)
2	50	30	60	DPPH (درصد)
3	25	30	40	
4	50	60	20	
5	75	60	40	
6	50	45	40	
7	75	45	60	
8	50	45	40	
9	50	45	40	
10	50	45	40	
11	25	60	40	
12	50	60	60	
13	50	45	40	
14	25	45	60	
15	75	45	20	
16	50	30	20	
17	25	45	20	

ضد رادیکالی عصاره‌های استخراج شده داشتند. با توجه به مقادیر عدد p به دست آمده ($p < 0/05$) مشخص می‌شود که معادلات چند جمله‌ای درجه دوم مورد استفاده برای پیش‌بینی اثر متغیرهای مستقل بر متغیرهای وابسته از نظر آماری معنی‌دار می‌باشند. از طرفی آزمون فقدان برازش¹ آن‌ها معنی‌دار نبود ($p > 0/05$) که نشان‌دهنده مناسب بودن مدل‌های مورد استفاده برای پیش‌بینی فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات استخراج شده است. تطابق بسیار خوب مدل‌های به دست آمده با نقاط مورد ارزیابی و دقت بالای آن‌ها در پیش‌بینی مقادیر متغیرهای وابسته با توجه به مقادیر بالای به دست آمده برای ضرایب همبستگی مدل‌ها (بیش‌تر از 95 درصد) قابل مشاهده است. روابط 4 و 5 به ترتیب مدل‌های به دست آمده برای قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و قدرت مهار رادیکال‌های آزاد H₂O₂ را نشان می‌دهند.

1. Lack of Fit

Design Expert 7.0.3 (Minneapolis, USA) جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارهای سه بعدی استفاده گردید.

3- نتایج و بحث

3-1- بررسی تأثیر متغیرهای مستقل بر فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات استخراج شده به کمک امواج فراصوت

داده‌های تجربی آزمون‌های تصادفی طرح باکس-بنکن در جدول (2) قابل مشاهده است. به علاوه نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل واریانس مدل‌های به دست آمده برای پیش‌بینی فعالیت ضد رادیکالی عصاره‌های استخراج شده توسط حلال به کمک امواج فراصوت از برگ‌های گیاه زولنگ در جدول (3) ارائه شده است. همان‌طور که قابل مشاهده است تمام متغیرهای مستقل مورد ارزیابی اثر معناداری بر فعالیت

جدول (3) نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مدل های سطح پاسخ به دست آمده برای فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات استخراج شده توسط حلال به کمک امواج فراصوت از برگ گیاه زولنگ

قدرت مهار رادیکال های آزاد H_2O_2				قدرت مهار رادیکال های آزاد DPPH				منبع
درجه آزادی	مجموع مربعات	ضریب رگرسیون	عدد p	درجه آزادی	مجموع مربعات	ضریب رگرسیون	عدد p	
مدل	9	895/09	0/0001	9	538/22	26/04	0/0001	
خطی	3			3				
X_1	1	11/05	0/0350	1	26/94	1/84	0/0001	
X_2	1	71/46	0/0003	1	111/98	-3/74	0/0001	
X_3	1	20/38	0/0094	1	2/05	0/51	0/0001	
درجه دوم	3			3				
X_{12}	1	49/19	0/0009	1	36/46	-2/94	0/0001	
X_{22}	1	560/77	0/0001	1	221/03	-7/25	0/0001	
X_{32}	1	14/03	0/0217	1	15/61	-1/93	0/0001	
برهمکنش	3			3				
$X_1 X_2$	1	66/34	0/0004	1	30/25	-2/75	0/0001	
$X_1 X_3$	1	46/44	0/0011	1	25/91	-2/55	0/0001	
$X_2 X_3$	1	20/34	0/0095	1	47/13	-3/43	0/0001	
مانده ها	7	11/37		7	0/17			
فقدان برازش	3	6/98	0/2407	3	0/13		0/0707	
خطای خالص	4	4/39		4	0/34			
کل	16	906/46		16	538/38			
میانگین		41/60			20/34			
انحراف معیار		1/27			0/16			
%C.V		3/306			0/76			
R^2		0/987			0/999			
Adj R^2		0/971			0/999			
Pred R^2		0/870			0/995			

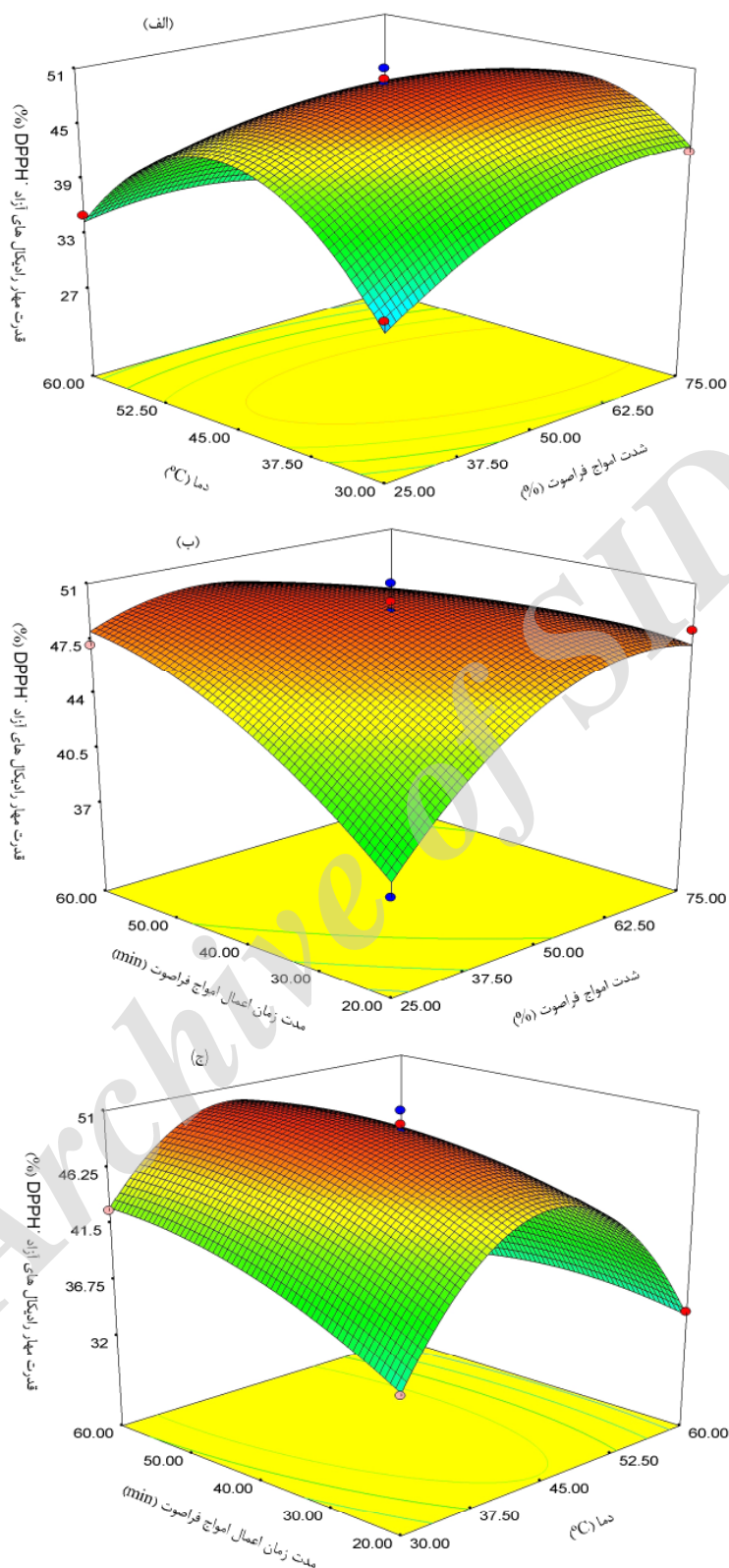
(4) که در معادلات X_1 ، X_2 و X_3 به ترتیب شدت امواج فراصوت،

درصد مهار رادیکال های آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل =
 $49.50 + 1.18 X_1 - 2.99 X_2 + 1.60 - 3.42 X_{12} - 11.54 X_{22} - 1.83 X_{32} - 4.07 X_1 X_2 - 3.41 X_1 X_3 - 2.26 X_2 X_3$

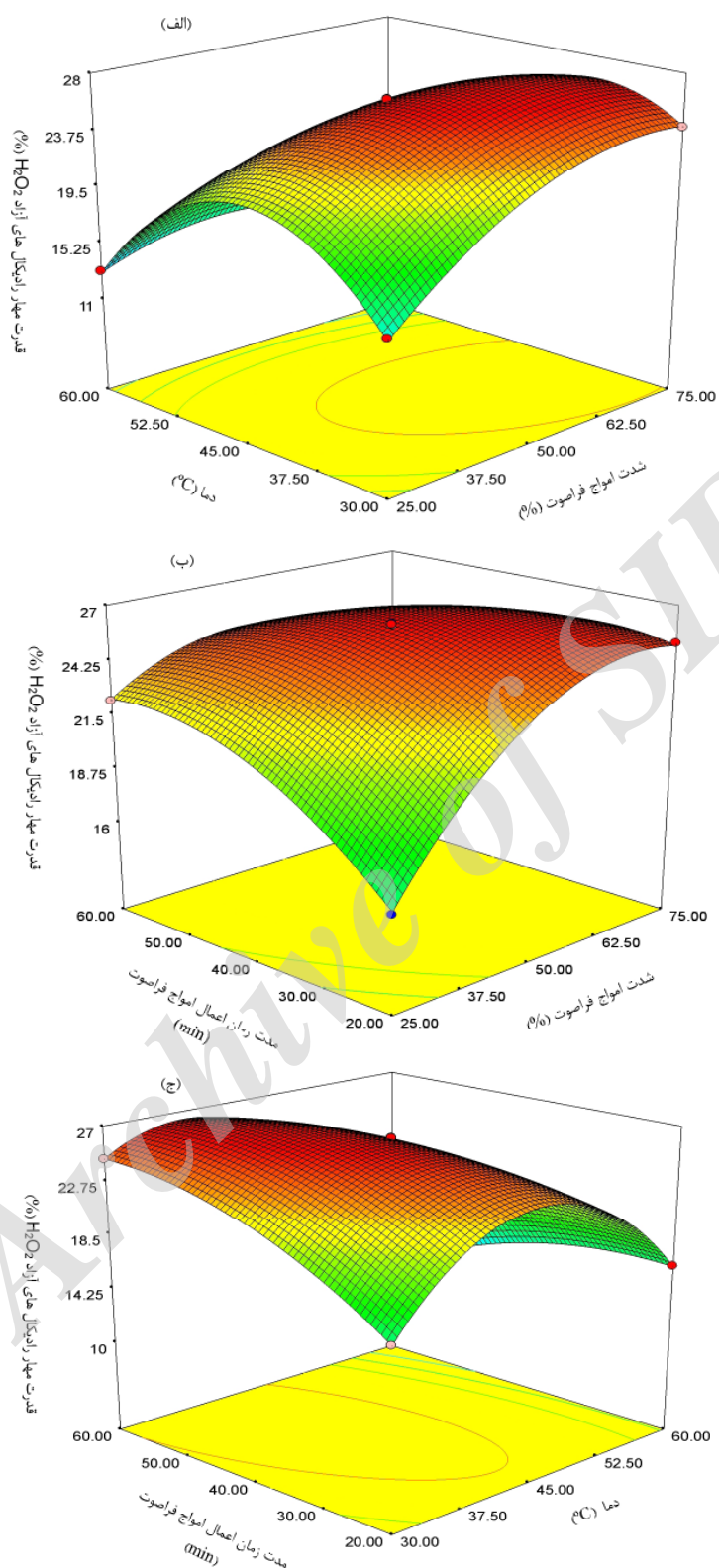
گیاه زولنگ به صورت نمودارهای سه بعدی در شکل های 1

(الف-ج) و 2 (الف-ج) نشان داده شده است. بررسی نتایج حاکی از آن است که تمام عصاره های به دست آمده دارای فعالیت ضد رادیکالی بودند که دامنه قدرت مهار رادیکال های

= درصد مهار رادیکال های آزاد هیدروژن پراکسید
 $26.04 + 1.84 X_1 - 3.74 X_2 + 0.51 X_3 - 2.94 X_{12} - 7.25 X_{22} - 1.93 X_{32} - 2.75 X_1 X_2 - 2.55 X_1 X_3 - 3.43 X_2 X_3$



شکل (1) نمودارهای سه بعدی تاثیر متقابل متغیرهای مستقل فرایند استخراج توسط حلال به کمک امواج فراصوت بر قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH[•] (درصد) عصاره برگ گیاه زولنگ (الف) تاثیر متقابل شدت امواج (درصد) و دما (درجه سلسیوس) (ب) تاثیر متقابل شدت امواج (درصد) و مدت زمان اعمال امواج فراصوت (دقیقه) (ج) تاثیر متقابل دما (درجه سلسیوس) و مدت زمان اعمال امواج فراصوت (دقیقه)



شکل (2) نمودارهای سه بعدی تاثیر متغیرهای مستقل فرایند استخراج توسط حلال به کمک امواج فراصوت بر قدرت مهيار راديكال هائي آزاد H_2O_2 (درصد) عصاره برگ گیاه زولنگ الف) تاثیر متقابل شدت امواج (درصد) و دما (درجه سلسیوس) ب) تاثیر متقابل شدت امواج (درصد) و مدت زمان اعمال امواج فراصوت (دقیقه) و ج) تاثیر متقابل دما (درجه سلسیوس) و مدت زمان اعمال امواج فراصوت (دقیقه)

سبب کاهش کارایی پدیده حفره‌زایی می‌شود. از طرفی به دلیل ناپایداری حرارتی ترکیبات ضد رادیکال استفاده از دمای بالا سبب کاهش فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد ترکیبات استخراج شده می‌شود. بی مکر و همکاران در مطالعه‌ای به بررسی تأثیر دما بر جداسازی ترکیبات زیست فعال از دانه‌های هندوانه زمستانی توسط حلال به کمک امواج فراصوت پرداختند. آن‌ها نیز دریافتند که با افزایش دما بر مقدار فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات استخراج شده افزوده می‌شود، اما استفاده از دماهای بالاتر از 52 °C منجر به کاهش مقدار فعالیت ضد رادیکالی عصاره‌های به‌دست آمده خواهد شد [21]. کامران خان و همکاران دریافتند که بهترین دما برای دستیابی به بالاترین میزان ترکیبات ضد اکسایش (69٪) از پوست پرتقال 40 °C است و با اعمال دماهای بالاتر از میزان فعالیت ضد اکسایشی کاسته می‌شود [22]. نتایج مشابهی توسط رامیک و همکاران برای استخراج ترکیبات پلی فنولی از میوه انگورک گلوگیر¹ توسط امواج فراصوت به‌دست آمد است [23].

بر اساس نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان نمود که با استفاده از سطوح پایین‌تری از شدت امواج فراصوت فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات استخراج شده با طولانی‌تر شدن زمان اعمال امواج فراصوت تا 60 دقیقه افزایش می‌یابد. استفاده از امواج فراصوت با شدت بالاتر سبب کوتاه‌تر شدن زمان اعمال امواج فراصوت می‌شود. یانگ و همکاران تأثیر امواج فراصوت جهت جداسازی ترکیبات ضد رادیکال از میوه‌ی لنگان را مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که مقدار فعالیت ضد رادیکالی با افزایش زمان اعمال امواج فراصوت در شدت کم‌تر به‌صورت مداوم افزایش دارد [24]. در همین راستا نتایج مشابهی توسط بونکیرد و همکاران و توسیک و همکاران در جداسازی ترکیبات زیست فعال از فلفل قرمز و سیر وحشی خوراکی² یافت شده است.

3-2- بهینه‌سازی فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات

استخراج شده توسط حلال به کمک امواج فراصوت

در این پژوهش به‌منظور دستیابی به شرایط بهینه برای به حداکثر رساندن فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات استخراج شده

آزاد DPPH در محدوده 27/51-49/88٪ و دامنه قدرت مهار رادیکال‌های آزاد H₂O₂ در محدوده 10/21-26/12٪ قرار داشت. این نتایج نشانگر نقش کلیدی امواج فراصوت در توانایی مهار رادیکال‌های آزاد ترکیبات استخراج شده دارد. شکل‌های 1-الف و 2-الف تأثیر دما و شدت امواج فراصوت را بر قدرت مهار رادیکال‌های آزاد نشان می‌دهند. همان‌گونه که مشخص است مقدار فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات استخراج شده با افزایش شدت امواج فراصوت تا سطح معینی (حدود 55٪) افزایش می‌یابد و پس از آن افزایش شدت امواج فراصوت تأثیر به‌سزایی بر فعالیت ضد رادیکالی عصاره ندارد. به هنگام انتشار امواج فراصوت سیکل‌های انقباض و انقباض در محیط ایجاد می‌شوند. در صورتی که شدت امواج فراصوت به اندازه کافی باشد، انقباض و انقباض ایجاد شده می‌تواند حباب‌ها و حفره‌هایی را در درون مایع به‌وجود آورد که به نام پدیده حفره‌زایی¹ شناخته شده است. فشار و حرارت موضعی ناشی از ترکیدن حباب‌ها در سطح سلول‌ها سبب شکستن دیواره سلولی و تسهیل خروج و آزادسازی محتویات درون سلولی به محیط حلال می‌شود [18]. با به‌کارگیری امواج فراصوت با مقدار معین شدت امواج فراصوت قابل انتظار است که پس از گذشت مدت زمان معینی از اعمال امواج به‌دلیل حضور دیواره‌های سخت سلولی در بافت گیاهی تغییر معناداری در جداسازی ترکیبات موردنظر مشاهده نشود. دیگر محققین نتایج مشابهی در بررسی اثر امواج فراصوت بر جداسازی ترکیبات زیست فعال از گیاه استویا و میوه نیلوفر آبی زیزیپوس² به‌دست آوردند [19، 20]. با توجه به شکل‌های 1 (الف و ج) و 2 (الف و ج) در رابطه با تأثیر دما می‌توان بیان نمود که میزان فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات استخراج شده با افزایش دما تا مقدار مشخصی (حدود 45 °C) افزایش یافت و افزایش دمای بیش‌تر از این مقدار سبب کاهش مقدار فعالیت ضد رادیکالی عصاره‌های به‌دست آمده شد. در این پژوهش تأثیر دوگانه دما بر فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد نشان داده شده است. بر اساس مطالعات انجام شده افزایش دما سبب افزایش حلالیت، کاهش گرانیوی حلال و بهبود انتقال جرم ترکیبات موردنظر از نمونه به محیط می‌شود. اما از طرف دیگر در دمای بالا (60 °C) مقدار فشار بخار بیش‌تر است که خود

1. Aronia melanocarpa
2. Wild garlic (*Allium ursinum* L.)

1. Cavitation
2. Zizyphus lotus

3-3- مقایسه توانایی مهار رادیکال‌های آزاد ترکیبات استخراج شده توسط حلال به کمک امواج فراصوت از برگ گیاه زولنگ از تکنیک بهینه‌سازی عددی استفاده شد. شدت امواج فراصوت 50٪، دما 42 °C و 51 min زمان اعمال امواج فراصوت به‌عنوان شرایط بهینه استخراج یافت شد که در این شرایط مقدار فعالیت ضد رادیکالی پیش‌بینی شده شامل 26/55٪ مهار رادیکال آزاد DPPH و 50/20٪ مهار رادیکال آزاد H₂O₂ بود. به‌علاوه به‌منظور اعتبارسنجی مدل‌های ارائه شده مقادیر پیش‌بینی شده با مقادیر تجربی به‌دست آمده تحت شرایط بهینه مقایسه گردید و تطابق نزدیک این اعداد بیانگر همبستگی بالای بین نتایج به‌دست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش‌بینی شده است (جدول 4).

3-3- مقایسه توانایی مهار رادیکال‌های آزاد ترکیبات استخراج شده توسط حلال به کمک امواج فراصوت با سوکسله

ترکیبات استخراج شده با استفاده از روش سوکسله دارای توانایی مهار رادیکال‌های آزاد (28/12±0/25)٪ مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و 14/15±0/21٪ مهار رادیکال‌های آزاد H₂O₂ بودند. فرایند استخراج در روش سوکسله براساس پدیده نفوذ حلال از طریق منافذ سلول‌های گیاهی و انتشار ترکیبات قابل انحلال در اثر پدیده اسمز از منافذ سلول به داخل حلال موردنظر می‌باشد که منجر به طولانی شدن مدت زمان فرایند استخراج می‌شود. اطلاعات به‌دست آمده نشان می‌دهد که به کمک امواج فراصوت تحت شرایط بهینه

جدول (4) نتایج اعتبارسنجی مدل‌های سطح پاسخ به‌دست آمده برای فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات استخراج شده توسط حلال به کمک امواج فراصوت از برگ گیاه زولنگ

آزمون	قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (درصد)		قدرت مهار رادیکال‌های آزاد H ₂ O ₂ (درصد)	
	داده‌های تجربی	داده‌های پیش‌بینی شده	داده‌های تجربی	داده‌های پیش‌بینی شده
1	42/11	41/77	24/08	24/18
2	42/71	42/97	24/50	24/55
3	33/42	32/28	15/16	15/01
4	34/06	33/80	16/10	16/05
5	27/51	28/65	11/04	11/19
6	48/14	49/50	26/05	26/04
7	44/54	43/62	21/11	20/97
8	49/20	49/50	26/07	26/04
9	49/88	49/50	26/07	26/04
10	51/00	49/50	26/12	26/04
11	35/11	34/45	13/12	13/02
12	32/70	32/48	10/20	10/21
13	49/26	49/50	25/88	26/04
14	47/20	48/08	22/28	22/39
15	48/12	47/24	25/15	25/04
16	35/05	35/27	16/66	16/67
17	37/15	38/07	16/14	16/28

امواج فراصوت که یک روش دوستدار محیط زیست¹ است برای جداسازی ترکیبات دارای فعالیت ضد رادیکال از برگ‌های گیاه زولنگ استفاده گردید. جهت بررسی، مدل سازی و بهینه سازی فعالیت ضد رادیکالی ترکیبات زیست فعال از روش شناسی سطح پاسخ بر پایه طرح باکس - بنکن استفاده گردید. تمام متغیرهای مستقل مورد مطالعه اثرات معنی داری بر توانایی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH[•] و H₂O₂ توسط ترکیبات استخراج شده داشتند. به علاوه، مدل‌های به دست آمده در این پژوهش، دارای مقادیر R² (adj)، R² بودند که به همراه آزمون فقدان برازش بی معنی و نیز ضریب تغییرات پایین آن‌ها نشان دهنده کارایی مدل‌های ارائه شده در پیش بینی پاسخ‌های مورد ارزیابی بود. با استفاده از بهینه سازی عددی شرایط بهینه شامل شدت امواج فراصوت، دما و مدت زمان اعمال امواج فراصوت به ترتیب 50٪، 42 °C و 51 min به دست آمد. تحت این شرایط پیش بینی گردید ترکیبات استخراج شده دارای فعالیت ضد رادیکالی معادل 50/20٪ مهار رادیکال‌های آزاد DPPH[•] و 26/55٪ مهار رادیکال‌های آزاد H₂O₂ باشند. مقایسه نتایج به دست آمده با روش سوکسله نشان داد که می‌توان به کمک امواج فراصوت در دما و مدت زمان بسیار کم‌تری ترکیباتی با فعالیت ضد رادیکالی بالاتر از برگ‌های گیاه زولنگ به دست آورد. به علاوه نتایج نشان می‌دهند که برگ‌های گیاه زولنگ منبع غنی از ترکیبات با توانایی مهار رادیکال‌های آزاد هستند که می‌توان از آن به صورت گسترده‌ای در صنایع غذایی و دارویی - بهداشتی استفاده نمود.

تعیین شده (شدت امواج فراصوت 50٪، دما 42 °C و 51 min زمان اعمال امواج فراصوت) امکان دستیابی به ترکیباتی با فعالیت ضد رادیکالی بالاتر (20/50٪ مهار رادیکال‌های آزاد DPPH[•] و 26/55٪ مهار رادیکال‌های آزاد H₂O₂) در دما و مدت زمان بسیار کم‌تری در مقایسه با روش سوکسله (نقطه جوش اتانول به مدت 6 ساعت) وجود دارد. مکانیسم امواج فراصوت سبب سرعت بخشیدن به فرایند استخراج می‌شوند. به گونه‌ای که پدیده حفره زایی منجر به ایجاد ضربه ناشی از ترکیدن حباب‌ها بر روی سطح سلول می‌شوند. به علاوه برخورد امواج ضربتی که در اثر انتشار امواج فراصوت در حلال ایجاد می‌شوند سبب تسریع و تسهیل در نشر محتویات داخل سلول به محیط حلال می‌شوند. عامل دیگری که سبب سرعت بخشیدن به این فرایند می‌شود، تشکیل میکرو پمپ‌ها است به این صورت که ترکیدن حباب بر سطح سلول گیاهی سبب خروج جریان پر فشار فاز بخار از داخل حباب به سمت محلول می‌شود که این رخداد مانند یک موج فشار یا به عبارتی به صورت یک میکروپمپ عمل می‌کند و در نهایت باعث حرکت و انتشار پر سرعت حلال به سطح نمونه گیاهی می‌شود. این اتفاق نیز می‌تواند سبب تخریب دیواره سلولی و هم‌چنین منجر به بهبود نفوذ حلال به داخل سلول شود [27-28]. روش سوکسله به دلیل استفاده از دمای بالا و زمان طولانی می‌تواند سبب آسیب حرارتی به ترکیبات دارای فعالیت ضد رادیکالی شود.

4- نتیجه گیری

در این پژوهش از فرایند استخراج توسط حلال به کمک

1. Environmental friendly technique

منابع

- [1] قره خانی، م؛ صادقی ماهونک، ع؛ قربانی، م. (1387) آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی: ترکیبات عملگر جدید، مجموعه مقالات دومین کنفرانس ملی غذای فراسودمند (عملگر)، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، ص 443-452.
- [2] Oktay, M., Gulcin, I., Kufrevioglu, O. I. (2003). Determination of invitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Food Sci. Technol-LEB.*, 36, 263-271.
- [3] Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V. (2004). Use of different methods for testing antioxidative of oregano essential oil. *Food Chem.*, 85, 633-640.
- [4] Christopher, M. D., David J. M. (2003). Exercise-

- [14] Wen, L., Lin, L., You, L., Yng, B., Jing, G. Zhao, M. (2011). Ultrasound-assisted extraction and structural identification of poly polysaccharides from *Isodon lophanthoides* var. *gerardianus* (Benth) H. Hara. *Carbohydr Polym.*, 85, 541-547.
- [15] Li, J., Ding, S., Ding, X. (2007). Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. *Jinsixiaozao*. *J. Food Eng.*, 80, 176-183.
- [16] Shyu, Y. S., Hwang, L. S. (2002). Antioxidant activity of the crude extract of lignin glycosides from unroasted Burma black sesame meal. *Food Res. Int.*, 35, 357-365.
- [17] Boulekbache-Makhlouf, L., Medouni, L., Medouni-Adrar, S., Arkoub, L., Madani, K. (2013). Effect of solvents extraction on phenolic content and antioxidant activity of the byproduct of eggplant. *Ind Crop Prod.*, 49, 668-674.
- [18] Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. G., Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason Sonochem.*, 34, 540-560.
- [19] Liu, J., Li, J. W., Tang, J. (2010). Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts. *Food Bioprod Process*, 88, 215-221.
- [20] Hammi, K. M., Jdey, A., Abdelly, A., Majdoub, H., Ksouri, R. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from *Tunisian Zizyphus lotus* fruits using response surface methodology. *Food Chem.*, 184, 80-89.
- [21] Mandana, B., Russly, A.R., Farah, S.T., Noranizan, M.A., Zaidul, I.S.M., Ali, G. (2012) Optimization of ultrasound-assisted extraction of crude oil from Associated Oxidative Stress. *Clin Tech Equine Pract.*, 2, 278-291.
- [5] Pimenov, M. G., Leonov, M. V. (1993). The Genera of the *Umbelliferae*. Kew: Royal Botanic Gardens, Landon, pp 92-93.
- [6] Worz, A. (2004). On the distribution and relationships of the South-West Asian species of *Eryngium* L. (*Apiaceae-Saniculoideae*). *Turk. J. Bot.*, 28, 85-92.
- [7] بویه، ب؛ کاشفی، ب؛ رامنه، و؛ علیپور، ز. (1391) بررسی پتانسیل‌های کشت پایدار در گیاه دارویی زولنگ *Eryngium caucasicum* Trautv. اولین کنفرانس ملی راهکارهای دستیابی به توسعه پایدار در بخش‌های کشاورزی، منابع طبیعی و محیط زیست، تهران، وزارت کشور. ص 15-20.
- [8] Khoshbakhat, K., Hammer, K., Pistrick, K. (2007). *Eryngium caucasicum* Trautv. cultivated as a vegetable in the Elburz mountains (Northern Iran). *Genetic Resour Crop Ev.*, 54, 445-448.
- [9] Nabavi, S. M., Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. F., Jafari, M. (2008). Free radical scavenging activity and antioxidant capacity of *Eryngium caucasicum* Trautv and *Froripia subpinnata*. *Pharmacol.*, 3, 19-25.
- [10] Annegowda, H. V., Mordi, M. N., Ramanathan, S., Hamdan, M. R. Mansor, S. M. (2012). Effect of extraction techniques on phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of *Bauhinia purpurea*: HPTLC Determination of Antioxidants. *Food Anal Methods*, 5, 226-233.
- [11] Wang, L., Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.*, 17, 300-312.
- [12] Teh, S., Brich, J.B. (2014). Effect of ultrasonic treatment on the polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola seed cakes. *Ultrason Sonochem.*, 21, 346-353.
- [13] Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Anal Chem.*, 71, 100-109.

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.

[22] Kamran Khan, M., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chem.*, 119, 851-858.

[23] Ramic, M., Vidovic, S., Zekovic, Z., Vladic, J., Cvejic, A., Pavlic, B. (2015). Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. *Ultrason Sonochem.*, 23, 360-368.

[24] Yang, B., Zhao, M., Shi, J., Yang, N., Jiang, Y. (2008). Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from *longan* fruit pericarp. *Food Chem.*, 106, 685-690.

[25] Tomšik, A., Pavlic, B., Vladic, J., Ramic, M., Brindza, J., Vidovic, S. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrason Sonochem.*, 29, 502-511.

[26] Boonkird, S., Phisalaphong, C., Phisalaphong, M. (2008). Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from *Capsicum frutescens* on a lab- and pilot-plant scale. *Ultrason Sonochem.*, 15, 1075-1079.

[27] شلماشی، الف؛ امانی، ف. (1394) کاربرد سطح پاسخ در بهینه‌سازی استخراج روغن از مغز گردو و هسته میوه انبه با استفاده از امواج فراصوت. فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، سال سوم، شماره 10، ص 1-10.

[28] Gajendragadkar, C. N., Gogate, P. R. (2016). Intensified recovery of valuable products from whey by use of ultrasound in processing steps. A review. *Ultrason Sonochem.*, 32, 102-118.