



معاونت پژوهشی واحد مشهد



جمهوری اسلامی ایران

محل اجراء: جهاد دانشگاهی واحد مشهد

بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگدانه کورکومین از ریزوم زردچوبه با استفاده از امواج فراصوت و مقایسه آن با روش متداول (ماسراسیون)

کد طرح: 1884

نام مسئول طرح:  
شادی بلوریان

گروه پژوهشی:  
پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی  
گروه پژوهشی افزودنی‌های غذایی

دی ماه 1392

الله أكبر

Archive of SID

## شناسنامه طرح پژوهشی

---

عنوان طرح:	بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگدانه کورکومین از ریزوم زردچوبه با استفاده از امواج فراصوت و مقایسه آن با روش متداول (ماسراسیون)
کد طرح:	1884
کارفرما:	معاونت پژوهشی و فناوری جهاددانشگاهی گروه کشاورزی و منابع طبیعی
مجری:	پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاددانشگاهی گروه پژوهشی فراوری مواد غذایی
مسئول طرح:	شادی بلوریان
تاریخ شروع طرح:	مرداد ماه 1389
تاریخ اتمام طرح:	اسفند ماه 1391
محل اجراء:	جهاد دانشگاهی مشهد، دانشکده علوم و دانشکده داروسازی

---

## مشخصات مسئول و همکاران طرح:

ردیف	نام مجری یا همکاران طرح	رتبه علمی	مسئولیت در طرح	مدت فعالیت در طول اجرای طرح به ساعت
1	شادی بلوریان	استادیار	مجری	800
3	فرشته حسینی	مربی	همکار	400
4	الناز میلانی	استادیار	همکار	160

چکیده:

بشر امروزی در طی سالیان متمادی به منظور بهبود ویژگی‌های محصولات از انواع مختلف مواد افزودنی نظیر رنگ‌ها، نگهدارنده‌ها و شیرین‌کننده‌ها استفاده نموده که متأسفانه برخی از این مواد به شدت برای سلامتی انسان مضر است. اخیراً با محدودیت‌های اعمال‌شده از جانب سازمان‌های بین‌المللی و انستیتوهای تحقیقاتی در سطح جهانی مطالعه و جستجو برای یافتن پیگمان‌های طبیعی مناسب به عنوان رنگ افزودنی شدت گرفته است. از جمله پیگمان‌های مورد بررسی می‌توان به کورکومین اشاره کرد. این ترکیب از ریزوم گیاه (*Curcuma longa L.*) به دست می‌آید. کورکومین علاوه بر رنگ‌دهندگی دارای خواص درمانی مفیدی از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، کاهش‌دهنده عوارض قلبی-عروقی، خاصیت ضد سرطانی و ... می‌باشد. در این پژوهش در فاز اول بهینه‌سازی شرایط استخراج کورکومین با حلال صورت گرفت. از متدولوژی رویه سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی به منظور بررسی تاثیر نسبت حلال به ماده جامد، نسبت حلال‌ها به یکدیگر و زمان بر راندمان کورکومین بهره گرفته شد. براساس نتایج به دست آمده در این تحقیق، نسبت حلال به ماده جامد، نسبت حلال‌ها به یکدیگر و زمان به ترتیب موثرترین فاکتورها بر استخراج کورکومین بودند. براساس آزمایش‌های انجام شده شرایط بهینه استخراج کورکومین جهت حصول بیشینه راندمان (3/80739) شامل نسبت حلال به ماده جامد (2)، نسبت استن (100 درصد) و زمان 48 ساعت تعیین گردید. در فاز دوم به منظور افزایش بازدهی و کاهش زمان استخراج از امواج فراصوت استفاده گردید. متغیرهای مستقل فراصوت شامل زمان صوت‌دهی (1-15 دقیقه)، دمای فرایند (25-45 °C) و توان دستگاه فراصوت (10-100٪) بود. نتایج حاکی از آن بود که زمان صوت‌دهی به صورت خطی ( $p < 0.01$ ) و نیز اثر متقابل زمان با توان دستگاه فراصوت ( $p < 0.04$ ) تاثیر معنی‌داری بر استخراج کورکومین از پودر ریزوم زردچوبه داشت. به منظور بهینه‌سازی اثر زمان صوت‌دهی، دمای فرایند و توان دستگاه فراصوت بر میزان استخراج کورکومین از روش سطح پاسخ، طرح مرکب مرکزی استفاده شد. نتایج نشان داد که مدل‌های چند جمله‌ای  $2F$  به خوبی قادر به توصیف داده‌ها بوده و به طور معنی‌داری رابطه بین متغیرهای مستقل و پاسخ را بیان می‌کند. بهترین سطوح زمان صوت‌دهی، دمای فرایند و توان دستگاه فراصوت به ترتیب 8 دقیقه،  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  و 55 درصد بود.

**کلمات کلیدی:** کورکومین، امواج فراصوت، بهینه‌سازی، سطح پاسخ

### پیشگفتار

در حال حاضر رنگ‌های خوراکی مصرفی در کشور بیشتر از نوع رنگ‌های سنتزی وارداتی می‌باشند. به تدریج و همگام با موج جهانی ایجاد شده به سوی جایگزینی رنگ‌های سنتزی با انواع رنگ‌های طبیعی، قوانینی در کشور پیرامون ممنوعیت استفاده از رنگ‌های سنتزی در برخی فرآورده‌های غذایی نظیر اسنک‌ها وضع شده است.

تمایل روزافزون مصرف‌کنندگان به سمت غذاهای سلامتی‌زا، دارویی و مغذی فواید استفاده از رنگ‌های طبیعی را به جای انواع سنتزی در محصولات غذایی افزایش داده است. تحقیقات مختلف نشان دادند که رنگ‌های سنتزی عوارضی نظیر آسم، کهیر، بیش‌فعالی در کودکان، تضعیف سیستم ایمنی و یا حتی سرطان ایجاد می‌کنند. از این رو حدود 4 دهه قبل (سال‌های 1960-1970)، مخالفت شدید با مواد غذایی مصنوعی آغاز شد و در این میان رنگ‌های غذایی سنتزی به شدت مورد انتقاد قرار گرفتند. در سال 1994، رشد سالانه بازار رنگ‌های طبیعی در جهان 5-10 درصد و رنگ‌های سنتزی تنها 3-5 درصد گزارش شد. در همین سال میزان فروش جهانی رنگ‌های طبیعی 250 میلیون دلار برآورد گردید که 125 میلیون دلار از آن سهم آمریکا بود. در سال 2002، رنگ‌های طبیعی بیش از یک میلیارد دلار از بازار فروش رنگ‌های خوراکی را به خود اختصاص داد. متخصصان بر این باورند که این روند حداقل برای 20 سال آینده نیز تداوم خواهد داشت.

وجود منابع طبیعی بالقوه در ایران جهت استخراج رنگ، تعداد زیاد واحدهای صنایع غذایی مصرف‌کننده رنگ، بالا بودن قیمت رنگ‌های طبیعی وارداتی و مهمتر از همه مضرات استفاده از رنگ‌های سنتزی در فرآورده‌های مختلف غذایی به خصوص محصولات مورد علاقه کودکان، اهمیت توجه به تولید و کاربرد رنگ‌های خوراکی طبیعی را نمایان‌تر می‌سازد. دستیابی به فناوری تولید رنگ‌های طبیعی و کاربرد آن‌ها در محصولات غذایی و در نتیجه اعتلای سطح تغذیه و سلامت جامعه در پرتو برخورداری متخصصان و دست‌اندرکاران صنعت غذا از آگاهی‌های علمی مربوط و دانشی اصیل، عمیق و خلاق از مبحث رنگ‌های طبیعی امکان‌پذیر خواهد بود. با گسترش استفاده از مواد رنگی در مواد غذایی که اکثراً به طور سنتزی تهیه شده و در اختیار تولیدکنندگان قرار داده می‌شود نیاز به استفاده از ماده رنگی که طبیعی بوده و رنگ‌دهی خوبی داشته باشد بسیار جالب توجه است. در همین راستا کورکومین، ماده رنگی ریشه گیاه زردچوبه توجه زیادی را به خود جلب کرده است. زردچوبه به سبب ویژگی‌های منحصر به فرد سلامتی‌زایی‌اش در سراسر جهان به عنوان یک ماده غذایی فراویژه شناخته شده است. امروزه مطالعات مختلف نشان داده است که کورکومین دارای ویژگی‌های عملکردی چشمگیری

است و خواص مختلف از جمله خاصیت آنتی اکسیدانی، خاصیت ضد التهابی، محافظت کنندگی از کبد و کلیه، جلوگیری از تشکیل لخته‌های خون و بروز سکت قلبی، کاهش قند خون، خواص ضد میکروبی و سایر خواص آن مورد بحث و تحقیق است. همچنین در حال حاضر زردچوبه به خاطر خواص رنگی، طعم‌دهندگی و قدرت نگهدارندگی در صنایع غذایی مختلف مانند مارگارین، کره، دسرها، نوشابه‌ها، سس‌ها و غیره بسیار مورد توجه می‌باشد.

کورکومین با نام شیمیایی دی‌فرولیلمتان<sup>۱</sup> ( $C_{12}H_{20}O_6$ ) یک پلی‌فنل هیدروفوب مشتق شده از گیاه زردچوبه<sup>۲</sup> است. ریزوم زردچوبه حاوی سه آنالوگ رنگی مهم شامل کورکومین، دمتوکسی‌کورکومین<sup>۳</sup> (DMC) و بیس‌دمتوکسی‌کورکومین<sup>۴</sup> (BDMC) می‌باشد که در مجموع کورکومینوئید نامیده می‌شوند. این ترکیبات عامل ایجاد رنگ زردچوبه هستند که در موقعیت گروه متوکسی بر روی حلقه آروماتیک با یکدیگر متفاوتند. در میان این سه، کورکومین از همه فراوانتر است. به منظور استخراج رنگدانه‌ها از روش‌های مختلفی نظیر روش خیساندن، روش پرکولاسیون، روش هضم، روش دم کردن، روش جوشاندن، روش سوکسله و غیره استفاده می‌شود. در میان روش‌های فوق‌الذکر روش خیساندن به دلیل هزینه پایین، عدم نیاز به تجهیزات خاص و سهولت بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد.

از گستره وسیعی از حلال‌های مختلف نظیر هگزان، بنزن، اتر، ایزوپروپانول، دی‌کلرو اتان، اتانول، متانول، اتیل استات، اتیل‌متیل‌کتون و استن برای استخراج کورکومین استفاده می‌شود. در میان حلال‌های فوق، حلال استن و اتانول مناسب‌ترین و ارزشمندترین حلال می‌باشد.

هدف از این پژوهش بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگدانه کورکومین از ریزوم زردچوبه با استفاده از امواج فراصوت و مقایسه آن با روش متداول (ماسراسیون) می‌باشد.

<sup>1</sup> Diferuloylmethane

<sup>2</sup> Curcuma Longa

<sup>3</sup> Demethoxycurcumin

<sup>4</sup> Bis-demethoxycurcumin

## فهرست مطالب

شماره صفحه	عنوان
2	فصل اول: کلیات تحقیق
4	1-1- افزودنی‌های غذایی مورد استفاده در صنعت غذا
4	1-2- اهمیت تولید رنگ‌های خوراکی از منابع طبیعی
4	1-2-1- اهمیت رنگ در افزایش بازار پسندی محصولات غذایی
5	1-2-2- کاربرد گسترده رنگ‌ها در صنایع غذایی
9	1-2-3- اهمیت رنگ‌های طبیعی و مضرات رنگ‌های سنتتزی از دیدگاه سلامت عمومی
11	1-2-4- ضرورت تولید رنگ‌های طبیعی در ایران
14	1-3-1- طبقه‌بندی رنگ‌های خوراکی
16	1-3-1-1- کاروتنوئیدها در مواد غذایی
17	1-3-1-1-1- منابع عمده کاروتنوئیدها
24	1-3-1-2- کاربرد کاروتنوئیدها به عنوان رنگ‌های طبیعی
25	1-3-1-2-1- بتاکاروتن
26	1-3-1-2-2- لوتئین

لیکوپن									-3-2-1-3-1	28
اناتو									-2-1-3-1	30
پاپریکا									-2-1-3-1	32
غذایی	مواد	در		کلروفیل‌ها					-2-3-1	35
کلروفیل	از	سرشار		غذایی	منابع				-1-2-3-1	36
فرایند	و	نگهداری	حین	در	کلروفیل	پایداری			-2-2-3-1	39
غذایی	مواد	در		آنتوسیانین‌ها					-3-3-1	40
گیاهی	رنگ‌دهی	عوامل	و	طبیعی	رنگ‌های	سایر			-4-3-1	41
قرمز				چغندر					-1-4-3-1	42
کارامل									-2-4-3-1	42
سبزی‌جات		کرینه		رنگ					-3-4-3-1	44
زعفران									-4-4-3-1	44





3-5-1	مکانیسم های تاثیر گذار امواج فراصوت در فرآوری مواد غذایی	62
4-5-1	کاربرد امواج فراصوت در صنایع غذایی	63
1-4-5-1	کنترل فرآیندهای غشایی	63
2-4-5-1	کنترل فرآیند کریستالیزاسیون	64
3-4-5-1	تولید ترکیبات آلی	64
4-4-5-1	بهینه سازی استخراج ترکیبات آلی	64
5-5-1	آثار مثبت امواج فراصوت در استخراج	66
6-5-1	کارایی امواج فراصوت در مراحل مختلف فرایند استخراج	68
فصل دوم: پیشینه تحقیق		
2-	پژوهش های انجام شده در زمینه استخراج کورکومین	74
1-2-	استخراج به کمک حلال	74
1-1-2-	استخراج کورکومین به کمک حلال	78
2-2-	بررسی روش های آنالیز کورکومین استخراج شده و پایداری آن	84

2-3- پژوهش‌های انجام شده در زمینه استخراج ترکیبات آلی توسط امواج فراصوت

87

2-3-1- استخراج روغن‌ها و عصاره گیاهی

87

2-3-2- استخراج پروتئین

89

2-3-3- پلی‌فنول‌ها

89

2-3-4- آنتوسیانین‌ها

90

2-3-5- اسید تارتاریک

91

2-3-6- ترکیبات معطر

91

2-3-7- پلی‌ساکاریدها و ترکیبات کارکردی

92

2-3-8- استخراج ترکیبات فعال زیستی از منابع حیوانی

93

فصل سوم: روش اجرای تحقیق

3-1- مواد شیمیایی

95

3-2- روش‌ها

95

3-2-1- آماده‌سازی ماده جامد

					95	
جداسازی	روغن‌های	از	زردچوبه	-2-2-3	95	
نحوه	استخراج		کور کومین	-3-2-3	96	
تعیین	مقدار	کور کومین	استخراج شده	-4-2-3	97	
تهیه	پودر	کور کومین	از عصاره	کور کومین	به دست آمده	-5-2-3
طیف	سنجی	تشدید	مغناطیسی	هسته	-6-2-3	
					100	
دستگاه	طیف‌سنج	NMR		-1-6-2-3	101	
کروماتوگرافی	لایه	نازک		-7-2-3	101	
بهبودسازی	و	تجزیه	و	تحلیل	آماری	-3-3
					103	
					-1-3-3	
					103	
متدولوژی	رویه	پاسخ		-2-3-3	103	
					103	
تئوری	RSM			-3-3-3	105	
انتخاب	متغیرهای	مستقل	و	سطوح	آن‌ها	-1-3-3-3

	106
ارائه گرافیکی رابطه مدل و تعیین شرایط عملیاتی بهینه	3-3-3-2
	109
مزایای RSM	3-3-3-3
	109
طرح آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها	3-3-4
	110
RSM و بهینه‌سازی با استفاده از روش متداول	3-3-4-1
	110
RSM و بهینه‌سازی شرایط استخراج با استفاده از امواج فراصوت	3-3-4-2
	114
فصل چهارم: یافته‌های تحقیق	
مدل‌سازی RSM	4-1
	118
گزینه‌ش مدل مناسب	4-1-1
	118
تجزیه مدل برازش یافته	4-1-2
	122
تاثیر متغیرهای مستقل بر پاسخ	4-1-3
	124
تاثیر امواج فراصوت در بهینه‌سازی استخراج	4-2
	125
فصل پنجم: تجزیه و تحلیل یافته‌های تحقیق	
بهینه‌سازی شرایط استخراج به روش متداول (ماسراسیون)	5-1

				130
134			بهینه‌سازی	5-1-1-1
فراصوت	امواج	از	استفاده	با
			استخراج	کوره کومین
			بهینه‌سازی	5-2
				138
NMR		طیف‌سنج	دستگاه	نتایج
				5-3
				144
نازک	لایه		کروماتوگرافی	نتایج
				5-4
				144
پیشنهادات		و	گیری	نتیجه
				5-5
				144
یابی			بهینه	
				5-6
				146
				فهرست منابع و ماخذ

Archive of SID

**فصل اول**  
**کلیات تحقیق**

## 1-1- افزودنی‌های غذایی مورد استفاده در صنعت غذا

افزودنی‌های غذایی از قبیل رنگ‌دهنده‌های طبیعی و مصنوعی، طعم‌دهنده‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیبات ضد میکروبی و پایدارکننده‌ها مواد مفیدی هستند که امروزه از آنها به منظور بهبود کیفیت، ارتقاء ارزش تغذیه‌ای و رفع مشکلات تکنولوژیکی تولید مواد غذایی استفاده می‌شود. اهمیت این افزودنی‌ها به حدی است که بدون بهره‌گیری از آنها، تولید و مصرف بسیاری از اقلام و فرآورده‌های غذایی غیر ممکن می‌باشد. این دسته از مواد بر حسب نوع کاری که در سیستم غذایی انجام می‌دهند به گروه‌های مختلفی تقسیم می‌شوند (7، 33 و 66):

1. شیرین کننده‌ها: شیرین کننده‌ها به هر نوع شیرین کننده به غیر از شکر اطلاق می‌شود که به منظور کاهش کالری غذاها و کنترل چاقی، کنترل دیابت و نیز جلوگیری از پوسیدگی دندان‌ها به مواد غذایی افزوده می‌شود. از این موارد می‌توان به سوربیتول، مالیتول، ساکارین، اسپارتام، گلیسرول، مانیتول و گزلیتول اشاره کرد.
2. نگهدارنده‌ها: نگهدارنده‌ها شامل مواد شیمیایی طبیعی و یا مصنوعی هستند که به منظور به تعویق انداختن فساد مواد غذایی استفاده می‌گردند. موادی نظیر نیترات سدیم، نیتريت سدیم، دی اکسید سولفور، نمک، شکر و یا سرکه در این دسته قرار می‌گیرند.
3. عوامل تشکیل دهنده کمپلکس: این ترکیبات نقش مهمی در ثبات مواد غذایی دارند بطوری که با ایجاد کمپلکس با یون‌های فلزی سبب پایداری محصولات غذایی می‌شوند. از این گروه می‌توان به اسید سیتریک و مشتقات آن، فسفات‌های مختلف و EDTA اشاره کرد.
4. جاذب رطوبت: بعضی از ترکیباتی که دارای چندین گروه هیدروکسیل هستند، دارای خاصیت جذب رطوبت مشخص می‌باشند. این مواد برای جذب رطوبت و ایجاد بافت خاص و نرم

1. Sweeteners  
2. Preservatives  
3. Chelating Agent  
4. Humectant





در بعضی اقسام غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. به عنوان مثال می‌توان به ترکیباتی چون پروپیلن گلیکول و سوربیتول اشاره کرد.

5. طعم‌دهنده‌ها: این مواد طعم و بوی خاصی به مواد غذایی می‌بخشند موادی نظیر ادویه‌جات، اولئورزین‌ها، روغن‌های اسانسی و عصاره‌های طبیعی در این گروه قرار می‌گیرند.

6. تثبیت‌کننده‌ها: این مواد مانند آگار و پکتین قوام و استحکام بافت مواد غذایی را افزایش می‌دهند.

7. غلیظ‌کننده‌ها: این افزودنی‌ها مانند نشاسته، کلاژن، زرده تخم مرغ، آگار، ژلاتین و پکتین با جذب آب موجود در مواد غذایی، ویسکوزیته (گرانروی) مواد غذایی را افزایش می‌دهند.

8. رنگ‌دهنده‌ها: این مواد به منظور جبران رنگ از دست رفته طی فرآوری محصولات و نیز جهت ایجاد ظاهر جذاب در مواد غذایی کاربرد دارند. کارامل و زعفران دو نمونه از رنگ دهنده‌های طبیعی می‌باشند.

9. امولسیون‌کننده‌ها: امولسیون به مخلوط دو ماده (مایع) امتزاج ناپذیر اطلاق می‌گردد. امولسیون‌کننده‌ها مخلوط‌های امولسیون را پایدار نگه داشته و از دو فاز شدن مخلوط ممانعت می‌نمایند. مواردی از قبیل لستین، کاراگینان و گلیسرول در این گروه قرار می‌گیرند.

10. آنتی اکسیدان‌ها: آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان نگهدارنده (با جلوگیری از تاثیر اکسیژن بر غذا) و یا به عنوان مواد مفید برای سلامتی به فرآورده‌های غذایی افزوده می‌گردند. آنتی‌اکسیدان‌ها مانند ویتامین C از اکسیدشدن چربی‌ها و روغن‌های غیراشباع، رنگ‌ها و طعم دهنده‌ها جلوگیری می‌کنند.

1. Flavours
2. Stabilizers
3. Thickeners
4. Food Coloring
5. Emulsifiers
6. Antioxidants

11. حجم دهنده‌ها<sup>۱</sup>: این مواد مانند نشاسته حجم مواد غذایی را افزایش می‌دهند.
12. ضدکلوخه‌ساز<sup>۲</sup>: این مواد از به هم فشردن و تشکیل کلوخه مواد پودری شکل مانند نمک و یا شیرخشک جلوگیری می‌کنند. از این مواد می‌توان به سیلیکات کلسیم، استئارات کلسیم، سیلیکات منیزیم اشاره کرد.
13. ضدکف<sup>۳</sup>: این مواد تشکیل کف و یا گاز در مواد غذایی را کاهش داده و یا حذف می‌کنند، موادی مانند پروپیلن گلایکول جزو این دسته قرار می‌گیرند.
14. تنظیم کننده اسیدیته<sup>۴</sup>: این دسته از مواد نظیر تارتارات سدیم و اسید لاکتیک برای تغییر و یا تنظیم درجه اسیدی و یا قلیایی مواد غذایی استفاده می‌گردند.
15. اسیدها: اسیدها نوعی افزودنی هستند که به عنوان طعم دهنده، آنتی‌اکسیدان و یا نگهدارنده از آنها استفاده می‌شود. مهمترین آنها اسید مالیک، اسید تارتاریک، اسید لاکتیک، اسید فرماریک و اسید سیتریک است.  
در بین افزودنی‌های فوق‌الذکر رنگ‌دهنده‌ها به واسطه کاربرد گسترده آنها در فرمولاسیون انواع مختلف محصولات غذایی از اهمیت قابل توجهی برخوردار هستند که در بخش ذیل به پاره‌ای از دلایل اهمیت آنها اشاره می‌شود.

## 1-2-1- اهمیت تولید رنگ‌های خوراکی از منابع طبیعی

### 1-2-1-1- اهمیت رنگ در افزایش بازار پسندی محصولات غذایی

اولین ویژگی کیفی که توسط یک مصرف کننده مواد غذایی مورد توجه قرار می‌گیرد، خصوصیت ظاهری محصول می‌باشد. در حقیقت مصرف کننده قبل از داشتن هرگونه اطلاعی از سایر خصوصیات ماده غذایی از قبیل طعم و یا بوی آن، در درجه اول ظاهر محصول را مورد توجه قرار

1. Bulking Agents
2. Anticaking Agent
3. Antifoaming
4. Acidity Regulator



می‌دهد. بنابراین ظاهر مواد غذایی عامل مهم و تعیین کننده‌ای است که به خصوص در اولین بار خرید یک محصول یا عدم خرید آن، نقش اساسی را ایفا می‌کند. یکی از این عوامل ظاهری رنگ می باشد که عامل موثر در جلب نظر و انتخاب ماده غذایی است که از طریق احساس دریافت می‌گردد و وجود آن در تشخیص سریع پذیرش نهایی هر فرآورده غذایی موثر می‌باشد و در واقع رنگ باعث جذابیت ماده غذایی می‌گردد و نشانگر کیفیت می باشد (13، 33 و 43).

اگر چه ممکن است از نظر ترکیبات در خصوصیات فیزیکی شیمیایی بین رنگ و عطر و طعم مواد غذایی رابطه علمی وجود نداشته باشد، ولی نتایج آزمایش‌های چشائی نشان می‌دهد که در اکثر موارد رنگ مطلوب، بر احساس عطر و طعم ماده غذایی اثر مثبت و قابل ملاحظه ای دارد (31 و 79).

### 1-2-2- کاربرد گسترده رنگ‌ها در صنایع غذایی

رنگ‌ها کاربرد وسیعی در صنایع غذایی مختلف اعم از صنایع تولید کیک و شیرینی، بستنی‌ها و دسرهای منجمد، اسنک‌ها، نوشیدنی‌ها، صنایع شکلات‌سازی و... دارند. انتخاب رنگ مناسب در مواد غذایی بهترین تبلیغ برای مصرف است. جدول 1-1 اهمیت و گستره وسیع کاربرد برخی از رنگ‌های مجاز را در صنایع غذایی نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود از انواع رنگ‌ها در گستره وسیعی از محصولات غذایی که رژیم غذایی عموم مردم را تشکیل می‌دهد استفاده می‌شود.



نام رنگ	فرآورده‌های غذایی مختلف
بتا کاروتن	انواع نوشیدنی‌ها، غلات صبحانه، کره، آب نبات، کنسرو میوه جات، فرآورده‌های لبنی، آدامس، فرآورده‌های قنادی، سس‌ها، غذاهای رژیمی، فرآورده‌های گوشتی، تخم مرغ، دسرها، روغن‌های نباتی، مربا، مارمالاد، انواع سوپ‌های آماده و فرآورده‌های تخمیری سبزیجات.
سانست یلو	انواع نوشیدنی‌ها، غلات صبحانه، آدامس، فرآورده‌های لبنی، شکلات، فرآورده‌های قنادی، فرآورده‌های گوشتی، نوشیدنی بر پایه لبنی، فرآورده‌های غلات، کیک‌ها، دسرها، فرآورده‌های تخمیری سبزیجات، تخم مرغ، پاستیل‌ها، مربا، مارمالاد، ژله، ماکارونی، سس‌ها و محصولات مشابه، انواع مختلف اسنک و انواع سوپ‌های آماده.
بیت رد	نوشابه‌های لبنی (شیر کاکائو، دوغ و...)، فرآورده‌های یخی، آب میوه‌ها، م‌الشعیر، غذاهای رژیمی، سس‌ها و ماکارونی.
برلیانت بلو	نوشیدنی‌های لبنی، دسرها، ایمیوه‌ها، اسنک‌ها، نوشابه‌ها، آدامس و فرآورده‌های یخی.
کارامل 1	پودر شیر و خامه، دسر برپایه لبنی، میوه‌های فرآوری شده، فرآورده‌های قنادی، ماکارونی، خمیرمایه و م‌الشعیر.
ریبوفلاوین‌ها	آب نبات، کمپوت میوه، آدامس، نوشابه‌های انرژی زا، غذاهای نیمه آماده، اسنک‌ها، فرآورده‌های گوشتی، سس‌ها و محصولات مشابه، مربا، ژله، مارمالاد و دسرهای میوه‌ای.
دی اکسید تیتانیوم	پودر شیر و خامه، نوشیدنی‌های لبنی، آب پنیر، فرآورده‌های یخی، فرآورده‌های غلات، م‌الشعیر، خمیرترش، غذاهای نیمه آماده و فرآورده‌های قنادی.

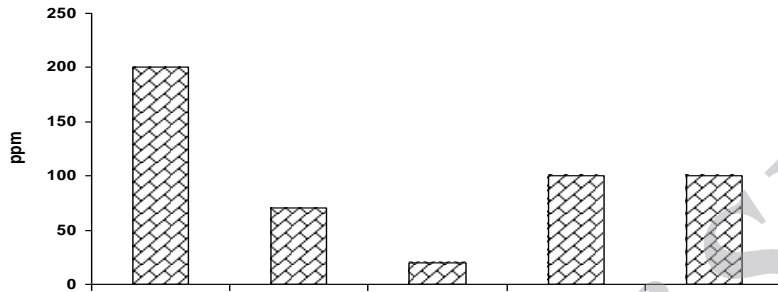
مأخذ: FAO و Codex Alimentarius

نوع و مقدار استفاده از رنگ‌ها در کشورهای مختلف متفاوت است و حد مجاز آنها در فرآورده‌های غذایی بسته به استاندارد کشورهای مختلف فرق می‌کند. به عنوان نمونه، حد مجاز مصرف سانست یلو در برخی از فرآورده‌های تولیدی مربوط به تعدادی از کشورها در شکل 1-1 نشان داده شده است. (2، 26، 93، 100، 101 و 104).

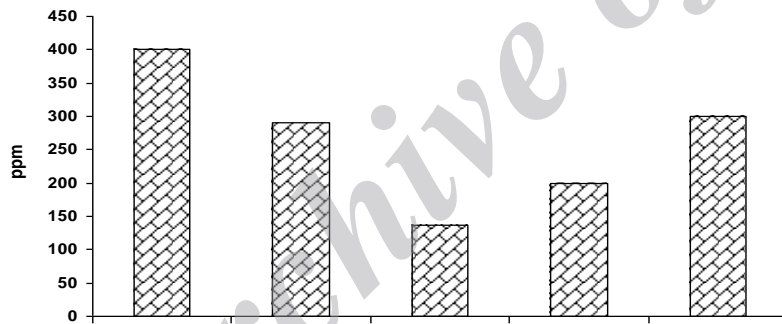
شکل 1-1- حد مجاز مصرف رنگ خوراکی سانست یلو در نمونه‌های از فرآورده‌های غذایی برخی از

کشورهای جهان

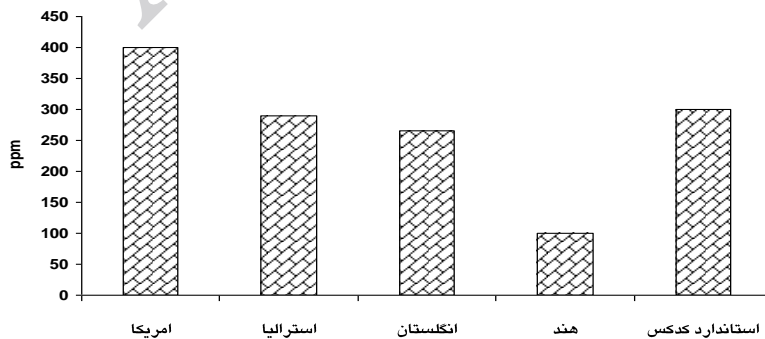
نوشیدنی‌ها و آبمیوه



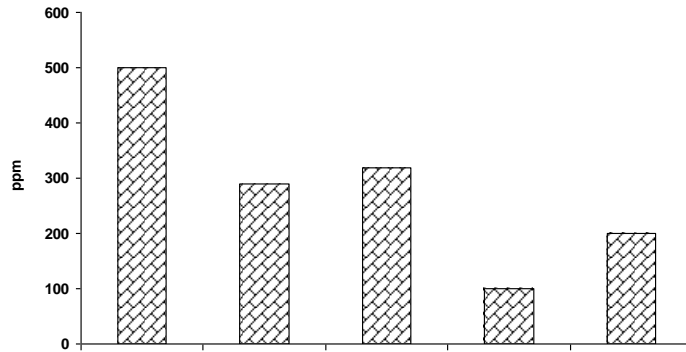
ژله‌ها



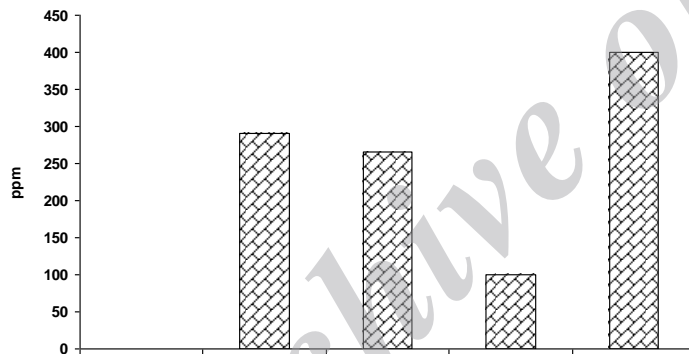
آبنبات



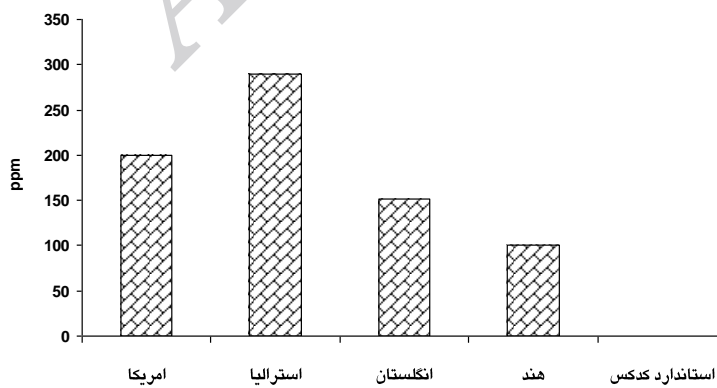
چیپس و پفک



شکلات



کیک و بستنی



### 1-2-3- اهمیت رنگ‌های طبیعی و مضرات رنگ‌های سنتزی از دیدگاه سلامت

#### عمومی

صنعت غذا، طی سالیان متمادی به منظور بهبود ویژگی‌های مورد نظر مصرف‌کننده از انواع مختلف مواد افزودنی نظیر رنگ‌های مصنوعی، شیرین‌کننده‌های مصنوعی، طعم‌دهنده‌ها، مواد معطر، مواد سفیدکننده، مواد نگهدارنده و بافت‌دهنده در محصولات صنعتی استفاده می‌کند که متأسفانه برخی از این مواد به شدت برای سلامتی انسان مضر است.

لازم به ذکر است که اثرات برخی از این مواد خفیف بوده و اختلالات و عوارض ناشی از آنها با مصرف مستمر و طولانی‌مدت و به تدریج بروز نموده و سلامت افراد به ویژه گروه‌های آسیب پذیر جامعه (کودکان و نوجوانان) را با خطرات جدی روبه‌رو می‌سازند. رنگ‌های مصنوعی که در نوشیدنی‌های گازدار، آب‌نبات‌ها، غلات صبحانه، ژله‌ها و بسیاری از محصولات دیگر به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند، جزو این دسته از افزودنی‌ها هستند که بیشتر به منظور جذب مشتری، پوشش دادن رنگ واقعی محصول و تشدید رنگ در ماده غذایی کاربرد دارند (19، 48 و 68).

طبق تحقیقات انجام شده توسط محققان انگلیسی، رنگ‌های مصنوعی باعث تشدید نا آرامی و بی‌قراری در کودکان 3 تا 9 ساله می‌شوند. نتایج آزمایش‌های انجام شده بر روی 300 کودک توسط آنها نشان می‌دهد که وقتی کودکان از آب میوه‌های حاوی رنگ دهنده‌های سنتزی موجود در بازار استفاده می‌کنند تغییرات جدی و مهمی در رفتار آنها شامل بیش‌فعالی غیرطبیعی و بی‌قراری بروز می‌کند (26 و 66).

تیم تحقیقات استیونسون که تاثیرات افزودنی‌های خوراکی را بر روی کودکان به مدت چند سال مطالعه کرده‌اند، آزمایشات خود را بر روی دو گروه کودکان 3 ساله و کودکان 8 تا 9 ساله انجام

دادند. نتایج آنها نشان داد با حذف کردن افزودنی‌های مصنوعی از مواد خوراکی، از انواع رفتارهای ناآرام و بی‌قرار کودکان جلوگیری می‌شود (66).

محققان دانشگاه سوت همپتون بیان کردند هفت افزودنی رنگ‌دهنده سنتزی از قبیل تارترازین، زرد کویولین، زرد سانست‌یلو، کارموسین، پونسائو و قرمز آلورا باعث آسیب رشدی و کاهش قدرت تمرکز شده و ضریب هوشی کودکان را تا پنج نمره کاهش می‌دهد. همچنین این مواد رنگی غذایی باعث ایجاد مشکلات رفتاری در کودکان مثل تغییر خلق و خوی، بیش‌فعالی و واکنش‌های آلرژیک می‌شوند (105).

اخیرا محدودیت‌های بسیاری از جانب سازمان‌های بین‌المللی و انستیتوهای تحقیقاتی مانند انستیتو ملی سرطان در مورد استفاده از رنگ‌های مصنوعی خوراکی بیان شده است (72). لذا در سطح جهانی مطالعه و جستجو برای یافتن پیگمان‌های طبیعی مناسب به‌عنوان رنگ افزودنی آغاز شده است. پیگمان‌های طبیعی اثرات سوء ذکر شده برای رنگ‌های مصنوعی را نداشته و در تحقیقات مختلف تأثیرات مثبت آنها بر سلامت عمومی به دفعات مورد تأیید قرار گرفته است (10).

آنتوسیانین‌ها که از مهمترین رنگدانه‌های طبیعی گیاهی در صنعت غذا می‌باشند در کنار خاصیت رنگ‌دهی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده و نقش حیاتی در جلوگیری از بروز بیماری‌های قلبی-عروقی، عصبی، سرطان و دیابت ایفا می‌کنند. همچنین برای آنتوسیانین‌ها خصوصیات ضد التهابی، پایداری جدار مویرگ‌ها و کاهش نفوذ پذیری عروق در منابع علمی ذکر شده است (22، 52، 68 و 90).

کاروتنوئیدها نیز به‌عنوان عوامل ضدسرطان، افزایش‌دهنده طول عمر و بازدارنده زخم معده و بیماری‌های قلبی - عروقی معرفی شده‌اند. بطوری‌که انستیتو ملی سرطان ایالات متحده امریکا مصرف غذاهای حاوی مقادیر زیاد کاروتنوئید را در رژیم غذایی روزانه توصیه نموده است (53 و 72).





در ایران در سال‌های اول دهه 1360 بدلیل استفاده از رنگ‌های غیر مجاز در اغلب فرآورده‌های غذایی، ابتدا مصرف رنگ ممنوع اعلام گردید، ولی با توجه به استفاده گسترده از انواع رنگ‌ها در فرآورده‌های غذایی مختلف این ممنوعیت موثر واقع نگردید و مشکلات بسیاری را بوجود آورد. در حال حاضر در صنایع غذایی مختلف موجود در کشور از رنگ‌های مصنوعی وارداتی جهت تولید محصولات مختلف استفاده می‌شود.

### 1-2-4- ضرورت تولید رنگ‌های طبیعی در ایران

وجود شرایط متنوع اقلیمی در ایران و نیز منابع گوناگون گیاهی و حیوانی، زمینه تولید رنگ‌های غذایی با منشأ طبیعی در کشور را بسیار مساعد ساخته است. طبق بررسی‌های انجام شده، در حال حاضر رنگ‌های خوراکی مصرفی در کارخانجات موجود در کشور از نوع رنگ‌های مصنوعی و سنتزی می‌باشند که از کشورهای مختلف وارد می‌شوند و هیچ واحد صنعتی برای تولید رنگ‌های خوراکی با منشأ طبیعی در داخل کشور وجود ندارد (4 و 102). برابر آمار تهیه شده از شرکت‌های واردکننده مواد افزودنی، قیمت رنگ‌های طبیعی وارداتی بالا بوده و از این طریق ارز فراوانی از کشور خارج می‌شود. طبق گزارش اداره گمرک جمهوری اسلامی ایران در سال‌های 1385 و 1386 جمعاً در حدود 4,127,799,134 هزار ریال به صورت ارز بابت رنگ‌های خوراکی و غیرخوراکی وارداتی از کشور خارج شده است. همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد که میزان واردات این مواد سیر صعودی دارد (103).

جدول 1-2 تعداد واحدهای غذایی مصرف کننده رنگ را به همراه میزان تولید آنها در سال 86 نشان می‌دهد. مطابق این جدول، در حال حاضر حدود 672 واحد صنعتی با تولید حدود 39,695,186 هزار تن در کشور وجود دارند که از رنگ‌های مجاز خوراکی استفاده می‌کنند. این آمار در مقایسه با کل تولید فرآورده‌های غذایی کشور، درصد بالایی را تشکیل می‌دهد (4).



برای نشان دادن اهمیت موضوع، به عنوان نمونه مقدار مصرف رنگ سانست یلو در صنایع نوشابه‌سازی و ماکارونی در کشور محاسبه شده و در جدول 1-3 نشان داده شده است.

جدول 1-2- تعداد و نوع واحدهای غذایی مصرف کننده رنگ در فرآورده‌های غذایی و میزان کل تولید

سالانه آنها در کشور (1386)

تولید (تن)	تعداد	نام صنعت
36481149	108	نوشابه‌های غیر الکلی
1486445	20	صنایع تولید روغن‌های نباتی جامد
1134515	17	ذرت بو داده (پاپ کورن)
157810	8	روغن مارگارین و مشابه
97411	115	آب نبات
84095	9	نوشابه بر اساس انسانس طبیعی
72266	38	بستنی یخی - یخ‌مک
55699	52	پفک ذرت
26477	23	انواع شکلات کاکائویی و نقل و نبات
25741	45	آب پنیر
22786	53	ژله میوه
19404	15	ژله، مارمالاد و پودر ژلاتین
11595	115	غلات حجیم شده
6597	13	پودر پنیر
6143	25	پودر نوشابه
5000	11	ورمیشل
1183	5	بستنی میوه ای
39695186	672	جمع کل

مأخذ: آمارنامه اداره صنایع و معادن تا ابتدای سال 1387



جدول 1-3- میزان مصرف رنگ سانسیت یلو محاسبه شده در دو محصول غذایی پرمصرف نوشابه و

ماکارونی در ایران و جهان

فرآورده غذایی	نوشابه	ماکارونی
مصرف سرانه کشور در سال	42 لیتر	12 کیلوگرم
کل مصرف کشور (کیلوگرم)	996,010,000	350,000,000
مصرف رنگ در کشور (تن در سال)	99,601	105,000

مأخذ: Codex Alimentarius و سایت Foodna

در حال حاضر در دنیا استحصال رنگ از منابع طبیعی گیاهی به عنوان یک فناوری رایج وجود دارد. به عنوان مثال در سال 1997 بخش عمده ای از واردات زردچوبه در امریکا (حدود 2043 تن) در صنایع تولید رنگ استفاده شده است (31). جستجو در سایت معتبر تجاری خرید و فروش محصولات در دنیا، (Alibaba.com) نشان داد در حال حاضر در حدود 4304 واحد تولید کننده رنگ طبیعی جهت مصرف در صنایع غذایی و نوشیدنی در این سایت وجود دارد که این موضوع نشان دهنده بالا بودن میزان مصرف رنگ‌های طبیعی در دنیا می باشد.

لذا با توجه به پتانسیل بالای منابع طبیعی بالقوه جهت استخراج رنگ، تعداد زیاد صنایع غذایی مصرف کننده رنگ، عدم وجود واحدهای تولید کننده رنگ‌های طبیعی در کشور، بالا بودن قیمت رنگ های طبیعی وارداتی و به موازات آن خروج ارز فراوان از این طریق، همگی نشان دهنده اهمیت تولید رنگ های خوراکی با منشأ طبیعی در داخل کشور می باشند (99).

### 1-3- طبقه‌بندی رنگ‌های خوراکی

رنگدانه‌ها را گروهی از رنگ‌های طبیعی می‌دانند که در فرآورده‌های حیوانی و گیاهی یافت می‌شوند. در متون مربوط به شیمی رنگ، رنگدانه‌ها را این گونه تعریف می‌کنند که این ترکیبات

در حلال و محیطی که به کار برده می‌شوند نامحلول هستند، در حالی که رنگ‌ها در مایع و حلالی که به کار برده می‌شوند، محلول و یا نسبتاً محلول می‌باشند. واضح است که اکثر رنگدانه‌های گیاهی موجود، در آب محلولند مانند آب میوه‌ها که مثال روشنی در این مورد می‌باشند و مطابق تعریف شیمیدانان نساجی و رنگ باید به عنوان رنگ مد نظر قرار گیرند (34 و 86).

به طور کلی در طبقه‌بندی رنگ‌های خوراکی دو روش به کار برده می‌شود: روش اول که بر پایه منشا رنگ خوراکی استوار است و روش دوم مبتنی بر ساختمان شیمیایی رنگ می‌باشد. منشا رنگ خوراکی می‌تواند طبیعی، شبه طبیعی<sup>1</sup> یا مصنوعی باشد. بهترین تعریف ارائه شده برای رنگ‌های طبیعی این است: "رنگ طبیعی رنگی است که از یک سلول زنده تهیه، جمع‌آوری یا ترشح شده باشد." رنگ‌های شبه طبیعی آن دسته از رنگ‌هایی هستند که از طریق واکنش‌های شیمیایی سنتز می‌شوند به گونه‌ای که ساختمان شیمیایی آن‌ها با ساختمان رنگ طبیعی مطابقت دارد. رنگ‌های مصنوعی آن دسته از رنگ‌هایی هستند که به طریق شیمیایی سنتز شده و در طبیعت به صورت طبیعی وجود ندارند (60 و 97).

در طبقه‌بندی رنگ‌های خوراکی بر اساس فرمول شیمیایی، سه مجموعه از ترکیبات شیمیایی برای رنگ‌های خوراکی طبیعی در نظر گرفته شده‌اند که شامل مشتقات ایزوپرنوئیدها، مشتقات تتراپیرول‌ها و مشتقات بنزوپیروان‌ها می‌باشند، اما دسته چهارمی نیز تحت عنوان محصولات مصنوعی به آن افزوده شده که شامل ملانوئیدین‌ها و کارامل‌ها می‌باشد. جدول 1-4 تقسیم‌بندی رنگ‌های خوراکی را بر اساس ساختمان شیمیایی نشان می‌دهد (60 و 88).

جدول 1-4- طبقه بندی رنگ‌های خوراکی طبیعی بر اساس ساختار شیمیایی

گروه اصلی	زیر گروه
مشتقات ایزوپرنوئیدها	کاروتنوئیدها

<sup>1</sup>-nature-identical

گزانتوفیل‌ها	
کلروفیل‌ها	مشتقات تتراپیرول
پورفیرین‌ها	
آنتوسیانین‌ها	مشتقات بنزوپیران
فلاون‌ها	
فلاونوئیدها	
تانن‌ها	
ملانوئیدین‌ها	ترکیبات شبه طبیعی
کارامل‌ها	
فلانون‌ها	ترکیبات دیگر
بتالائین‌ها	
آنتراکینون‌ها	

### 1-3-1- کاروتنوئیدها در مواد غذایی

عصاره‌های غنی از کاروتنوئید را می‌توان برای اهداف رنگ کردن و همچنین مصرف غذایی به عنوان ترکیبات فعال بیولوژیکی مورد استفاده قرار داد. اصلاحات ژنتیکی و اصلاح نژاد می‌تواند مقادیر کاروتنوئیدها را در گیاهان افزایش دهد که این امر منجر به تولید غذاهایی می‌شود که از نظر کاروتنوئید غنی هستند و می‌توان از آن‌ها به طور مستقیم به عنوان مواد مغذی و یا به عنوان منبع اولیه استخراج رنگ زرد یا قرمز طبیعی استفاده کرد (34 و 57).

فرایند کردن، بخشی مهم از زنجیره غذایی به شمار می‌رود که مزه، طعم و ظاهر بسیاری از انواع فراورده‌های غذایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. علاوه بر این، فرایند کردن سبزی‌ها و میوه‌ها به عنوان راهکاری برای آزاد کردن کاروتنوئیدها از مخلوط‌های غذایی آن‌ها شمرده می‌شود که دستیابی بیولوژیکی این ترکیبات را افزایش می‌دهد (60).



از سوی دیگر، فرایند کردن می‌تواند باعث انهدام ترکیبات مغذی نظیر کاروتنوئیدها شود. کاروتنوئیدها به دلیل حضور چندین پیوند مزدوج (کونژوگه)، در برابر تأثیر حرارت‌های بالا، pH پایین، حضور نور و اکسیژن فعال بسیار حساس بوده و منهدم می‌شوند. انهدام منجر به احیای کاروتنوئیدهای فعال و یا تبدیل آن‌ها به ایزومرهای سیس می‌شود که ترکیباتی با رنگ‌ها و خصوصیات متفاوت ایجاد می‌کند. معمولاً ایزومرهای سیس از نظر ترمودینامیکی نسبت به اشکال ترانس، پایداری کمتری دارند (21 و 88).

مواد غذایی مختلف تحت شرایط متفاوت فرایند و نگهداری که ترکیبی از درجه حرارت‌ها و زمان‌های مختلف است قرار می‌گیرند. هنوز روش مشخصی برای محاسبه میزان باقی ماندن کاروتنوئیدها در مواد غذایی گزارش نشده است. علاوه بر این، ترکیبات داخلی مواد غذایی نقش حساسی دارند که این امر به دلیل ساختمان کاروتنوئیدها و غلظت آن‌ها، حضور و غلظت آنزیم‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و پرواکسیدان‌ها و تأثیر آن‌ها بر میزان انهدام کاروتنوئیدها می‌باشد. کاروتنوئیدها پایداری ضعیفی در محیط‌های طبیعی غذایی دارند، اما این رنگدانه‌ها به هنگام ایجاد برش در سلول‌ها ناپایداری بیشتری دارند و حتی در حلال‌های آلی بیشترین ناپایداری را دارند (60).

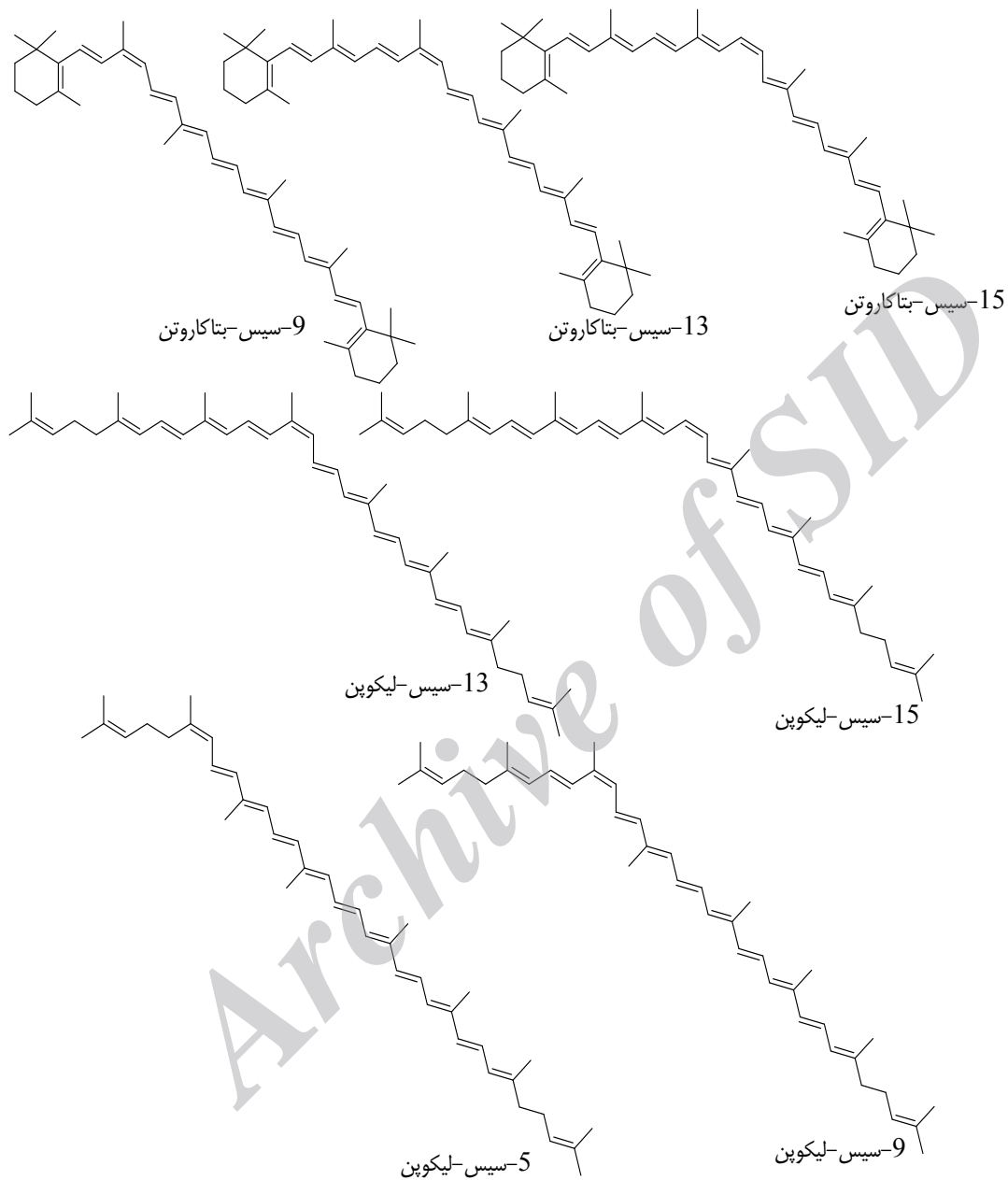
### 1-1-3-1- منابع عمده کاروتنوئیدها

مقررات و اطلاعات سازمان کشاورزی آمریکا، 215 کاروتنوئید غذایی را پوشش می‌دهد که شامل آلفاکاروتن، بتاکاروتن، لیکوپن، بتاکریپتوگزانتین، لوتئین همراه زئاگزانتین و هم چنین زئاگزانتین به تنهایی در اغلب مواد غذایی می‌باشد. عوامل تأثیرگذار بر میزان کاروتنوئیدها در میوه‌ها و سبزی‌ها، رقم و نوع ژنتیکی، محل رشد، شرایط رشد (خاک، آب و هوا) و میزان رسیدگی آن‌ها است. همچنین دستکاری‌های ژنتیکی برای تغییر کاروتنوئیدها به سوی کاروتنوئید



مورد نظر و تولید غذاهای تراریخته مورد استفاده قرار گرفته و نهایتاً مواد غذایی حاوی کاروتنوئید بالا تولید می‌گردد (21).

جداول 1-5 و 1-6 به ترتیب منابع اصلی بتاکاروتن و سایر کاروتنوئیدهای پیش ساز ویتامین A به ویژه آلفاکاروتن و بتاکاروتن را نشان می‌دهد. از آنجا که ایزومرهای سیس خصوصیات بیولوژیکی و فیزیکوشیمیایی متفاوتی از کاروتنوئیدهای ترانس نشان می‌دهند، همیشه در دسترس‌اند (توزیع آن‌ها در جدول‌ها مشاهده می‌شود). ساختمان ایزومرهای بتاکاروتن سیس در شکل 1-2 نشان داده شده‌اند. برگ‌های سبز و انواع هویج، مهم‌ترین منابع بتاکاروتن در رژیم غذایی هستند زیرا در سراسر جهان و در تمام ایام سال در دسترس می‌باشند. برخی برگ‌های طبیعی در کشورهای حاره‌ای نظیر برزیل و هند یافت می‌شوند (جدول 1-5) که مقادیر بسیار بالاتری بتاکاروتن نسبت به سبزی‌های تجاری معمول دارند. میزان بالای ایزومرهای سیس در سبزی‌های سبز قبل از فرایند شدن احتمالاً به‌خاطر توانایی کلروفیل موجود در این سبزی‌ها است که به عنوان سازنده بتاکاروتن از طریق ایزومریزاسیون در اثر نور عمل می‌کنند (1، 11 و 21).



شکل 1-2- ساختمان ایزومرهای سیس بتاکاروتن و لیکوپن موجود در مواد غذایی.

جدول 1-5- منابع گیاهی غنی از بتا کاروتن و نسبت توزیع ایزومرهای سیس آن





منبع	میزان کل بتاکاروتن (گرم/میلی گرم وزن تازه)	درصد توزیع ایزومرهای سیس		
		تمام ترانس	9-سیس	13-سیس
کلم پیچ	47	86	10	4
کلم پیچ	146	نامشخص	نامشخص	نامشخص
گونه مانگا (Manteiga)	44-54	نامشخص	نامشخص	نامشخص
گونه ترونچودا (Tronchuda)	57-60	نامشخص	نامشخص	نامشخص
اسفناج	33	83	12	5
اسفناج	67	نامشخص	نامشخص	نامشخص
اسفناج	33	نامشخص	نامشخص	نامشخص
اسفناج ایتالیایی	1220-1275	83	12	5
اسفناج	397	نامشخص	نامشخص	نامشخص
برگ‌های کارورو (caruru)	110	نامشخص	نامشخص	نامشخص
برگ‌های منتروز (mentruz)	85	نامشخص	نامشخص	نامشخص
برگ‌های تابوبا (taioba)	67	نامشخص	نامشخص	نامشخص
برگ‌های سرالها (serralha)	63	نامشخص	نامشخص	نامشخص
برگ‌های بوتلابندا (botla benda)	126	نامشخص	نامشخص	نامشخص
برگ‌های یرامولا کاکورا (Yerramola kakaura)	119	نامشخص	نامشخص	نامشخص
برگ‌های مولاتو کاکورا	109	نامشخص	نامشخص	نامشخص



(molla thotakura)

نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	66	هوچ
0	0	0	100	534	هوچ
نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	84	گونه نانت دوک
					(Nantes Duke)
نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	79	گونه نانت فانس
					(Nantes Fancy)

درصد توزیع ایزومرهای سیس

میزان کل

سایر	13-سیس	9-سیس	تمام ترانس	بتاکاروتن (گرم/میلی گرم وزن تازه)	منبع
نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	103	گونه ناربونه (Narbonne)
0	0	3	97	34	گونه نانت (Nantes)
نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	46	گونه کامپاناس (Campinas)
0	3	<1	97	76	سیبزمینی شیرین
نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	149	گونه سنتنیال (Centennial)
نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	218	گونه آکادیان (Acadian)
نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	7-15	انبه گونه کیت (Keitt)
0	<1	0	>99	16	گونه تامی اتکینز (Tommy Atkins)
0	20	0	80	57	گونه کیت
0	20	0	80	46	گونه تامی اتکینز
				139	گونه کاوه (Kaew)



0	0	0	100	3	آسرولا (Acerola)
					گونه والدی (Waldy)
0	0	0	100	6	گونه والدی
0	0	0	100	9	گونه اولیور (Olivier)
0	0	0	100	17	گونه اولیور
نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	30	سالاک (Salak)
نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	59-64	موز گوشت نارنجی
0	35	24	41	993	میوه پالم
5	7	22	67	612	گونه ملانوکوکا (Melanococa)
0	31	27	43	206	گوینسیس گونه پسیفرا
					(E.guineensis cv. Psifera)
0	1	<1	99	365	بوریتی (buriti)

اعداد مربوط به گونه‌های مختلف، مناطق مختلف و زمان‌های برداشت مختلف می‌باشد.

در بین 19 رقم هویج، میزان بتاکاروتن از 46 تا 103 میکروگرم در گرم و مقدار آلفاکاروتن از 22 تا 49 میکروگرم در گرم متغیر است.

توزیع ایزومرهای آلفا و بتاکاروتن در هویج‌های تازه مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج گزارش شده، شامل عدم حضور ایزومرهای سیس آلفا و بتاکاروتن در ارقام نامشخص، 3 درصد 9- سیس- بتا- کاروتن و 3 درصد 9- سیس- آلفا- کاروتن در رقم‌های نانت، 9 درصد 9- سیس و 3 درصد 13- سیس- بتا- کاروتن و همراه با 1 درصد 9- سیس و 1 درصد 13- سیس- آلفا- کاروتن در ارقام دانور<sup>1</sup> است. این نتایج مشخص می‌کند که در سبزی‌های تازه نارنجی رنگ نظیر انواع هویج، نسبت ایزومرهای سیس بتاکاروتن در مقایسه با سبزی‌های سبز

<sup>1</sup>-Danvers

رنگ پایین‌تر است و ایزومر که شاخص و برجسته موجود در آن 9- سیس - بتا- کاروتن می‌باشد (3، 21 و 45).

برخی از ارقام سیب‌زمینی شیرین که به مصارف انسانی می‌رسند نیز منابع خوبی از بتاکاروتن هستند و مقدار بتاکاروتن در آنها حتی تا 218 میکروگرم در گرم در رقم آکادیان<sup>1</sup> می‌رسد. در مناطق حاره و نیمه حاره نیز میوه‌هایی که حاوی بتاکاروتن هستند دیده می‌شوند. انبه یکی از پرمصرف‌ترین میوه‌های گرمسیری است که حاوی طیف وسیعی از کاروتنوئیدها و به ویژه مقادیر زیادی بتاکاروتن می‌باشد. نوع رقم، شرایط آب و هوایی، رشد و درجه رسیدگی بر میزان بتاکاروتن انبه تاثیرگذار است (جدول 1-5). میوه‌های تازه و آب میوه‌های فرایند شده مرکبات بخصوص آب پرتقال به مقدار زیادی در سراسر جهان مصرف می‌شوند. مرکبات حاوی مخلوط پیچیده‌ای از کاروتنوئیدها با ترکیب‌های کمی و کیفی متفاوت هستند که به گونه، رقم، مرحله رسیدگی و منطقه برداشت آنها بستگی دارد (5، 21 و 24).

میوه سالاک<sup>2</sup> از جمله منابع گیاهی غنی از بتا کاروتن می‌باشد که بالاترین میزان بتاکاروتن را در میان 18 میوه مصرفی در اندونزی دارا می‌باشد. برخی از گونه‌های هل نیز دارای مقادیر بالای بتاکاروتن می‌باشد. در میان 13 گونه محلی موز یک وارسته محلی به نام اوان یاپ<sup>3</sup> که رنگ نارنجی در قسمت گوشت میوه دارد بالاترین میزان بتاکاروتن را در مقایسه با سایر ارقام دارد. در میان بهترین منابع بتاکاروتن، میوه‌های رشد کرده در برخی خانواده‌های درخت پالم را می‌توان معرفی کرد. بهترین نوع میوه پالمی است که حاوی مقادیر بالایی کاروتنوئیدها است که رنگ نارنجی تا قرمز دارد. جنس الایس<sup>4</sup> در مقایسه با دو نوع گونه الایس گوینسیس<sup>5</sup> که در غرب

<sup>1</sup>-Acadian

<sup>2</sup>-Salak

<sup>3</sup>-Yap

<sup>4</sup>-Elaeis

<sup>5</sup>-E. guineensis

آفریقا رشد می‌کند و الئیس اولیفر<sup>1</sup> که جزء طبیعت آمریکای جنوبی است از این نوع پالم می‌باشد. میزان بتاکاروتن بستگی به گونه و رقم پالپ میوه پالمی دارد که به عنوان مواد خام از استحصال روغن پالم به جای می‌ماند (جدول 1-5). به‌خاطر مقدار بالای فعالیت لیپاز، میوه‌های پالم بلافاصله پس از برداشت تحت تیمارهای حرارتی نظیر رنگ‌بری یا استریل کردن قرار می‌گیرند تا از تند شدن روغن جلوگیری شود. بنابراین، روغن‌های پالم تجارتنی همیشه حاوی مقادیر بالایی از ایزومرهای سیس هستند که بالغ بر 60 درصد کل میزان بتاکاروتن را تشکیل می‌دهند (جدول 1-5). با وجود این، مقادیر بتا و آلفاکاروتن معمولاً در مجموع 80 درصد کل کاروتنوئیدها را تشکیل می‌دهند و این مقادیر از گونه و رقم به گونه و رقم دیگر تغییر می‌کند. بنابراین روغن پالم به عنوان منبع عالی از پروویتامین A است (جداول 1-5 و 1-6) (6، 21 و 40).

جدول 1-6- منابع گیاهی غنی از سایر کاروتنوئیدهای پیش ساز ویتامین A

منبع	میزان پیش ساز ویتامین A (میلی گرم/گرم وزن تازه)
هویج	آلفاکاروتن (29)
رقم نانت دوکه	آلفاکاروتن (39)
رقم نانت فانسی	آلفاکاروتن (42)
رقم نلسون (Nelson)	آلفاکاروتن (49)
رقم کامپیانس	آلفاکاروتن (22)
میوه پالم ( <i>E. Oleifera</i> )	آلفاکاروتن تمام ترانس (342)، 13-سیس-آلفاکاروتن (144)، بتاکریپتوگزانتین (14)
میوه پالم ( <i>E. guineensis</i> )	
رقم پسيفرا ( <i>Psifera</i> )	آلفاکاروتن تمام ترانس (14)، 13-سیس-آلفاکاروتن (6)

<sup>1</sup>-E. oleifera



رقم دورا دامپی	آلفاکاروتن تمام ترانس (223)، 13-سیس-آلفاکاروتن (87)
(Dura Dumpy)	
رقم تنرا (Tenera)	آلفاکاروتن تمام ترانس (94)، 13-سیس-آلفاکاروتن (64)
E.guineensis	آلفاکاروتن تمام ترانس (78)، 9-سیس-آلفاکاروتن (8)
<i>E.guineensis x Olifra</i>	آلفاکاروتن تمام ترانس (59)، 9-سیس-آلفاکاروتن (13)، 13-سیس-آلفاکاروتن (10)
<i>E.melanoca</i>	آلفاکاروتن تمام ترانس (194)، 9-سیس-آلفاکاروتن (31)، 13-سیس-آلفاکاروتن (11)
بوریتی	آلفاکاروتن تمام ترانس (80)، 13-سیس-آلفاکاروتن (2)، گاماکاروتن (37)
ساتسوما (Wase Satsuma)	بتاکریپتوگزانتین (18)
نارنگی هانس (Hansen)	بتاکریپتوگزانتین (12)
(Mandarin)	
کلمنتن (Clementine)	بتاکریپتوگزانتین (9)
ساجا (Caja)	بتاکریپتوگزانتین تمام ترانس (8-6)، سیس بتاکریپتوگزانتین (<1)

اعداد مربوط به منابع تحقیق مختلف می‌باشند.

### 1-3-1-2- کاربرد کاروتنوئیدها به عنوان رنگ‌های طبیعی

همانطور که ذکر شد کاروتنوئیدها در طبیعت به صورت گسترده موجودند و رنگ‌های متنوعی از زرد، نارنجی و قرمز را ارائه می‌دهند. اغلب میوه‌ها و سبزی‌ها حاوی مخلوطی از کاروتنوئیدها می‌باشند و بیش از 600 نوع مختلف آنها تشخیص داده شده است. علاوه بر آناتو و پاپریکا که رنگ‌های غذایی عمده‌ای بوده و در صنعت غذا و نوشیدنی به طور مخلوط استفاده می‌شوند، بتاکاروتن و لوتئین نیز مصرف زیادی دارند. غنی‌ترین منبع طبیعی مخلوط کاروتنوئیدها میوه درخت نخل روغنی است که به طور ویژه در مالزی و اندونزی رشد می‌کند. درخت نخل



روغنی حاوی مخلوطی از بتا و آلفاکاروتن به همراه مقادیر ناچیزی گاماکاروتن و لیکوپین است. میوه‌ها در ابتدا به روغن خام فرایند شده و سپس در مراحل اضافی شامل تقطیر و خالص‌سازی توسط HPLC و استانداردسازی به یک سوسپانسیون روغنی که از فراورده‌های محلول در آب و محلول در روغن تشکیل شده است تبدیل می‌شود که در قدرت‌های رنگی مختلف تولید می‌شود. فراورده‌های محلول در روغن در عمل یک رنگ زرد تازه با سایه زرد رنگ می‌دهند، در حالی که امولسیون‌های محلول در آب می‌توانند رنگ زرد تا زرد متمایل به نارنجی را تأمین نمایند (30، 33 و 43).

### 1-3-1-2-1- بتاکاروتن

بتاکاروتن معروف‌ترین کاروتنوئید مجزا است و به مقادیر زیادی در صنایع غذایی و نوشابه سازی مصرف می‌شود. این ترکیب، در عمل رنگ زرد متمایل به نارنجی را بروز می‌دهد. امروزه اغلب بتاکاروتن مصرفی از طریق سنتز مولکول مشابه آنچه در طبیعت است تولید می‌شود. بتاکاروتن از نوعی میکروآلگ<sup>1</sup> نیز تولید می‌شود. آلگ در غلظت 30 درصد نمک و با شدت نور بالا و در درجه حرارت‌های بالا به همراه و یا بدون هم زدن مکانیکی رشد می‌کند. تحت این شرایط آلگ مقدار زیادی کاروتنوئید تولید کرده و می‌تواند بالغ بر 10 درصد از وزن خود بتاکاروتن جمع کند. بتاکاروتن از آلگ خشک شده با یک سری فرایندها شامل تغلیظ، تیمار آنزیمی، استخراج، صابونی‌کردن، کریستالیزاسیون جزء به جزء و پخش کردن در روغن در غلظت 20 تا 30 درصد خالص‌سازی می‌شود. بتاکاروتن همچنین می‌تواند از فرایند تخمیر با کپک بلاکسلا تریسپورا<sup>2</sup> به دست آید. دو نوع قارچ همجنس به نسبت معین با هم جفت شده و مقادیر زیادی بتاکاروتن در یک تخمیر هوایی غوطه‌وری تولید می‌شود. سپس بتاکاروتن به وسیله استخراج با

<sup>1</sup>-*Dunaliella salina*

<sup>2</sup>- *Blakeslea trispora*





جدول 1-7- منابع گیاهی غنی از لوتئین و ایزومرهای آن

منابع	لوتئین کل (میلی گرم/گر م وزن تازه)	تمام ترانس	توزیع ایزومرهای سیس (%)		
			9-سیس	9'-سیس	13-سیس
کلم بروکلی	8	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
کلم بروکلی	18	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
کلم بروکلی تازه	84	99	0	0	1
کلم بروکلی ماکروویو شده	102	96	0	0	4
کلم پیچ	186	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
کلم پیچ تازه	150	87	3	5	5
کلم پیچ	515	100	0	0	0
کلم پیچ کنسرو شده	627	78	7	6	9
اسفناج	95	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
اسفناج	44	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
اسفناج تازه	92	92	2	<1	5
اسفناج	881	97	0	0	3
اسفناج کنسرو شده	443	79	9	2	7
اسفناج آنزیم‌بری شده	369	85	3	2	7
جعفری	138	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص

### 1-3-1-3-2-3- لیکوپین

لیکوپین<sup>1</sup> به عنوان یک کاروتن شاخص در گوجه‌فرنگی شناخته می‌شود که بسته به رقم بالغ بر 65 تا 95 درصد کل کاروتنوئید رنگی را تشکیل می‌دهد (جدول 1-8). مقادیر لیکوپین در گوجه‌فرنگی‌های تازه مخصوص سالاد از 21 تا 79 میکروگرم در هر گرم میوه آن متغیر است. در گوجه‌فرنگی‌های مخصوص فرایند و گوجه‌فرنگی‌های قرمز تیره، مقدار لیکوپین می‌تواند بالغ بر 623 میکروگرم در گرم باشد. بیش از 80 درصد از گوجه‌فرنگی‌های تولید شده به شکل فراورده‌های فرایند شده مصرف می‌شوند و اغلب فراورده‌های تجاری دارای مقادیر بالاتری لیکوپین از انواع تازه هستند (60 و 86).

جدول 1-8- منابع گیاهی غنی از لیکوپین و ایزومرهای سیس آن

منابع	لیکوپین کل (میلی گرم/گرم) وزن تازه)	تمام ترانس	توزیع ایزومرهای سیس (%)		
			5-سیس	9-سیس	13-سیس
گوجه‌فرنگی سالاد، رقم مونیکا	73	98	نامشخص	نامشخص	2
رقم کارمن (Carmen)	35	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
نوع معمول	21	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
رقم جزایر قناری	16	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
گوجه‌فرنگی مخصوص فرایند	117	>99	نامشخص	نامشخص	<1
رقم (Bos 3155)	173-237	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
گوجه‌فرنگی آلو شکل	623	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
رب گوجه‌فرنگی	555	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
رب گوجه‌فرنگی	520	96	4	<1	<1

<sup>1</sup>- lycopene



منابع	لیکوپن کل (میلی گرم/گرم وزن تازه)	تمام ترانس	توزیع ایزومرهای سیس (%)			
			5-سیس	9-سیس	13-سیس	سایر
کچاپ تند	95	88	7	2	3	1
کچاپ	172	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
کچاپ	30	77	11	5	7	1
سس آماده پاستا	160	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
گوجه‌فرنگی خام	92	67	14	6	5	8
گوجه‌فرنگی پخته شده	93	60	14	8	7	11
گوجه‌فرنگی کنسرو شده	71	84	5	3	5	3
آب گوجه‌فرنگی	108	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
روغن پالم قرمز	450	16	19	6	30	29
هندوانه رقم اوله (Ole)	76	93	نامشخص	نامشخص	نامشخص	7
رقم زیت (xite)	112	90	نامشخص	نامشخص	نامشخص	10
انبه رقم سولو (Solo)	17-31	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
رقم فورموسا (Formosa)	15-30	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
رقم تایلندی	32-47	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
گریپ‌فروت رقم ری رابی (Ray Ruby)	21	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
رقم استار رابی	33	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
گواوای قرمز	53	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
میوه گاک (gac)	348	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص

پودرهای گوجه‌فرنگی خشک شده به روش انجمادی حاصل از میوه‌های کامل گوجه‌فرنگی

و انواعی که از پالپ‌های آن بعد از سانتریفوژ کردن به دست می‌آیند حاوی 474 تا 5399

میکروگرم بر گرم وزن خشک لیکوپن هستند که از این مواد می‌توان به عنوان افزودنی غذایی استفاده کرد (14 و 51).

در سایر میوه‌هایی که منابع خوبی برای لیکوپن شناخته می‌شوند (برخی گونه‌های هندوانه دانه‌دار و بدون دانه)، 87 تا 95 درصد از کل کاروتنوئیدها به فرم لیکوپن می‌باشد. همچنین در ارقام مختلف انبه هندی 56 تا 66 درصد و در گریپ فروت صورتی 24 تا 58 درصد از کل کاروتنوئیدها را لیکوپن تشکیل می‌دهد (51).

در میان میوه‌های گرمسیری گواس<sup>1</sup>های قرمز حاوی 76 تا 86 درصد لیکوپن از کل کاروتنوئیدها هستند و می‌توانند به عنوان منابع خوب لیکوپن در نظر گرفته شوند. یک میوه بومی آسیای جنوب شرقی که در ویتنام گاس<sup>2</sup> نامیده می‌شود و به عنوان یک رنگ‌دهنده برنج شناخته می‌شود رنگ قرمز خوبی از خود نشان می‌دهد. میوه گاس منبع بسیار خوبی برای لیکوپن به شمار می‌رود (17 و 92).

#### 1-3-1-2-4 آناتو

آناتو یک دانه است که از گیاه بیکسا اورلانا<sup>3</sup> که عمدتاً در آمریکای مرکزی و جنوبی و شرق آسیا رشد می‌کند، استخراج می‌شود. به طور سنتی دانه‌های آناتو به عنوان ادویه مصرف می‌شوند و اغلب قبل از افزودن به سوپ و غذاهای گوشتی با سایر مواد اولیه مخلوط می‌شوند. دانه‌ها در خوشه‌های بزرگی در میوه‌ای کپسولی رشد می‌کنند که بعد از برداشت، در برابر نور خورشید خشک شده و سپس خوشه‌ها را شکسته و توسط دست برداشت می‌کنند. رنگدانه اصلی آن بیکسین<sup>4</sup> است که یک کاروتنوئید طبیعی است که در پوشش نازک دانه یافت می‌شود. این رنگدانه به طرق

<sup>1</sup>-Guavas Psidium: بوته های جنس

<sup>2</sup>-Gac

<sup>3</sup>-Bixa orellana

<sup>4</sup>-Bixin

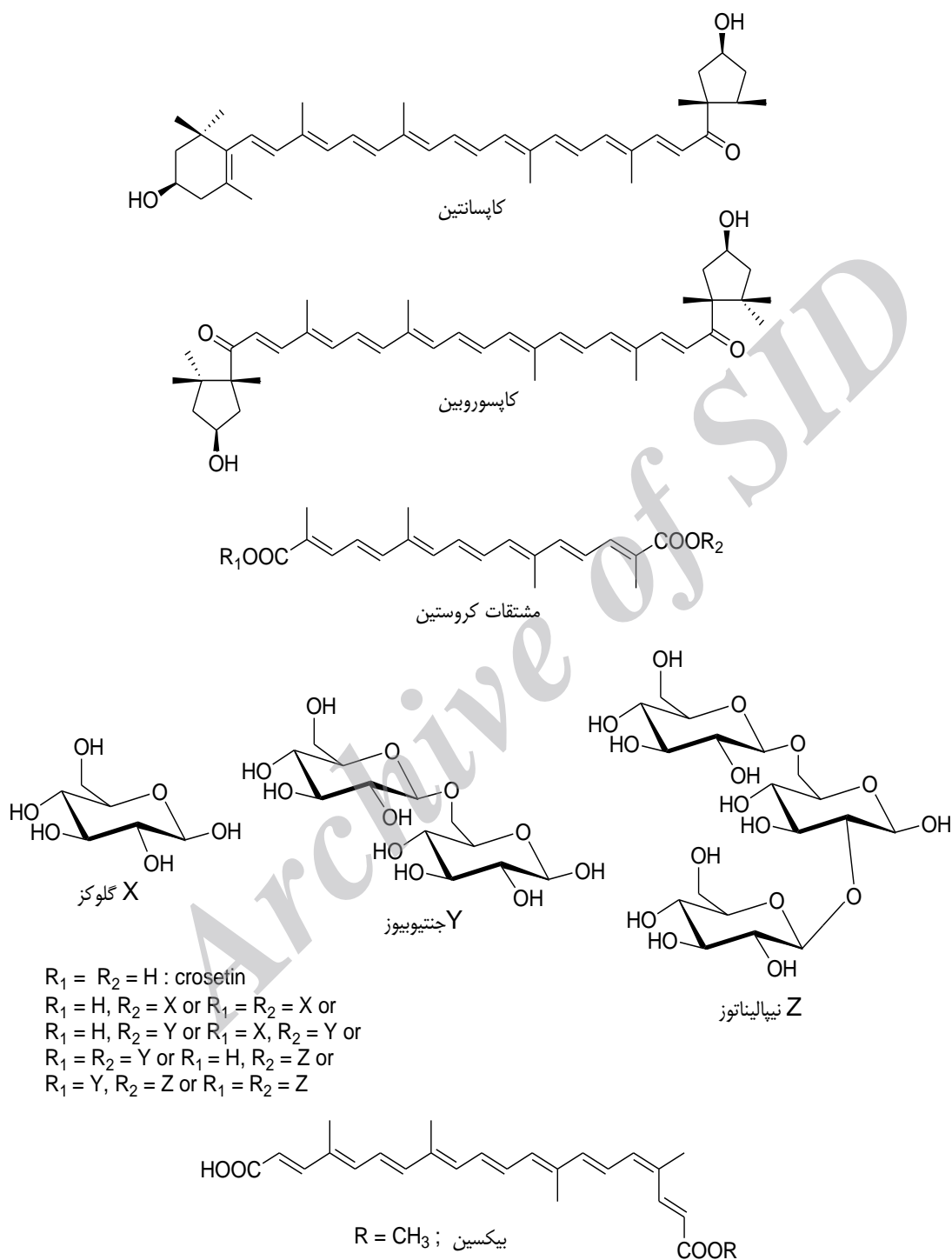
مختلف استخراج می‌شود تا عصاره‌های محلول در روغن، سوسپانسیون‌های روغنی یا عصاره‌های محلول در آب حاصل شود. عصاره‌های محلول در روغن با استخراج دانه‌های آناتو با روغن گیاهی داغ حاصل می‌شود که محصول حاصل مقدار کمی رنگ دارد. به طور نمونه 0/1 تا 0/2 درصد بیکسین دارد که به صورت بیکسین با قدرت انحلال کم در روغن است. با معلق‌سازی رنگدانه رنگی حل نشده در روغن گیاهی یا چربی مقدار بیکسین تا 5 درصد افزایش می‌یابد. عصاره‌های محلول در روغن و سوسپانسیون‌های روغنی، زرد- نارنجی بوده و برای محصولاتی که حاوی مقدار زیادی روغن هستند نظیر مارگارین، کره، سس‌های سالاد و اسنک‌های اکسترود شده مناسب می‌باشند. با عصاره‌گیری دانه‌های آناتو با آب و هیدروکسید پتاسیم، بیکسین به نوربیکسین که رنگدانه محلول در آب است تبدیل می‌شود. محلول‌های آبی به طور نمونه حاوی 0/5 تا 4 درصد نوربیکسین است و پودر آن با غلظت بالاتر از 15 درصد را می‌توان با روش خشک‌کردن پاششی تولید کرد. بیکسین و نورکسین را می‌توان با یکدیگر ادغام کرد تا رنگی تولید شود که هم در غذاهای با پایه روغن و هم در غذاهای با پایه آب قابل حل باشد. کاربردهای نمونه‌ای فراورده‌های نوربیکسین عبارتند از پنیر، بستنی، فراورده‌های نانوائی و پخت، شیرینی‌های شکری و نوشابه‌ها که در این محصولات رنگ زرد- نارنجی تولید می‌کند. بیکسین و نوربیکسین در حد قابل قبولی به حرارت مقاومند اما پایداری در برابر نور زمانی بهتر است که نوربیکسین به پروتئین پیوند داده شود. مثلاً در پنیر نوربیکسین ممکن است در pHهای پایین رسوب کند و همچنین نمی‌تواند با فراورده‌های حاوی کلسیم مخلوط شود. با وجود این می‌توان فراورده‌هایی از نوربیکسین را فرموله کرد که در pH پایین پایدار باشد (17 و 35).



### 1-3-1-2-5- پاپریکا

پاپریکا در غلاف‌های فلفل قرمز شیرین<sup>1</sup> یافت می‌شود که در اسپانیا و اروپای مرکزی، ایالات متحده، آسیا و آفریقا یافت می‌شود. این ماده در صنایع غذایی هم برای اهداف طعم‌دهی و هم به منظور ایجاد رنگ استفاده می‌شود و رنگی که ایجاد می‌کند نارنجی-قرمز است. پاپریکا شامل چند رنگدانه کاروتنوئیدی مختلف می‌باشد که در طی رسیدن تشکیل شده و عامل رنگ قرمز آن هستند. مهم‌ترین این رنگدانه‌ها عبارتند از کاپسانتین، کاپسوربین و بتاکاروتن که حدود 90 درصد رنگدانه‌ها را شامل شده و به طور طبیعی در بسیاری از نقاط جهان در گیاهان زعفران، آناتو و فلفل نیز یافت می‌شوند (شکل 1-3) (17).

<sup>1</sup>-*Capsicum annuum*



شکل 1-3- ساختار کاروتنوئیدهای موجود در پاپریکا (کپسانتین و کاپسوروبین)، زعفران و گاردنیا

(مشتقات کروسنتین) و آناتو (بیکسین و نوربیکسین).

قدرت رنگ با واحد رنگی<sup>1</sup> در گرم بیان می‌شود. برای استفاده از پاپریکا به عنوان رنگ، الئورزین پاپریکا با عصاره‌گیری توسط حلال از غلاف به دست می‌آید. عصاره با روغن‌های گیاهی استاندارد می‌شود تا قدرت رنگی مورد نظر را برآورده سازد. معمول‌ترین قدرت رنگی 40000، 60000، 80000 و 100000 واحد رنگی می‌باشد (17 و 35).

این عصاره‌ها می‌توانند تحت فرایند بیشتری قرار گرفته تا فراورده‌های قابل اختلاط در آب به دست آید که در این فرایند با وارد کردن یک امولسیفایر در حین تولید میسر می‌شود. پاپریکا طعمی قابل تشخیص دارد و در فراورده‌های طبخ‌نی پذیرفته‌شده، سوپ‌ها، سس‌ها و اسنک‌ها استفاده می‌شود. فراورده‌های طعم‌زدایی شده برای استفاده در شیرینی و شکلات و نوشابه‌ها مناسب است اما زیاد فراگیر نشده است. پایداری فراورده‌های پاپریکا در برابر حرارت و نور زیاد خوب نیست و می‌توان با آنتی‌اکسیدان‌ها این پایداری را بهبود بخشید. شکل 1-4 مناسب‌ترین مواد خام را برای تولید رنگ‌های زرد تا نارنجی نشان می‌دهد (17).



شکل 1-4- منابع خام تهیه رنگ‌های زرد تا نارنجی: از چپ به راست، زرد چوبه،

فلفل، کپسول‌های آناتو

<sup>1</sup>- Colour unit (C.U)





## 1-3-2- کلروفیل‌ها در مواد غذایی

سبزی‌جات سبزرگ و میوه‌ها منشأ اصلی کربوهیدرات، ویتامین‌ها، املاح و فیبرهای رژیمی در تغذیه به شمار می‌روند. آن‌ها میزان کمی چربی و پروتئین دارند و اهمیت زیادی در رژیم غذایی پیدا کرده‌اند و به عنوان رنگ‌دهنده‌های مواد غذایی و افزودنی‌های طبیعی برای تولید فراورده‌های رنگی طبیعی و جذاب کاربرد یافته‌اند (21).

رنگ‌های طبیعی غذایی جذابی خاص برای مصرف کننده دارند و جایگزین مناسبی برای رنگ‌های مصنوعی هستند. امروزه به دلیل توجهات زیاد در خصوص ایمنی غذا، کلروفیل به عنوان یک رنگدانه سبز طبیعی برای مصرف در مواد غذایی در نظر گرفته می‌شود. افزودن سبزی‌جات خشک سبز رنگ یا عصاره‌های کلروفیل سال‌هاست که در صنعت مورد استفاده قرار گرفته اما به دلیل پایداری ضعیف، طی فرایند کردن مواد غذایی این رنگ سبز ایجاد رنگ‌های نامطلوبی می‌کند. علیرغم وجود و گستردگی حضور کلروفیل در تمام گیاهان فتوسنتزکننده، هنوز اطلاعات کافی از حضور کلروفیل در جداول تغذیه موجود نیست. همچنین اطلاعات کافی درباره مقادیر تفکیک شده مقادیر کلروفیل نوع a و نوع b در منابع به چشم نمی‌خورد. آنچه مسلم است مقادیر کلروفیل در گیاهان بسیار متغیر می‌باشد و بستگی به فرایندهای متابولیک گیاه دارد که وابسته به فیزیولوژی، ژنتیک و عوامل بیوشیمیایی است، لیکن عوامل خارجی نظیر عوامل آب و هوایی، عملیات کشاورزی، فصل رشد، منطقه جغرافیایی رشد گیاه، عملیات پس از برداشت، نحوه نگهداری و بخشی از گیاه که حاوی کلروفیل است، نیز روی مقدار کلروفیل تأثیر می‌گذارند و مقادیر آن در ساقه‌ها، برگ‌ها و پالپ‌های سبزی‌جات و میوه‌ها متفاوت است. به طور کلی مقادیر کلروفیل بالاتر، عمدتاً در برگ‌ها یافت می‌شوند که هر چه پررنگ‌تر باشند حاوی کلروفیل بیشتری هستند. بنابراین بیشترین مقدار کلروفیل (بالغ بر 1/5 تا 2 درصد وزن مرطوب) را

می‌توان برای مثال در برگ‌های کاملاً رسیده اسفناج، جعفری، کلم پیچ، و کلم سبز مشاهده کرد. رسیدگی میوه و پیری برگ‌ها باعث کاهش سریع در مقدار کلروفیل می‌شود. با وجود این، برخی گیاهان نظیر آووکادو، خیار، کیوی، خربزه سبز یا تیل حتی در مراحل رسیدگی کامل، مقدار کلروفیل خود را حفظ می‌کنند (21، 45 و 46).

کلروفیل از گیاهان خشک شده به وسیله استخراج با حلال به دست می‌آید. در طی فرایند استخراج یون منیزیم به طور کامل یا جزئی از رنگدانه خارج می‌شود که این امر رنگدانه را ناپایدارتر ساخته و رنگ را به سمت سبز زیتونی سوق می‌دهد. عصاره کلروفیل محلول در روغن است و می‌تواند با روغن گیاهی یا اختلاط با یک امولسیفایر برای تولید یک رنگ قابل پخش در آب مورد استفاده قرار گیرد. یون منیزیم را که در طی فرایند استخراج از بین می‌رود می‌توان با مس جایگزین کرد تا یک کمپلکس پایدارتر حاصل شود. این کمپلکس که کلروفیلین مس نام دارد با فرایند کردن اضافی عصاره کلروفیل با آب و افزودن قلیا حاصل می‌شود. کلروفیل برای مواقعی که رنگ سبز در صنعت پخت فراورده‌های لبنی، شیرینی و شکلات‌های شکر، غلات صبحانه‌ای، مرباها و ژله‌ها مورد نیاز است توصیه می‌شود. کلروفیل‌ها در شرایط قلیایی پایدارترند و در اسیدهای رقیق، رنگ خود را به سرعت از دست داده و به کلروفیلین مس تبدیل شده و رسوب می‌کنند. کلروفیلین مس نسبتاً به حرارت و نور پایدار است (42 و 86).

### 1-3-2-1- منابع غذایی سرشار از کلروفیل

وسعت پراکندگی کلروفیل در میان سلسله درختان، شناخت منابع کلروفیلی را که برای انسان قابل خوردن باشد را دشوار نموده است. روش‌های مختلف تجزیه‌ای برای تشخیص مقدار کلروفیل به کار گرفته شده است. مقدار رطوبت نمونه می‌تواند بر مقدار نهایی میزان کلروفیل تأثیرگذار باشد. بنابراین مقادیر کلروفیل اندازه‌گیری شده باید بر مبنای وزن خشک گزارش شوند. به علاوه



تحقیقات زیادی از تغییر میزان کلروفیل در حین نگهداری و فرایند حکایت دارند. هنوز مقادیر کلروفیل گزارش شده در گیاهان مختلف نامطمئن است و نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. این مسائل دشواری جمع‌آوری اطلاعات در خصوص میزان کلروفیل قابل استفاده توسط بشر را روشن می‌سازند (46).

در گیاهان تازه بریده شده و پیر نشده، محصولات نظیر فتوفیتین و فتوفوربید تخریب نمی‌شوند زیرا کلروفیل‌ها با کاروتنوئیدها و پروتئین‌ها درون ساختمان گیاه ترکیب شده‌اند و در برابر شرایط محیطی از بین برنده کلروفیل‌ها بسیار مقاوم می‌باشند. تمام گیاهان عالی حاوی کلروفیل‌های a و b هستند. شناسایی فازهای کلروفیل که به نام‌های فتوفیتین‌ها و فتوفوربیدها شناخته می‌شوند با توسعه روش‌های تجزیه‌ای پیچیده نظیر HPLC و MS که قادر به جداسازی، تشخیص و تعیین دقیق مشتقات مختلف کلروفیل هستند میسر گردیده است (46).

مقادیر کمی کلروفیل‌ها در مورد بسیاری از میوه‌ها و سبزی‌ها در طول سالیان جمع‌آوری شده است و عمدتاً اثرات فرایند بر آن‌ها نیز گزارش شده است. تعدادی از محققان نه تنها با مقدار کلروفیل‌ها در غذاهای تازه سر و کار داشته‌اند بلکه مطالعات خود را بر روی عوامل موثر بر رنگدانه نظیر آماده‌سازی غذا، روش‌های پخت، گونه‌های گیاهی، زمان برداشت، مراحل رشد و بخش‌های مختلف گیاه متمرکز کرده‌اند. منتخبی از برخی سبزی‌های خوراکی که حاوی بالاترین مقدار کلروفیل می‌باشند در جدول 1-9 ارائه شده است. اسفناج، کلم پیچ، خردل و جعفری بالاترین مقدار کلروفیل را در بین سبزی‌های پربرگ دارا هستند و مقدار کلروفیل در آن‌ها بین 60 تا 200 میلی‌گرم در 100 گرم تازه گزارش شده است. سایر قسمت‌های گیاهان نظیر ساقه‌ها، دانه‌ها، میوه‌ها، پالپ و غلاف‌ها حاوی مقادیر کمتری در حدود 1 تا 8 میلی‌گرم در 100 گرم وزن تازه کلروفیل هستند (60).

سایر منابع سبزی‌جات که حاوی مقادیر بالایی کلروفیل هستند در مناطق ویژه‌ای از جهان مشاهده می‌شوند. به عنوان مثال نوعی سبزی<sup>1</sup> در ترینیداد و توباگو و سایر کشورهای گرمسیری مصرف می‌شود که حاوی 1/26 گرم کلروفیل در 100 گرم وزن خشک است. احتمالاً در طی تحقیقات آینده منابع خوراکی دیگری حاوی کلروفیل بالا یافت خواهند شد (60).

مواد غذایی حاوی کلروفیل را می‌توان یا مستقیماً به غذا به عنوان ماده اولیه افزود و یا عصاره آن به عنوان رنگ در قالب افزودنی غذایی اضافه کرد. کلروفیل‌های طبیعی بسیار ایمن هستند زیرا تاریخچه مصرف سبزی‌جات سبز رنگ در غذای بشر طولانی است. با توجه به مقادیر بالای کلروفیل در برگ‌های اسفناج، پودر اسفناج خشک شده، به میزان زیادی به عنوان یک افزودنی غذایی ارزان قیمت مصرف می‌شود. این یک راه ارزان قیمت و ایمن برای تأمین رنگ سبز در غذاهایی نظیر ماکارونی است. با وجود این هنوز استفاده گسترده از رنگ سبز کلروفیل به دلیل پایداری کم آن در برابر فرایندهای غذایی و انبارداری زیاد مورد توجه قرار نگرفته است. در تجارت به وسیله اصلاحات شیمیایی کلروفیل‌هایی طبیعی، کلروفیل‌هایی که جزء فلزی آن‌ها جایگزین شده است نظیر کلروفیل‌های حاوی یون مس و کلروفیلین‌های مسی ارائه شده‌اند که پایداری، حلالیت و قدرت رنگی بهتری دارند، اما آن‌ها را نمی‌توان به عنوان رنگ‌های طبیعی در نظر گرفت (60).

جدول 1-9- محتوی کل کلروفیل برخی میوه‌ها و سبزی‌جات

نام عمومی (گونه)	میزان کل کلروفیل (میلی‌گرم در صد گرم وزن تازه)
کلم پیچ	187
اسفناج	127
خردل	125

<sup>1</sup>-*Colocasia esculenta linn schott var esculenta*

63	جعفری
31	شاهی
288	کاهو
8	کلم بروکلی
10	کاسنی سالادی
9	تره فرنگی
281	ریحان
80	فلفل سبز
5	کلم فندقی
5	نخود فرنگی
8	لوبیا سبز
8	نخود سبز
40	آووکادو
2	کیوی
1	انگور
2	انگور سفید

### 1-3-2- پایداری کلروفیل در حین نگهداری و فرایند

سبزی‌جات برگ‌ی و برخی میوه‌ها منابع غنی برای کلروفیل به شمار می‌روند، اما اغلب آن‌ها جزء محصولات فسادپذیر هستند و باید به سرعت چند روز پس از برداشت مصرف شوند و یا تحت روش‌های نگهداری مواد غذایی، عمر ماندگاری تازه آن‌ها را افزایش داد. رنگ سبز آن‌ها یک پارامتر کیفی بسیار مهم محسوب می‌شود (60).

راه‌های افزایش ماندگاری سبزی‌جات به حالت تازه شامل منجمد کردن، سرد کردن، استفاده از روش‌های نگهداری و بسته بندی در اتمسفر اصلاح شده و بالاخره تابش اشعه گاما است. کلرینه کردن که یکی از روش‌های صنعتی برای شستشو و سورتینگ میوه‌ها و سبزی‌ها به شمار می‌رود توسط بسیاری از برگ‌ها تحمل نمی‌شود. در سال‌های اخیر، مصرف سبزی‌جات آماده مصرف منجمد افزایش یافته است. برای مثال حفظ رنگ سبز و ارزش تغذیه‌ای و کیفیت حسی کلم بروکلی را در  $1^{\circ}\text{C}$ ، تحت شرایط اتمسفر اصلاح شده از 5 روز به 28 روز افزایش داده‌اند (60).

### 1-3-3- آنتوسیانین‌ها در مواد غذایی

آنتوسیانین‌ها گروهی از رنگدانه‌های طبیعی فنولی هستند که دلیل رنگ قرمز تا آبی طیف وسیعی از میوه‌ها و سبزی‌ها می‌باشند. به طور سنتی معمول‌ترین منابع صنعتی آنتوسیانین که مورد استفاده قرار می‌گیرند انواع انگور و تمشک می‌باشند. اما در سال‌های گذشته منابع جدیدی در معرض فروش قرار گرفته‌اند، به عنوان مثال کلم قرمز و هویج سیاه از آن جمله است (22). به‌خاطر یک رونویسی درون مولکولی ساختمان فنولی آن‌ها، این ترکیبات نسبت به انواع موجود در منابع سنتی در برابر نور، pH و حرارت مقاومت بیشتری دارند. میوه‌ها و سبزی‌های استفاده شده برای تولید آنتوسیانین‌ها از طبیعت به دست آمده و معمولاً در اروپا رشد می‌کنند (32).

مواد خام مختلفی با آب استخراج، تغلیظ، استاندارد سازی و پاستوریزه می‌شوند. سپس این مواد با روش خشک کردن پاششی به پودر تبدیل شده و با مالتودکسترین به عنوان ماده حامل فرموله می‌شوند (37).

آنتوسیانین‌ها با قدرت‌های رنگی مختلف از منابع گوناگون و به حالت‌های فرموله شده مایع و جامد در دسترس هستند. مهمترین کاربرد غذایی آن‌ها در صنعت نوشابه‌سازی، آب‌میوه‌های صنعتی، صنعت شیرینی و آب نبات و بستنی‌های یخی است. تمام آنتوسیانین‌ها بسیار وابسته به pH هستند و رنگ آن‌ها از قرمز در pH پایین تا آبی و سبز مایل به قهوه‌ای در pHهای بالا متغیر است. قابلیت رنگی آن‌ها نیز با افزایش pH کاهش می‌یابد و اغلب در کاربردهای با pH پایین مورد استفاده قرار می‌گیرند. پایداری آن‌ها در برابر حرارت و نور معمولاً خوب بوده اما بسته به منبع آن‌ها متغیر می‌باشد. آنتوسیانین‌ها خصوصیات تغذیه‌ای مناسبی داشته و برای اهداف سلامت نیز به کار می‌روند. شکل 1-5 بافت‌های گیاهی مناسب برای تولید آنتوسیانین را نشان می‌دهد (64).



شکل 1-5 منابع گیاهی آنتوسیانین: انگور، هویج سیاه، کلم قرمز

### 1-3-4- سایر رنگ‌های طبیعی و عوامل رنگ‌دهی گیاهی

رنگ‌های طبیعی که در بالا بحث شد معروف‌ترین رنگ‌های گیاهی مصرفی هستند و اغلب توسط صنایع غذایی و نوشیدنی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از سایر رنگ‌های طبیعی زعفران، روناس، لیکوپن، آناتو، زردچوبه، رنگ‌های کربنه و بتانین چغندر را می‌توان نام برد.

#### 1-3-4-1- چغندر قرمز

رنگدانه موجود در ریشه (غده) چغندر شامل گروهی از رنگدانه‌های قرمز و گروهی از رنگدانه‌های زرد است. در اغلب ارقام چغندر ریشه‌ای، رنگدانه قرمز بتانین ترکیب عمده رنگ دهنده است که 75 تا 90 درصد از کل رنگ موجود را ارائه می‌دهد. ریشه چغندر توسط فرایندهای فیزیکی عصاره‌گیری می‌شود، که این فرایند اغلب یک نیروی فشار در شرایط اسیدی است. سپس به وسیله اولترافیلتراسیون تغلیظ شده و پاستوریزه می‌شود تا یک مایع ویسکوز که حاوی حدود 0/5 درصد بتانین است به دست آید. این عصاره را می‌توان توسط خشک کن پاششی به پودر با میزان بتانین حدود 0/35 درصد تبدیل کرد و توسط مالتودکسترین به عنوان پرکننده به بازار عرضه کرد (12 و 13).

چغندر قرمز، رنگ صورتی مناسبی شبیه رنگ توت فرنگی در بستنی، فراورده‌های لبنی، ژله‌ها و مرباهای میوه‌ای و در شیرینی‌جات می‌دهد، به شرط آنکه با حرارت بالا مواجه نشود. قدرت رنگی، رنگ چغندر بالاست و میزان مصرف آن معمولاً کم است. رنگدانه به حرارت و اکسیداسیون حساس می‌باشد که این امر استفاده از آن را محدود می‌کند. می‌توان از این رنگ‌ها بعد از فرایند حرارتی استفاده کرد. پایداری آن در pH برابر 4/5 به بالاترین حد می‌رسد و بنابراین رنگ چغندر قرمز برای کاربردهای قلیایی توصیه نمی‌شود (12).



### 1-3-4-2- کارامل

کارامل‌ها از طریق حرارت دادن کنترل شده کربوهیدرات‌های غذایی نظیر دکستروز، گلوکز یا ساکارز به دست می‌آیند. فرایند کاراملیزه شدن شامل احیا مولکول‌های کربوهیدرات‌های بزرگ به کربوهیدرات‌های کوچک‌تر است که تحت شرایط اسیدی و وجود حرارت و فشار به دست می‌آید. چهار نوع کارامل مختلف بر اساس روش تولید وجود دارد (جدول 1-10). تقریباً 90 درصد کارامل مصرفی در جهان انواع کارامل آمونیاکی یا کارامل سولفیتی (نوع 3 و 4 در جدول 1-10) هستند. رنگ‌های کارامل هم به شکل مایع و هم به صورت پودر با قدرت رنگی متفاوت در دسترس می‌باشند. کاربردهای عمومی و رایج انواع کارامل به همراه پایداری آنها در جدول 1-11 آورده شده است (21 و 32).

جدول 1-10- انواع مختلف کارامل

نوع یک	نوع دو	نوع سه	نوع چهار	نام
ساده	کارامل سودی سولفیدی	کارامل آمونیاکی	کارامل سولفیتی	
-	+	-	+	ساخته شده با SO <sub>2</sub>
-	-	+	+	با NH <sub>3</sub>

جدول 1-11- برخی ویژگی‌ها و کاربردهای کارامل

نوع یک	نوع دو	نوع سه	نوع چهار	
بالا	بالا	ضعیف	متوسط	پایداری در برابر الکل
پایین	پایین	بالا	پایین	پایداری پروتئینی
پایین	متوسط	پایین	بالا	پایداری اسیدی



مقاومت به تانن	پایین	بالا	پایین	بالا
شدت رنگ	پایین	پایین	متوسط	بالا
ویسکوزیته	بالا	بالا	متوسط	پایین
کاربردهای اصلی	نوشیدنی‌ها	نوشیدنی‌ها	آبجو، سرکه، سس‌ها،	نوشابه‌های غیر الکلی
			محصولات پخت و	قنادی

### 1-3-4-3- رنگ کربنه سبزی جات

رنگ کربنه سبزی جات یا کربن سیاه تقریباً تنها رنگ طبیعی است که در حدود خاکستری تا سیاه‌رنگ ایجاد می‌کند. این رنگ از مواد گیاهی (سبزی‌جات)، معمولاً پیت یا کود گیاهی تهیه می‌شود و سپس به صورت کربن نامحلول فرایند شده و به وسیله سوزاندن و آسیاب کردن به پودر بسیار نرمی با اندازه ذرات کمتر از 5 میکرومتر تبدیل می‌شود. از آنجایی که این پودر برای مصرف بسیار سخت است، معمولاً آن را در شربت گلوکز معلق کرده و به صورت یک خمیر چسبنده می‌فروشند. رنگ کربنه سبزی جات اساساً در صنایع شیرینی و شکلات، بستنی و بستنی‌های یخی به کار می‌رود. رنگ سیاه خالص را می‌توان با مصرف مقدار بالایی از این رنگ به دست آورد، در حالی که مقادیر پایین‌تر ایجاد رنگ خاکستری می‌نماید. رنگدانه در برابر نور، pH، حرارت و همچنین اکسیداسیون بسیار پایدار است (46).

### 1-3-4-4- زعفران

زعفران با نام عمومی *Saffron* و نام علمی *Crocus sativus* گیاهی است به ارتفاع 10 تا 30 سانتیمتر با بنه‌هایی کروی که در قاعده پهن‌اند. برگ‌های حقیقی زعفران 5 تا 11 عدد بوده و معمولاً همزمان با گلدهی و یا کمی بعد از آن در می‌آیند. گل‌های معطر هر بنه 1 تا 4 عدد بوده و در پاییز و در حوالی آبان تا آذر باز می‌شوند. رنگ گل‌ها سوسنی تیره، بنفش مایل به

ارغوانی و همراه با لکه‌ها و رگبرگ‌های تیره‌تر در گلوگاه گل است. لوله گلپوش 4 تا 5 و گاهی تا 12 سانتیمتر طول دارد. قطعات آن نسبتاً یک اندازه اند و طول آنها  $3/5$  تا 5 سانتیمتر و پهنای آن 1 تا 2 سانتیمتر است. گل‌ها سرنیزه‌ای واژگون تا تخم مرغی شکل‌اند. میله پرچم‌ها 7 تا 11 میلی‌متر به رنگ سفید، زرد یا ارغوانی است. خامه به سه بخش قرمز تیره تقسیم شده و در انتها پهن و خاجی شکل می‌شود. هر انشعاب 25 تا 32 میلی‌متر طول داشته و تا حد زیادی از بساک و دست کم نصف طول قطعات گلپوش منشا می‌گیرند. تخمدان سه برچه‌ای، پیوسته و مجاور یا کمی زیر سطح خاک است (57).

کلاله سه شاخه گل زعفران، مهمترین بخش تجاری آن است. این بخش از گل حاوی مواد چرب، املاح معدنی و موسیلاژ است. بوی زعفران به خاطر وجود اسانس بی‌رنگ ترین دار یک ترکیب اکسیژن‌دار همراه با سنیئول و طعم آن مربوط به هتروزید تلخ پیکروکروسین و پیکروکروزینوزید است که در آب حل می‌شود. ماده رنگین زعفران مربوط به وجود ماده‌ای به نام کروسین است که از هیدرولیز آن گلوکز و کروسین به دست می‌آید (57).

از جمله کاربردهای زعفران می‌توان به استفاده از آن در مواد غذایی، داروسازی، تهیه مواد آرایشی، عطرسازی و رنگ‌های نساجی اشاره کرد. در سال‌های اخیر به دلیل گرایش جامعه به مصرف افزودنی‌های طبیعی، استفاده از زعفران به جای انواع شیمیایی و سنتزی، به عنوان یک رنگ‌دهنده و طعم‌دهنده طبیعی، رو به فزونی گذاشته است. امروزه کاربرد عمده زعفران در پخت و پز، صنایع قنادی، نوشابه‌های الکلی و غیرالکلی است و در برخی کشورها مانند آمریکا از آن برای رنگ کردن سوسیس، الومارگارین و شورتینگ‌ها استفاده می‌شود. زعفران در صنایع لبنی و در تهیه فراورده‌هایی مانند کره، پنیر و بستنی استفاده می‌شود. (57)

کیفیت زعفران بستگی به قدرت رنگ‌دهی (غلظت کروسین)، ترکیب طعمی (سافرانال) و مزه آن (پیکروکروسین) دارد. نگهداری زعفران در جای تاریک باعث می‌شود که رنگ آن از دست



برود. علاوه بر این رنگ زعفران به رطوبت و دمای بالا حساس است. رنگدانه اصلی زعفران یک کاروتنوئید محلول در آب است که رنگدانه‌ای زرد مایل به قرمز است که حداکثر به میزان 2 درصد در کلاله گل زعفران وجود دارد. زعفران در واقع حاوی گلیکوزیدهای کاروتنوئیدی غیرمعمول است که پتانسیل رنگ‌دهی بالایی دارد. این رنگدانه زرد حاوی استرهای گلوکوزیل و جنتوبیوزیل کروسین است که یک کاروتنوئید 20 کربنه است. کروسین حاوی واحدهای جنتوبیوز است که به انتهای کربوکسیلیک متصل شده است که حلالیت آن را در آب زیاد می‌کند. کروسین به دلیل حلالیت زیاد در آب ترکیب رنگی خوبی برای مواد غذایی محسوب می‌شود. کروسینی که از زعفران استخراج می‌شود، مدت زمان زیادی است که به عنوان افزودنی غذایی به شمار می‌رود. این ترکیب برای انسان بی‌ضرر است، ضمن اینکه خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته و فعالیت ضدتوموری آن نیز اثبات شده است. کاروتنوئیدها یکی از گروه‌های اصلی رنگی در گیاهان هستند. این ترکیبات علاوه بر قدرت رنگی دارای اثر تشدیدکنندگی بر فعالیت ضداکسیداسیون ترکیبات فنلی می‌باشند. یکی از مشکلات عمده صنایع غذایی این است که اغلب کاروتنوئیدهای مورد استفاده در صنایع غذایی نامحلول در آب می‌باشند که این مسئله استخراج آنها را دچار مشکل می‌کند. با توجه به تقاضای زیاد برای انواع کاروتنوئیدهای محلول در آب ناچار به استفاده از حلال‌هایی غیر از آب هستیم که رنگدانه را از حالت طبیعی خارج می‌سازد. از میان کاروتنوئیدهای محلول در آب، کروسین یکی از کاروتنوئیدهایی است که به آسانی در آب حل می‌شود (42).

جرم مولکولی کروسین 997 واحد است و در متانول کریستاله می‌شود و رنگ قرمز شفاف ایجاد می‌کند. در حضور اسید سولفوریک رنگ آن یکباره آبی می‌شود. بر طبق نظر برخی محققان کروسین در گیاهان از مشتقات گلیکوزیدی زئاگزانتین تولید می‌شود که به عنوان پروتوکروسین شناخته می‌شود که به وسیله انهدام آنزیمی اکسیداتیو تولید یک مولکول کروسین و دو مولکول پیکروکروسین می‌نماید که این ماده علت تلخی زعفران است. قدرت رنگی زعفران با اندازه‌گیری

میزان جذب در طول موج 440 نانومتر در عصاره آبی آن مشخص می‌شود که این قدرت رنگی ارتباط مستقیم با غلظت کروستین دارد (42).

### 1-3-4-5- زردچوبه

گیاه زردچوبه برای اولین بار در سال 1810 میلادی شناسایی شد و اجزاء آن در سال 1870 جداسازی گردید. ساختار زردچوبه در سال 1910 شناخته شد. کورکومین در سال 1918 برای اولین بار سنتز شد و در سال 1953 اجزای زردچوبه با استفاده از کروماتوگرافی ستونی جداسازی گردید (8).

زردچوبه گیاهی از خانواده زنجبیل<sup>1</sup> با نام علمی *Curcuma Longa* می‌باشد. زردچوبه گیاهی است علفی و پایا، با ارتفاع یک و نیم متر که دارای ساقه متورمی می‌باشد. گل‌های زردچوبه به صورت سنبله به رنگ سبز مایل به زرد می‌باشند (84).

بخش مورد استفاده این گیاه، ساقه زیرزمینی (ریزوم<sup>2</sup>) آن است که پس از خارج کردن از زمین آن را تمیز کرده و ریشه‌های آن را جدا می‌کنند (شکل 1-6) و در آب جوش قرار می‌دهند و

پس از تمیز کردن به مدت چند روز آن را خشک می‌کنند. این عمل موجب می‌شود تا دانه‌های دی‌هیدرومیریسستین دی‌هیدروکورستین

نشاسته به رنگ زرد تغییر یابند. زردچوبه به رنگ زرد یا خاکستری مایل به قهوه‌ای می‌باشد (شکل 1-6)

آن معطر و طعم آن تلخ است. اولئورزین زردچوبه حاصل، حاوی حدود 37 تا 55 درصد کورکومین است و معادل همین ترکیبات رنگی، ترکیباتی طعمی نیز وجود دارد (106).

تولید سالانه زردچوبه در هند حدود 323800 تن است که حدود 75 درصد کل تولید

جهانی این گیاه را شامل می‌شود. در ایران امکان کشت این گیاه در نواحی نظیر لاهیجان وجود دارد (شکل 1-6)

<sup>1</sup> Zingi braceae

<sup>2</sup> Rhizome

دارد که با توجه به مصرف سرانه بالای زردچوبه در ایران (100 گرم در سال) نیاز به بررسی بیشتر در مورد کشت این گیاه در داخل کشور احساس می‌شود. میزان واردات زردچوبه به ایران در سال 1384 حدود 7 هزار تن بوده است.



شکل 1-6- گیاه زردچوبه

### 1-3-4-5-1- شیمی زردچوبه

تجزیه و تحلیل‌های انجام شده روی زردچوبه نشان می‌دهد که این ماده شامل ترکیبات متعددی است که مهمترین آنها شامل روغن‌های ضروری (تورمرون‌ها، آتلاتونها و زینجیبرن)، تورمرین (یک پپتید محلول در آب) و کورکومینوئیدها می‌باشد. دیگر مواد موجود در زردچوبه شامل مواد معدنی (مثل پتاسیم)، کاروتن، ویتامین C و نشاسته ژلاتینیزه است (5 و 61). تورمرین زردچوبه پپتیدی محلول در آب با وزن مولکولی 5 کیلو دالتون است و حدود 0/15 درصد وزن خشک زردچوبه را تشکیل می‌دهد و می‌توان آن را به صورت کریستالی درآورد. این



پیتید 40 ریشه اسید آمینه‌ای دارد و غیرحلقوی بوده و در انتهای C دارای لوسین است. تورمرین نسبت به تریپسین، پپسین، گرما و اشعه مافوق بنفش حساس نبوده و در ساختار آن سه ریشه متیونین دیده می‌شود که مسئول بخشی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد (62).

از عصاره آبی زردچوبه پروتئینی به نام TAP با فعالیت آنتی‌اکسیدانی جدا شده است که نسبت به گرما پایدار و مقاوم است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی این پروتئین در محیط حاوی تریپسین از بین می‌رود. به طور کلی زردچوبه شامل 13/1 درصد رطوبت، 5/1 درصد چربی، 3/5 درصد مواد معدنی، 69/4 درصد کربوهیدرات، 5/8 درصد روغن ضروری حاصل از تقطیر ساقه و ریزوم است (8).

### 1-3-4-5-2- توکسیکولوژی

استفاده از زردچوبه و اولئورزین حاصل از آن در امریکا برای مصارف غذایی، دارویی و آرایشی به عنوان افزودنی رنگی مطابق با GMP مجاز می‌باشد. زردچوبه و اولئورزین آن در ترشیجات، خردل، ادویه‌ها، سس‌های سالاد، روغن‌های پخت، مارگارین، بستنی، پنیر، فرآورده‌های نانوائی، شیرینی‌جات و سوپ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. مصرف زردچوبه در هند و خاورمیانه که محل اصلی تولید آن است، بسیار بالاست. به عنوان مثال در هند دریافت روزانه آن در بزرگسالان بیش از 3/8 گرم در روز تخمین زده شده است. JECFA زردچوبه را به عنوان یک ماده غذایی در نظر گرفته و ADI برای آن تعیین نموده است. در سال 1990، ADI موقتی برای اولئورزین زردچوبه 0/01 میلی‌گرم در کیلوگرم و برای کورکومین 0-0/1 میلی‌گرم در کیلوگرم تعیین شد. در سال 1995، ADI کورکومین به 1 میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش یافت (5).

از آنجا که مصرف زردچوبه در اروپا، هند و خاورمیانه بسیار بالاست در معرض آزمایشات ایمنی شناسی مختلف قرار گرفته است (جدول 1-12). شواهد بسیار نشان می‌دهد که زردچوبه و



اولئورزین آن ژنوتوکسیک نیستند و برخی مطالعات اثرات ضد موتاسیونی نیز برای آن‌ها گزارش نموده اند (5 و 16).

سمیت حاد دهانی آن بسیار پایین است. LD<sub>50</sub> دهانی برای اولئورزین در موش‌های صحرایی و موش‌ها بیش از 10 گرم در کیلوگرم و برای کورکومین در موش‌ها بیشتر از 2 گرم در کیلوگرم است.

هیچ مدرکی دال بر سرطان‌زایی، مسمومیت تولید مثلی و یا تراتولوژی این ترکیب به دست نیامده است و گزارش شده است که می‌تواند اثرات ضد سرطان‌زایی داشته باشد. همچنین اثری بر روی هماتولوژی یا اعمال تولید مثلی مشاهده نشد.

اثرات سیتوتونیک شامل توقف میتوز، تغییر مورفولوژی کروموزومی، تغییر سنتز اسید نوکلئیک در هامستر چینی، موش کاکتوس، گوزن کوچک هندی و در کشت‌های کوتاه مدت لنفوسیت‌های انسانی مشاهده شده است (16 و 85).

کورکومین بسیار کم جذب می‌شود و به سرعت نیز دفع می‌گردد. جذب آن در حدود 25 درصد گزارش شده است. متابولیسم این ماده به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. کورکومین عمدتاً به کوئژوگه‌های گلوکورونیدی متابولیزه می‌شود. گلوکورونیدهای تتراهیدرو و هگزاهیدروکورکومین متابولیت‌های اصلی صفراوی و دهیدروفرالیک اسید متابولیت جزئی آن می‌باشد. جذب ضعیف کورکومین از روده، متابولیسم فوری آن توسط کبد و نیز دفع سریع آن از طریق مدفوع سبب جلوگیری از تجمع غلظت‌های بالای آن در بدن در پی مصرف کورکومین می‌شود (16 و 39 و 89).

جدول 1-12- مطالعات انجام شده بر روی سمیت و ایمنی زردچوبه

شرایط آزمایش	نتیجه
موش صحرایی	دریافت 500 میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن/روز زردچوبه به مدت 1 سال
	عدم مشاهده هرگونه اثرات سمی و مسمومیت





عدم مشاهده هرگونه اثرات سمی و مسمومیت	60 میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن/روز عصاره الکلی زردچوبه را به مدت 1 سال	موش صحرائی
عدم مشاهده هرگونه اثرات سمی و مسمومیت	250 میلی‌گرم /کیلوگرم وزن بدن / روز زردچوبه به مدت 60 هفته	موش صحرائی
عدم مشاهده هرگونه اثرات زیان آور	دریافت 500 میلی‌گرم زردچوبه/کیلوگرم وزن بدن / روز به مدت 9 ماه	میمون
عدم مشاهده هرگونه اثرات زیان آور	دریافت 750 میلی‌گرم زردچوبه/کیلوگرم وزن بدن / روز به مدت 1 سال	سگ
عدم مشاهده هرگونه اثرات زیان آور	1٪ زردچوبه تجاری در طول 420 روز	سگ
عدم مشاهده هرگونه اثرات زیان آور	0/5٪ زردچوبه در طول 420 روز	موش صحرائی نر و ماده
عدم فعالیت سرطان‌زایی در هیچ یک از غلظت‌های مورد آزمون	دریافت 0، 2000، 10000 و 50000 میلی‌گرم/کیلوگرم اولئوزرین زردچوبه طی مطالعات 2 ساله به عنوان بخشی از برنامه آزمون‌های بیولوژیکی NTP	موش صحرائی و موش
عدم مشاهده هر گونه اثرات تراتوژنیک و یا مسمومیت تولیدمثلی	دریافت 500 میلی‌گرم / کیلوگرم / روز زردچوبه یا 60 میلی‌گرم / کیلوگرم/روز عصاره الکلی آن در یک رژیم 12 هفته‌ای قبل از جفت‌گیری، در طول دوره بارداری و در دوره شیردهی	موش صحرائی
مشاهده بزرگ شدن کبد، زخم معده و هایپرپلازی در مسیر گوارشی. فعالیت سمی مربوط به بازدارندگی از فعالیت آنزیم های P-450 سیتوکروم می باشد.	مصرف 400 میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن/روز یا بالاتر (2000 میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن/روز)، شده است.	انسان
عدم افزایش معنی دار در شیوع گلبول های قرمز نابالغ، انحرافات کروموزوم‌های مغز استخوان، تغییرات میزان بارداری و یا زنده‌مانی جنین‌ها در میان سایر موش ها	دریافت رژیم حاوی 0/5٪ زردچوبه یا 0/015 کورکومین	موش

### 1-3-4-5-3- اثرات سلامتی زایی

زردچوبه به خاطر خواص درمانی گزارش شده آن، در معالجه انواعی از بیماری‌ها مورد

استفاده قرار می‌گیرد. در اوایل دهه 1950 مشخص شد که زردچوبه دارای اثرات آنتی اکسیدانی

قوی است که مربوط به کورکومین به عنوان ترکیب اصلی و در پی آن دمتوکسی کورکومین و بیس دمتوکسی کورکومین می‌باشد. هر سه این ترکیبات از پراکسیداسیون چربیها جلوگیری نموده و اثر آنتی اکسیدانی مثبت بر روی همولیز و پراکسیداسیون چربیها در اربیتروسیتهای موش دارند. در حال حاضر قرص‌های حاوی زردچوبه به عنوان عامل جلوگیری از سرطان روده در بازار به فروش می‌رسد. زردچوبه در تهیه انواع غذاها به خوبی مورد استفاده قرار می‌گیرد و اگر اثرات سلامتی‌زایی آن در کنار خاصیت رنگ‌دهندگی و طعم‌دهندگی به اثبات برسد، کاربرد آن در آینده در صنعت غذا تضمین شده است (7 و 48).

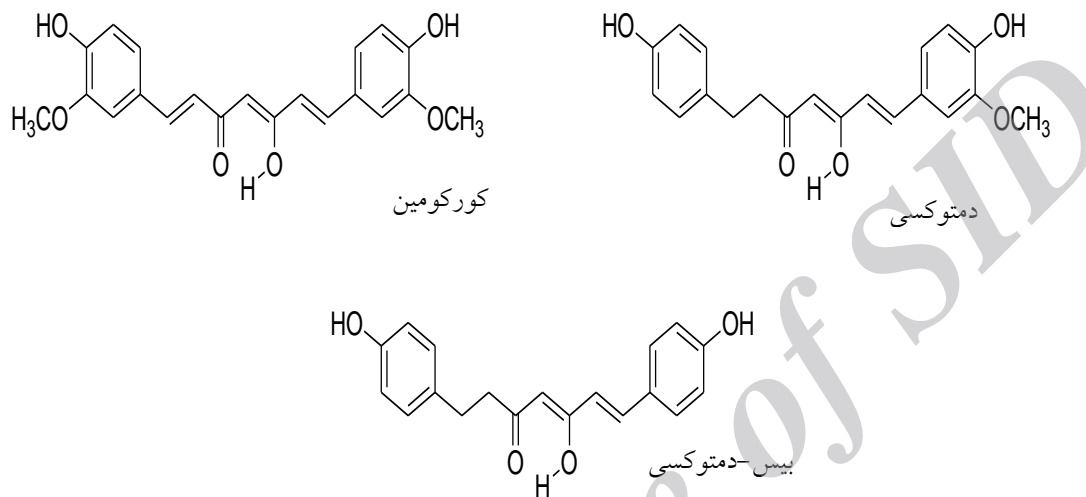
### 1-3-4-5-4- کورکومین

کورکومین<sup>1</sup> (دی فرول متان یا بیس (4- هیدروکسی-3- متوکس فنیل) و 1و6- هپتادی ان-3و5-دی ان)<sup>2</sup> رنگدانه زرد رنگی است که از ریشه های گیاه *Curcuma longa L.* که از خانواده زنجبیل می‌باشد، بدست می‌آید. ترکیبات شیمیایی اجزای اصلی گیاه زردچوبه شامل روغن زردچوبه، اولئورزین، کورکومینوئید و عطر زردچوبه می‌باشد. کورکومین یک پلی فنل هیدروفوب می‌باشد. کورکومین در حقیقت همان اولئورزین پالایش شده و عاری از روغن فرار است. مولکول کورکومین ترکیبی از دو کروموفور آریل بوتن 2- فریلول است که به وسیله یک گروه متیلن به هم متصل شده‌اند. کورکومین تجاری استخراج شده از ریزوم زردچوبه دارای 77 درصد کورکومین، 17 درصد دمتوکسی کورکومین و 3 درصد بیس دمتوکسی کورکومین می‌باشد. فعالیت دو ماده اول تقریباً با هم برابرند در حالی که فعالیت ترکیب سوم از دو ترکیب دیگر کمتر است (شکل 1-7). در مولکول کورکومین زنجیر اصلی آلیفاتیک است که گروه‌های غیراشباع و آریل

<sup>1</sup> Curcumin

<sup>2</sup> Diferuloylmethane

می‌توانند در آن جایگزین شوند. به طور کلی کورکومین حدود 2 تا 8 درصد مخلوط‌های زردچوبه را در برمی‌گیرد (76 و 76).



شکل 1-7- ساختار شیمیایی ترکیبات تشکیل‌دهنده کورکومینوئید

کورکومین دارای نقطه ذوب 183 درجه سانتیگراد و فرمول شیمیایی  $C_{21}H_{20}O_6$  می‌باشد. کورکومین خالص به شکل پودری کریستالی و نامحلول در آب بوده و به راحتی در حلال‌هایی مانند استون، اتانول و متانول حل می‌شود. بیشترین جذب این ترکیب در حلال‌های آلی در طول موج‌های 420 تا 430 نانومتر بوده و توانایی نشر تابش فلورسنس در 530 نانومتر در حلال آلی را دارا می‌باشد، هرچند این امر در محلول‌های آبی تا حدی کاهش می‌یابد. کورکومین در pH 7- را 2/5 به رنگ زرد بریلیانت و در  $pH > 7$  قرمز رنگ می‌باشد. کورکومین پایداری خوبی در برابر حرارت و اسید از خود نشان می‌دهد، اما به نور حساس است. با وجود این می‌توان از آن برای محصولاتی که در بسته بندی‌های غیر شفاف بسته‌بندی می‌شوند استفاده نمود. کورکومین



بدست‌آمده از زردچوبه توسط استانداردهای معتبر دنیا (<sup>1</sup>FAO, <sup>2</sup>EU, <sup>3</sup>WHO) به عنوان یک رنگ خوراکی با منشاء طبیعی پذیرفته شده و دارای کد E<sub>100</sub> می‌باشد. لازم به ذکر است که بر اساس تحقیقات انجام شده مصرف کورکومین در دز مصرف خیلی زیاد هیچ‌گونه اثر جانبی زیان‌آوری ندارد (63 و 86).

اگرچه کورکومین دامنه وسیعی از فعالیت‌های داروشناسی را نشان می‌دهد، اما خصوصیات ضد سرطانی آن توجه زیادی به خود معطوف داشته است. در حدود 100 مقاله خصوصیات ضد سرطانی کورکومین را بررسی کرده اند (15). در طی چند سال گذشته مطالعات زیادی برای بروز خصوصیات دارویی آن شامل حساسیت شیمیایی، حساسیت به تشعشع، فعالیت‌های بهبود زخم، خاصیت ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد آماسی آن انجام شده است (19). در یک بررسی مشخص گردید که کورکومین تشکیل تومورها را در مدل‌های حیوانی سرطانزا ممانعت می‌کند. کورکومین دامنه وسیعی از فعالیت زیستی و فتوشیمیایی که شامل: سمیت نوری<sup>4</sup> به باکتریها است را نشان می‌دهد. مکانیسم حساسیت نوری کورکومین ناشناخته است، اما مشخص شده که به اکسیژن نیاز دارد. بر اساس تحقیقات محصولات نوری پایدار نظیر وانیل و اسید فرولیک مسئول سمیت سلولی<sup>5</sup> کورکومین نیستند. بسیاری از گمانه زنی‌ها به گونه‌های اکسیژن فعال نوری که تولید می‌شوند مانند اکسیژن تک<sup>6</sup>، رادیکال هیدروکسیل، سوپراکسید و پراکسید هیدروژن برمی‌گردد (16).

<sup>1</sup> Food and Drug Administration

<sup>2</sup> European Union

<sup>3</sup> World Health Organization

<sup>4</sup> Phototoxicity

<sup>5</sup> Cytotoxicity

<sup>6</sup> Singelet oxygen



## 1-4- روش‌های استخراج، جداسازی و تشخیص مواد مؤثره گیاهی

### 1-4-1- روش‌های استخراج و عصاره‌گیری

مهمترین روش‌های استخراج مواد مؤثره گیاهان عبارتند از:

#### الف- روش خیساندن<sup>۱</sup>

عمل خیساندن بوسیله آب یا حلال‌های دیگر صورت می‌گیرد. گیاه را به صورت پودر درآورده، در حلال می‌ریزند و 2-4 روز در درجه حرارت 15-20 درجه سانتیگراد روی تکان‌دهنده قرار داده، سپس صاف می‌کنند.

#### ب- روش پرکولاسیون

گیاه را به صورت پودر در آورده و در وسیله‌ای به نام پرکولاتور عصاره‌گیری را انجام می‌دهند.

#### ج- روش هضم<sup>۲</sup>

این روش در واقع همان روش خیساندن به اضافه کمی حرارت (40-50 درجه سانتیگراد) می‌باشد و در شرایطی استفاده می‌شود که حرارت باعث خراب شدن مواد نشود و قدرت استخراج حلال را زیاد کند.

#### د- روش دم کردن<sup>۳</sup>

این روش برای استخراج موادی که محلول در آب هستند به کار می‌رود. فرمول کلی این روش به صورت زیر است:

<sup>40</sup> Maceration-soaking-steep

<sup>41</sup> Digestion

<sup>42</sup> Infusion

مقدار 50 گرم از پودر گیاهی با اندازه ذره ای بزرگ و آب تا 1000 میلی لیتر پودر را در ظرف می‌ریزند و با 50 میلی لیتر آب مرطوب می‌کنند. پس از 15 دقیقه بقیه آب را به صورت جوشیده اضافه می‌کنند و درب ظرف را محکم بسته و پس از 30 دقیقه آن را صاف می‌کنند.

ه- روش جوشاندن<sup>43</sup>

برای گیاهانی که مواد مؤثره آنها پایداری حرارتی بالایی دارند، به کار برده می‌شود. پودر گیاهی مورد استخراج را در فلاسک ریخته، 1000 میلی لیتر آب سرد اضافه می‌کنند و درب آن را محکم می‌بندند. سپس 15 دقیقه تا نیم ساعت آن را به آرامی می‌جوشانند و پس از این که دما به 40 درجه رسید آن را با فشار صاف می‌کنند.

و- روش سوکسله

جهت گرفتن مواد چربی، موم و مواد رنگی قبل از استخراج مواد مؤثره گیاه مورد آزمایش هنگامی که مطمئن باشیم حرارت مواد مؤثره گیاهی را خراب و تجزیه نمی‌کند (27، 63، 81 و 98).

#### 1-4-2- جدا کردن مواد مؤثره از یکدیگر

مهمترین روش‌های جدا کردن مواد مؤثره گیاهی عبارتند از:

الف- کروماتوگرافی

جدا کردن ترکیبات موجود در گیاهان اغلب شامل به کار بردن یک یا مجموعه ای از روش‌های

کروماتوگرافی است که مهمترین آنها عبارتند از:

- کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

- کروماتوگرافی روی کاغذ صافی (PC)

- کروماتوگرافی ستون

<sup>43</sup> Decoction



- گاز کروماتوگرافی (GC)
- کروماتوگرافی تبادل یونی
- کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی

#### ب- الکتروفورز

به منظور جدا کردن ترکیبات با بار الکتریکی از قبیل اسیدهای آمینه، بعضی آلکالوئیدها، آمین‌ها، اسیدهای آلی و پروتئین‌ها و نیز برای بعضی ترکیبات گیاهی خنثی مثل قندها و فنل‌ها از طریق تبدیل آنها به کمپلکس‌های فلزی (مثل استفاده از بورات سدیم) به کار می‌رود.

ج- استخراج مواد به روش سنجش بین دو فاز مایع که به خصوص جهت جدا کردن کاروتنوئیدها به کار می‌رود.

د- دستگاه کریگ<sup>1</sup> که جهت استخراج جسم به روش پخش بین دو مایع غیر قابل امتزاج به کار می‌رود.

ه- جدا کردن پروتئین‌های گیاهی و اسیدهای نوکلئیک که اغلب نیاز به روش‌های خاصی مانند صاف کردن از ستون‌های حاوی سفادکس و سانتریفیوژ نمودن مرحله‌ای دارند (17، 36، 71 و 107).

### 1-4-3- روش‌های تشخیص مواد مؤثره گیاهی

برای تشخیص ترکیبات موجود در گیاهان پس از جدا کردن و خالص نمودن ابتدا باید طبقه‌ای که جسم به آن وابسته است تعیین شود. خلوص و یکنواختی جسم نیز باید تعیین شود. یعنی بر روی صفحه کروماتوگرام کاملاً به صورت یک لکه مشخص باشد. در بعضی موارد آزمایش‌های بیوشیمیایی مفید است. تشخیص کامل از طریق تعیین ثابت‌های فیزیکی و طیف‌های جسم و

<sup>1</sup> Craig

مقایسه آنها با آنچه قبلا در این باره گزارش شده است انجام می‌شود. این ثابت‌ها شامل نقطه ذوب (برای اجسام جامد)، نقطه جوش (برای مایعات)، قدرت چرخش نور پلاریزه (برای اجسامی که قادر به چرخش نور پلاریزه می‌باشند) و  $R_f$  یا  $R_R$  (تحت شرایط استاندارد) می‌باشد. اطلاعات حاصله از روی طیف اجسام موجود در گیاهان دارای ارزش زیادی است. این طیف‌ها شامل ماوراء بنفش، مادون قرمز، رزونانس مغناطیسی هسته‌ای<sup>1</sup> و اسپکتر جرم می‌باشد. با استفاده از اطلاعات حاصله از این طیف‌ها می‌توان فرمول جسم جدا شده از گیاهان را تعیین نمود (16 و 74).

### 1-5 - فناوری استفاده از امواج فراصوت

امواج فراصوت به امواج با فرکانس بیش از 18 کیلوهرتز اطلاق می‌شوند که توسط انسان قابل شناسایی نیستند و در دو محدوده قوی (فرکانس پایین: 18-100 کیلوهرتز) و ضعیف (فرکانس بالا 100 کیلوهرتز-10 مگاهرتز) طبقه بندی می‌شوند (65 و 72). امواج فراصوت با فرکانس پایین در صنایع غذایی دارای کاربردهای متعددی می‌باشند (جدول 1-13).

جدول 1-13- کاربرد امواج فراصوت قوی در صنایع غذایی

اثرات مکانیکی	اثرات شیمیایی
اختلاط بهتر	تسریع واکنشهای اکسیداسیون
استخراج ترکیبات مولد عطر و طعم	استریلیزاسیون تجهیزات
ترد کردن گوشت	تمیز کردن سطوح
کریستالیزاسیون چربی‌ها	تاثیر بر میکروارگانیسم‌ها
بهبود انجماد و خروج از انجماد در مواد غذایی	تاثیر بر آنزیم‌ها
خشک کردن و فیلتراسیون	

جدول 1-14- کاربرد امواج فراصوت ضعیف در صنایع غذایی

<sup>1</sup> HNMR



پارامتر اندازه گیری	کاربرد در مواد غذایی
C	تعیین غلظت شکر در محلول های آبی
C,a	تعیین غلظت نمک در محلول آب نمک
C,a	تعیین میزان تری گلیسرید در روغن
C,a	تعیین اندازه ذرات در یک امولسیون
C	تعیین میزان الکل در نوشیدنی
C,a	تعیین ترکیب شیر
C,a	تعیین غلظت بیوپلیمرها در ژل
C,a,z	ارزیابی کیفیت تخم مرغ
C,a	رسیدگی و کیفیت انواع میوه ها
T	بررسی ژلاتیناسیون انواع ژل ها
T,z	تعیین دبی جریان سیالات درون لوله ها
C,a	تعیین وجود مواد خارجی در نوشیدنی ها
T,z	

در جدول 1-14- نیز کاربرد انرژی فراصوت با فرکانس های قوی نشان داده شده اند. مهمترین تفاوت امواج فراصوت مورد استفاده در فرآوری یا آنالیز ترکیبات غذایی، شدت آنها می باشد. در شدت های پایین، امواج قادر به تغییر ویژگی های محیطی که در آن منتشر می شوند، نیستند (65 و 73).

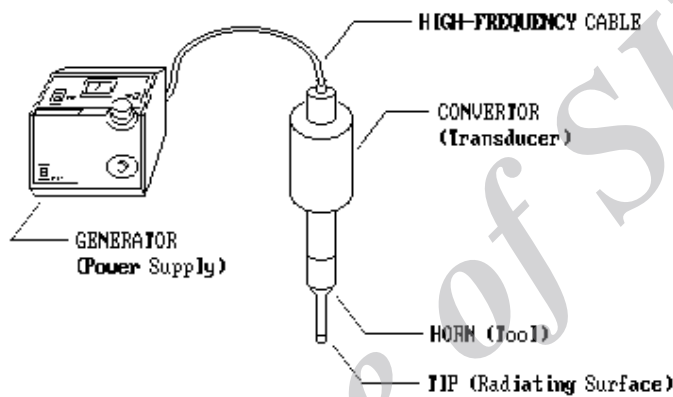
غلظت: C، ضریب شکست: a، زمان: T، تعداد: Z

تجهیزات تولید کننده امواج فراصوت:

مهمترین قسمت ها عبارتند از:

- ژنراتور تولید جریان الکتریسیته

- مبدل (قسمت ایجاد کننده موج)
- قسمت انتقال موج از دستگاه به نمونه که معمولا از جنس تیتان، سرامیک یا شیشه های مخصوص می باشد.
- در شکل 1-8 یک دستگاه آزمایشگاهی تولید امواج فراصوت، نشان داده شده است.



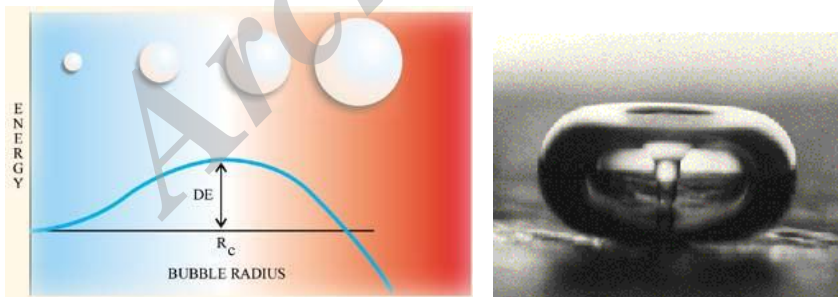
شکل 1-8- شمانیک دستگاه آزمایشگاهی تولید امواج فراصوت

### 1-5-1- مکانیسم تاثیر امواج فراصوت با شدت بالا

- کاویتاسیون:
- مهمترین دلیل امواج فراصوت با شدت بالا، پدیده ای به نام کاویتاسیون می باشد. طبق تعریف، کاویتاسیون، عبارتست از تشکیل، رشد و متلاشی شدن حباب های کوچک در مایع در اثر ایجاد فشار منفی زیاد. امواج فراصوت، نظیر همه امواج متشکل از چرخه های انقباض و انبساط هستند. چرخه های انقباض فشار مثبتی را بر مایع اعمال می کنند که باعث نزدیک شدن مولکول ها به یکدیگر می شود، اما چرخه های انبساط فشار منفی را ایجاد می نمایند که سبب دور شدن مولکول ها از یکدیگر می گردد. در امواج فراصوت افزایش شدت موج

سبب افزایش تغییر مکان یا جابجایی ذرات می‌گردد، بنابراین در حین نوسان، فاصله مولکول‌ها بیشتر از فاصله بحرانی خواهد بود که برای نگه داشتن مولکول‌های مایع در کنار یکدیگر ضروری است. به این ترتیب زمانی خواهد رسید که فاصله مولکول‌ها و جابجایی در حدی می‌باشد که باعث خارج شدن یک مولکول از دایره ارتباطی مولکول مجاورش و ایجاد حباب می‌گردد که به این پدیده اصلاحا کاپیتاسیون گفته می‌شود که در واقع معادل جوشیدن سرد است. از لحاظ تئوری عنوان می‌شود که حباب هنگامی به وجود می‌آید که فاصله مولکول‌ها از یکدیگر به دو برابر شعاع واندروالسی برسد. هنگامی که یک مایع ایجاد حباب می‌کند که فشار مایع (PL)، کمتر از فشار بخار مایع (Pv) باشد همچنین با توجه به معادلات ریاضی میزان فشار منفی لازم جهت ایجاد چنین حالتی در آب خالص 10000 اتمسفر است، اما به دلیل وجود گاز یا ذرات جامد این میزان در عمل به مراتب کمتر می‌باشد. شکل 1-9 مراحل پدیده کاپیتاسیون را نشان می‌دهد (65، 73 و 95).

مراحل کاپیتاسیون عبارتند از: تشکیل حباب اولیه، رشد حباب و متلاشی شدن آن



شکل 1-9- مراحل مختلف پدیده کاپیتاسیون

## 1-5-2- کارایی امواج فراصوت در علوم زیستی

از جمله مهمترین کاربردهای امواج فراصوت، کاربرد آنها در تمیز کردن سطوح با تاثیر بر میکروارگانیسم ها می باشد. به عنوان مثال می توان به کاربرد این امواج در تمیز کردن سطح تخم مرغ ها در مراکز پرورش طیور اشاره کرد. مهم ترین میکروارگانیسم های موجود در فرآورده های طیور عبارتند از: کامپیلوباکتر و سالمونلا. یافته های محققان نشان می دهد که این باکتری ها به شکل محکمی به پوسته طیور اتصال دارند و اگر چه باکتریوسیدهای موجود در آب شستشو می تواند بر آنها تاثیر بگذارد، به دلیل اتصالات محکم آنها با پوسته تخم مرغ گاهی اوقات این روش موثر نمی باشد. از آنجا که آلودگی ها می توانند از طریق منافذ پوسته به درون تخم مرغ انتشار نمایند و محتویات موجود در آن را آلوده سازند و در نهایت سبب ترکیدن تخم مرغ و فساد شوند، راهکارهای موثرتری باید مدنظر قرار گیرند. یکی از بهترین روشها در این زمینه کاربرد امواج فراصوت می باشد. همچنین می توان به کاربرد همزمان امواج فراصوت و مواد باکتریوسید اشاره نمود (65 و 73).

یکی از کاربردهای اصلی امواج فراصوت در بیوتکنولوژی، شکستن سلول های بیولوژیکی و آزاد کردن محتویات آنها از جمله آنزیم ها است. تاثیر امواج فراصوت بر روی آنزیم ها متفاوت بوده، به شدت و فرکانس جریان، ساختمان مولکولی آنزیم و ماهیت محیط سونوسکاسیون بویژه از نظر گازهای حل شده بستگی دارد. در عمل سونیکاسیون، می توان شدت و فرکانسی را به کار برد که سبب دناتورده شدن آنزیم نشود، اگرچه چنین مکانیسمی بر روی میزان فعالیت آنزیم ها تاثیر خواهد داشت.

از کاربردهای جالب امواج فراصوت، استفاده از آنها در فعال سازی سونوشیمیایی آنزیم های تثبیت شده می باشد. به نظر می رسد امواج فراصوت میزان انتقال سوبسترا در بستر آنزیم را افزایش می دهد. روش های کلاسیک مورد استفاده در استخراج ترکیبات با استفاده از حلال، به نوع حلال، استفاده از هوا و حرارت دهی بستگی دارد (73 و 95).

### 1-5-3- مکانیسم های تاثیر گذار امواج فراصوت در فرآوری مواد غذایی

مکانیسم های تاثیر گذار امواج فراصوت در فرآوری مواد غذایی شامل موارد ذیل می باشند.

#### 1- تحریک فعالیت سلول های زنده

مثال های متعددی در مورد کاربرد امواج فراصوت جهت افزایش تولید مواد غذایی از طریق تحریک سلول های زنده بدون تخریب دیواره سلولی وجود دارد. از جمله این موارد می توان به تاثیر رشد سلول های آلگ ها در محیط مایع مغذی اشاره کرد که این امر سبب افزایش میزان پروتئین تا حد سه برابر می گردد و در تولید مواد غذایی از منابع ارزان قیمت بسیار حائز اهمیت است (65).

در تولید ماست، کاربرد امواج فراصوت سبب کاهش مدت زمان فراوری تا حد 40% می شود. همچنین این امواج میزان وابستگی محصول به نوع ماده اولیه را کاهش داده، منجر به بهبود ویژگی های بافتی محصول می گردد.

#### 2- تخریب سونوشیمیایی

امواج فراصوت با شدت بالا قادر به تغییر دیواره سلولی و در نتیجه از بین بردن میکروارگانیسم ها می باشند. نخستین بار هاروی و لومیس در سال 1929 به تاثیر کشندگی امواج فراصوت بر میکرو ارگانیسم ها اشاره کردند. اکثر بررسی ها در این زمینه مربوط به درجه کشندگی کشت هایی است که در معرض امواج فراصوت قرار می گیرند. باکتری ها بویژه اسپورها نسبت به امواج فراصوت مقاوم می باشند و ساعت ها اولتراسونیکاسیون بر روی آنها تاثیری نخواهد داشت، گزارش هایی مبنی بر کاربرد امواج فراصوت در پاستورزاسیون شیر وجود دارد. کاهش تعداد سالمونلا تیفی موریوم کاملا وابسته به زمان است و بیشترین کاهش تعداد پس از 30 دقیقه اولتراسونیکاسیون در دمای 50 درجه سانتی گراد مشاهده می شود (65 و 95).

## 1-5-4- کاربرد امواج فراصوت در صنایع غذایی

### 1-4-5-1- کنترل فرآیندهای غشایی

امروزه فیلتراسیون به دلیل امکان افزایش دبی جریان مورد توجه قرار گرفته است. غشاهای مورد استفاده در فیلتراسیون به دلیل امکان مسدود شدن منافذ باید هر چند وقت یکبار تعویض شوند، در حالیکه با کاربرد امواج فراصوت این مشکل تا حد زیادی مرتفع می‌شود. امواج فراصوت با آگلومریزاسیون ذرات سبب تسریع فیلتراسیون می‌شوند، از سویی با ایجاد ارتعاش در ذرات مانع از نشست ذرات می‌شوند، بر این اساس کانال‌های آزاد برای عبور تراوه وجود خواهد داشت (54).

### 1-4-5-2- کنترل فرآیند کریستالیزاسیون

امواج فراصوت سبب کنترل فرآیند کریستالیزاسیون در طی انجماد می‌شوند. تاثیر این امواج ناشی از پدیده کاویتاسیون بوده، منجر به هسته‌زایی بیشتر، افزایش سرعت رشد کریستال‌ها و کاهش تخریب سلولی می‌شود. در طی فرآیند انجماد، بافتهای گیاهی در معرض چندین نوع آسیب می‌باشند شامل آسیب ناشی از سرما، افزایش غلظت نمک‌های محلول، آبزدایی و تخریب مکانیکی. این آسیب‌ها منجر به تغییر غشاء سلولی، اختلال در سیستم متابولیکی، دناتوراسیون پروتئین‌ها، انتشار آب درون سلولی به محیط خارج و غیر فعال شدن آنزیم‌ها می‌شود و در نهایت ماده غذایی پس از خروج از انجماد کیفیت مطلوبی نخواهد داشت. کاربرد امواج فراصوت به همراه سایر روش‌های انجماد از جمله غوطه‌وری، سبب بهبود کیفیت محصول منجمد می‌شود (65).

### 1-4-5-3- تولید ترکیبات آلی

تاثیر امواج فراصوت در سنتز ترکیبات آلی، علاوه بر تسریع واکنش‌ها بویژه در محیط‌های هتروژن، سنتز تعدادی از عوامل فعال در واکنش‌ها و افزودن عوامل انتقال‌دهنده الکترون به

واکنشهای سونوشیمیایی نیز از این موارد می باشد. از جمله کاربدهای سونوشیمی در این زمینه می توان به بررسی شیمی  $n$  آلیل تری کربونیل آبرون لاکتون و لاکتام اشاره نمود که در سنتز بسیاری از ترکیبات فعال بیولوژیکی حائز اهمیت می باشند (65).

#### 1-4-4-5- بهینه سازی استخراج ترکیبات آلی

استفاده از امواج فراصوت سبب تسهیل استخراج ترکیبات آلی از مواد و دانه های گیاهی می شود. تاثیرات مکانیکی کاربرد این امواج منجر به انتشار بیشتر حلال به درون سلول ها و افزایش میزان انتقال جرم می شود. همچنین تخریب دیواره سلول های بیولوژیکی منجر به تسریع آزاد شدن محتویات آنها می گردد. امواج فراصوت با مکانیسم های مختلف ممکن است منجر به افزایش میزان خروج رطوبت از ماده غذایی در طی فرآیند خشک کردن یا سایر عملیات واحد مستلزم انتقال جرم شوند که از جمله آنها می توان به افزایش دما در لایه مرزی، تغییر فشار در اثر کاویتاسیون، توسعه میکروکانال ها در اثر ایجاد ترک در نتیجه تنش برشی حاصل از کاویتاسیون، اغتشاش در لایه مرزی و ایجاد تغییرات ساختمانی در محیط اشاره کرد. تنش متغیر صوتی از طریق حفظ کانال های موجود یا ایجاد کانال های جدید سبب تسهیل خشک کردن می گردد (65).

تحقیقاتی در زمینه استخراج قند از چغندر قند وجود دارد که نشان می دهد کاربرد امواج فراصوت علاوه بر افزایش انتقال جرم سبب تشدید اغتشاش و در نتیجه افزایش راندمان استحصال می گردد.

گونزالز و همکاران (2008) مشخص نمودند که اثر امواج فراصوت در استخراج قند به مدت زمان تابش و حرارت بستگی دارد و بهترین دما را 50 درجه سانتی گراد دانستند که 30٪ راندمان استخراج را افزایش می دهد (41).

امواج فراصوت در استخراج ترکیبات دارویی نظیر هلیسید و هیدروکلراید بربرین از گیاهان چینی مورد استفاده قرار گرفته اند و در برخی موارد کاربرد امواج فراصوت سبب می شود که استخراج در دمای پایین تری صورت بگیرد و در نتیجه در زمان کوتاهتر محصول با خلوص بیشتر بدست آید. هنگامیکه این روش برای استخراج عصاره میوه ها مورد استفاده قرار می گیرد، سبب افزایش راندمان استخراج آبمیوه از پالپ می شود.

حق نظری و همکاران (2003)، اثر مستقیم امواج فراصوت را بر استخراج شهد خرما و کیفیت میکروبی فراورده بررسی نمودند؛ بر این اساس، کاربرد امواج فراصوت سبب کاهش مدت زمان استخراج و افزایش راندمان در کنار بهبود ویژگی های کیفی فراورده نظی کاهش آلودگی میکروبی در مقایسه با روش قدیمی گردید. تاثیر فرایند اخیر ناشی از تحریک ترشح ترکیبات ضد میکروبی موجود در شیرخه خرما در حضور تیمار فراصوت بود (44).

در پژوهشی (طرح مصوب جهاد دانشگاهی) به منظور اکسایش الکل و مقایسه با روش کلاسیک، از روش اولتراسونیک استفاده شد؛ بر این اساس، در شرایط اولتراسونیک و بدون حلال محصول واکنش بسیار سریع تر بدست آمد.

### 1-5-5- آثار مثبت امواج فراصوت در استخراج

روش های سنتی استخراج را می توان از طریق هم زدن مکانیکی جهت افزایش سرعت انتشار و افزایش سطح تماس بین حلال و مواد گیاهی بهبود بخشید (65 و 73) اما به کار گیری فراصوت می تواند وجوه مختلف پروسه استخراج را از طریق پدیده کاویتاسیون تحت تاثیر قرار دهد، بهبود عمل شامل موارد زیر می باشد:

- تشدید انتقال جرم



یکی از اثرات شناخته شده فراصوت بهبود انتقال جرم ناشی از تخریب حباب های کاویتاسیون در محل و یا نزدیکی دیواره ها و سطوح تماس می باشد که این مسئله منجر به تشکیل ذرات بسیار ریز و یا امولسیفیکاسیون شده و سطح تماس بین حلال و ماده مورد نظر را افزایش و منجر به انتشار بیشتر مواد بدرون حلال می گردد.

#### - تخریب سلولی

فراصوت می تواند دیواره سلولی را تخریب کرده و محتویات آن را تخلیه کند، علاوه بر آن از طریق تاثیر بر توده مواد گیاهی سطح بیشتری از این مواد در تماس با حلال استخراج کننده قرار گرفته و در نتیجه استخراج بهتر و کارآمدتری از مواد گیاهی رخ می دهد، در واقع کاهش اندازه ذرات و پخش شدگی از اثرات مهم فراصوت در بهبود استخراج می باشند.

#### - بهبود نفوذ پذیری

فراصوت می تواند باعث بهبود نفوذ حلال به درون سلول های گیاهی و در نتیجه افزایش راندمان استخراج گردد، در هنگامی که حباب های کاویتاسیون در نزدیکی دیواره سلولی تخریب می شوند یک جت اولتراسونیک تشکیل شده که حلال را به سمت دیواره هدایت می کند که مانند یک پمپ سیال عمل کرده و در عمل این رانده شدن با فشار حلال به درون سلول محتویات درونی آن را حل کرده و آن ها را به خارج سلول هدایت می کند.

#### - اثرات موئینگی فراصوت

اثر سونوکاپیلاری<sup>1</sup> و یا بالا رفتن بر خلاف جهت یک مایع در یک لوله موئین تحت عمل فراصوت در سال 1960 کشف شد، اما تحقیقات در این زمینه بسیار اندک بود، از آنجایی که بعضی ترکیبات مورد نیاز مثل اسیدهای چرب ضروری درون سیستم های موئین گیاه قرار گرفته اند، می توان انتظار داشت که فراصوت می تواند به استخراج این مواد از طریق این اثر

<sup>1</sup> Sono capillary

کمک شایانی نماید. بعضی از پدیده های الکتریکی که همراه با اثر سونوکاپیلاری می باشند توسط یودا و همکاران (1950)<sup>1</sup> توضیح داده شده است، این محققان نشان دادند که هنگامی که فراصوت بر یک لوله کاپیلاری حاوی محلول های الکتریکی اعمال می شود در هر دو انتهای لوله کاپیلاری یک میدان الکتریکی افزایش یافته متناوب تولید می شود که این پدیده می تواند به استخراج یون ها و یا ترکیبات قطبی در روشی مشابه با الکتروفورز کمک کند.

بر اساس گزارشات ویکوها (2008)، علی رغم اینکه دسترسی به استخراج سریعتر با بازده بالاتر در آزمایشگاه تقریباً ساده می باشد اما تبدیل آن به مقیاس صنعتی بسیار مشکل ساز می باشد که این مسئله به نکات کلیدی مهمی بستگی دارد از جمله:

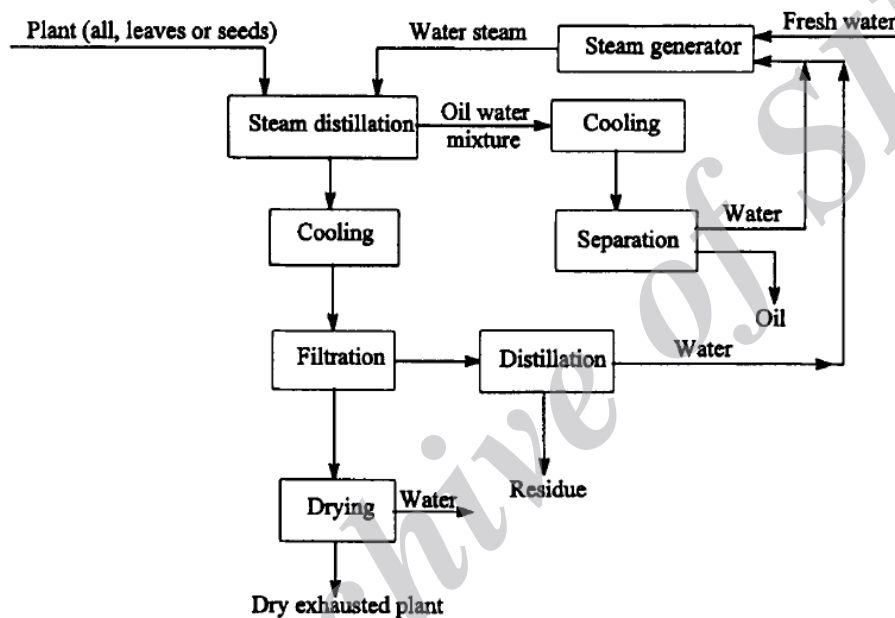
- 1- طبیعت بافتی که مورد استخراج قرار گرفته و موقعیت ترکیبات مورد استخراج بر اساس ساختمان بافت
- 2- پیش تیمارهای اعمال شده بر بافت قبل از عمل استخراج
- 3- طبیعت ماده مورد نظر
- 4- تاثیر پیش تیمارهای فراصوت بر بافت، شامل تخریب لایه های سطحی
- 5- افزایش انتقال جرم
- 6- انتشار داخل ذره ای
- 7- بارگیری محفظه استخراج توسط سوبسترا
- 8- افزایش بازده ترکیبات استخراج شده
- 9- افزایش سرعت استخراج به خصوص در مراحل ابتدایی چرخه استخراج که منجر به کاهش چشمگیر زمان استخراج و بازده بالاتر می گردد (95).

<sup>1</sup> Ueda et al

### 1-5-6- کارایی امواج فراصوت در مراحل مختلف فرایند استخراج

برای مشاهده اینکه در چه مرحله ای از استخراج به کارگیری امواج فراصوت می تواند منجر به بهبود راندمان آن شود، ابتدا لازم است که یک شمای کلی برای انواع روش های سنتی

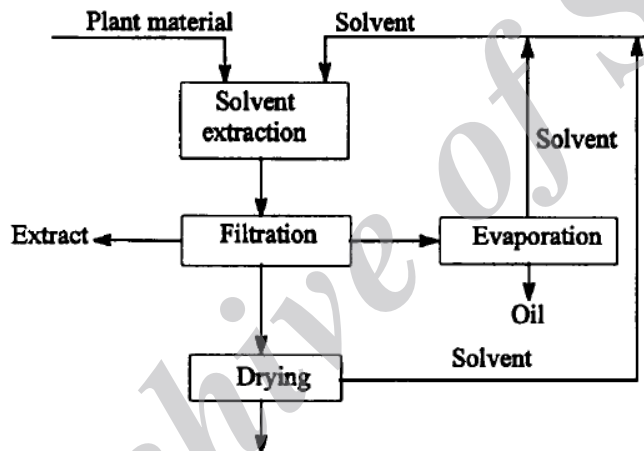
استخراج را طراحی کرد شکل (1-10)



شکل 1-10- طراحی کلی برای استخراج از طریق بخار آب جهت تولید روغن های ضروری

معمولا مواد گیاهی و آب در واحد تقطیر مخلوط شده و تا نقطه جوش آب حرارت دهی می شوند این عمل منجر به تبخیر آب شده که می تواند روغن را نیز به همراه خود داشته باشد. مخلوط بخار آب و روغن سپس سرد شده و جداسازی می شوند، آب مجدداً به واحد تقطیر باز می گردد. به وسیله این روش مقدار مناسبی از روغن بدست می آید، اما در پایان عمل مقدار زیادی آب حاوی مواد گیاهی باقی مانده که یک منبع آلودگی به حساب می آید، در بعضی مواقع از بهم زن برای بهبود بازده عمل و افزایش استخراج روغن در طول تقطیر استفاده می شود که می توان به جای آن از امواج فراصوت استفاده کرد.

استخراج با حلال معمولاً در دمای اتاق انجام گرفته، بنابراین منطقه مناسب برای طراحی امواج فراصوت در واحد استخراج حلال می‌باشد با توجه به استفاده از حلال الکلی و یا آبی می‌توان از حمام تمیز کننده اولتراسونیک و یا یک راکتور بسته تثبیت شده با یک ترانسدیوسر استفاده کرد که نوع دوم طراحی را می‌توان برای حلال‌های فرار مانند پترولیوم اتر به کار برد. طراحی شماتیک واحد استخراج با حلال در شکل (1-11) نشان داده شده است.



شکل 1-11- طراحی شماتیک واحد استخراج با حلال

کاربرد فراصوت به عنوان یک ابزار آزمایشگاهی جهت کمک بهتر به استخراج مواد گیاهی به طور گسترده ای گزارش شده است. گزارشات متعددی با موضوعات استخراج متابولیت‌های گیاهی، فلاوونوئیدها با استفاده از انواع متعددی از حلال‌ها و ترکیبات بیواکتیو گیاهی منتشر شده است که تعداد محدودی از آنها به استفاده از امواج فراصوت پیوسته و کاربرد آزمایشگاهی این تکنیک اشاره کرده‌اند (56، 59 و 87).

کاربرد امواج فراصوت در استخراج مواد گیاهی، روغن‌ها، پروتئین‌ها و ترکیبات بیواکتیو از مواد گیاهی (به عنوان مثال فلاوون‌ها و پلی فنول‌ها) در جدول 1-15 خلاصه شده است.

جدول 1-15- کاربرد امواج فراصوت در استخراج مواد گیاهی، روغن‌ها، پروتئین‌ها و ترکیبات

بیواکتیو از مواد گیاهی

منبع	بازده	حلال	فرآیند اولتراسوند	محصول
Riera,2004	30% افزایش در بازده یا کاهش زمان	دی اکسید کربن فوق بحرانی	غیرمداوم، 20 KHZ	روغن بادام
Vintoru,2001	34% افزایش بازده	آب و اتانول	غیرمداوم همزن دار 2400-20 KHZ	مواد گیاهی (فلفل، نعنا، گل همیشه بهار)
Wu, 2001	افزایش سرعت استخراج تا 3 برابر	آب، متانول و بوتانول	غیرمداوم، 35.8 KHZ	ساپونین جینسنگ
Balachandran, 2006	30% افزایش در بازده یا کاهش زمان	دی اکسید کربن فوق بحرانی	غیرمداوم، 20 KHZ	زنجبیل
Moulton and Wang,1982	53% تا 34% افزایش در مقایسه با شرایط امواج فراصوت غیرمداوم	آب و قلیا (هیدروکسید سدیم)	مداوم، 20 KHZ	پروتئین سویا
Rostago,2003	15% افزایش کارایی	آب و حلال	غیرمداوم، 24 KHZ	ایزوفلاوون سویا
Paniwink,2001	20% افزایش بازده در 30 دقیقه	آب و متانول	غیرمداوم، 20 KHZ	روتئین از درخت چینی اسکولار (Scholar)
Albu,2004	کاهش زمان استخراج	بوتانول و اتیل استات	غیرمداوم، KHZ 40و20	اسید کارنوزیک از رزماری
Xia ,2006	افزایش بازده در 65 °C قابل مقایسه با 80 °C	آب	غیرمداوم، 40 KHZ	پلی فنل، آمینواسید و کافئین از چای سبز
Romdhane and Gourdan,2002	افزایش بازده در 40 °C قابل مقایسه با 66 °C	هگزان	غیرمداوم، KHZ 40و20	پیرترین از گل

بافت های زنده ای که ترکیب مورد نظر در آن قرار دارند را می توان به وسیله امواج ملایم

فراصوت به گونه ای تحریک کرد تا ترکیبات درونی راحت تر آزاد شوند. در مواردی که

ترکیب مورد نظر در درون سلول ها قرار گرفته است، پیش تیمار های فراصوت از طریق کاهش اندازه و افزایش سطح تماس منجر به دسترسی به استخراج کامل تر و سریعتر می گردند. این در حالی است که برای عمل استخراج پیش تیمار حرارت دهی ضروری به نظر می رسد و به کارگیری امواج فراصوت می تواند به طور موثری پروسه حرارت دهی را کاهش دهد (73).

امواج فراصوت منجر به تشکیل حباب های کاونتاسیون شده که تشکیل یک سطح هیدروفوب در مایع استخراج می دهند و در نتیجه خاصیت هیدروفوبی شبکه های ژلی تشکیل شده در محیط استخراج را بالا برده، علاوه بر آن امکان استخراج ترکیبات قطبی در محیط های استخراج مایع هیدروفیل را فراهم کرده و همچنین نیاز به استفاده از ترکیبات اضافی هیدروفوب و یا محیط های استخراج با قطبیت بالا را کاهش می دهند. تخریب ساختمانی بافت های سطحی در هنگام به کار گیری امواج فراصوت به وسیله آزمایش های میکروسکوپی توسط بسیاری از محققان مشاهده شده است. با این حال توانایی کاونتاسیون های فراصوت در تولید رادیکال ای آزاد، به خصوص رادیکال هیدروکسیل موجب بروز نگرانی می باشد که در این موارد پتانسیل تخریب اکسیداتیو و تولید رادیکال های آزاد را می توان از طریق اضافه نمودن مقادیر کمی اتانول جهت کاهش دمای حباب های کاونتاسیون و حذف اثر شیمیایی آنها کاهش داد (65 و 95).

**فصل دوم**

**پیشینه تحقیق**



## 2- پژوهش‌های انجام شده در زمینه استخراج کورکومین

### 2-1- استخراج به کمک حلال

کیوروس در سال (2006) اظهار داشت که به خاطر ساختمان پیچیده کاروتنوئیدها و به دلیل گونه‌های متنوع آنها در گیاهان و میوه‌ها روش مرجعی برای استخراج کاروتنوئیدها وجود ندارد. حلال‌های آلی فراوانی مانند استن، تترا هیدرو فوران (THF)، n-هگزان، پنتان، اتانول، متانول، کلروفرم و همچنین مخلوط‌های حلال‌ها مانند استن: اتر، متانول: THF، n-هگزان: تولوئن و... به طور گسترده‌ای استفاده شده‌اند. با وجود اینکه THF و اتیل اتر به خاطر حلالیت بالای کاروتنوئیدها در آنها به طور گسترده‌ای استفاده می‌شدند، برخی از محققان اظهار داشته‌اند که این حلال‌ها ممکن است پراکسیدهایی تولید کنند و بتاکاروتن را به سرعت تجزیه نمایند. از این رو برخی محققان توصیه کرده‌اند که آنتی اکسیدان‌هایی مانند BHT به حلال اضافه شود (74).

تانگبوهیتام و همکاران در سال (1997) روش‌های استخراج مورد استفاده برای ارزیابی کاروتنوئیدهای موجود در میوه‌ها و گیاهان را بررسی کردند. در این مطالعه یک روش مناسب استخراج برای دامنه وسیعی از نمونه‌ها بررسی شد و این نتیجه حاصل گردید که مخلوطی از حلال‌های متانول و هگزان بهترین ترکیب استخراج کننده می‌باشد.

اختر و همکاران در سال (2008) لیکوپن را از ضایعات صنعتی گوجه فرنگی به کمک آب به عنوان حلال و نوعی دستگاه استخراج کننده جداسازی نمودند. در این بررسی استفاده از آب موجب کاهش هزینه استخراج شد و لیکوپن بدست آمده دارای درجه خلوص بسیار بالایی بود (16).

فیشر و روسف در سال (1986) شرایط بهینه برای استخراج لیکوپن از گوجه فرنگی و فرآورده‌های آن را مورد مطالعه قرار دادند. در این تحقیق مخلوط‌های مختلفی از حلال‌های



هگزان، استن و اتانول مورد بررسی قرار گرفت و نتیجه گرفته شد که بیشترین میزان استخراج در حالت استفاده از هر سه حلال مذکور بدست می‌آید (36).

کار و همکاران در سال (2008) شرایط استخراج لیکوپن از ضایعات کارخانه‌های فرآوری گوجه فرنگی را به روش سطح پاسخ بررسی کردند. در این بررسی تیمارهای آزمایش شامل سطوح مختلفی از ترکیب حلال‌ها با یکدیگر، تعداد دفعات استخراج، دما، اندازه ذرات و زمان استخراج بود. بیشترین لیکوپن زمانی استخراج شد که نسبت حلال به مواد، تعداد استخراج‌ها، دما، اندازه ذرات و زمان استخراج به ترتیب 1:30، 4، 50 درجه، 0/15 میلی متر و 8 دقیقه بود (51).

رنگ قرمز گوجه‌فرنگی به دلیل حضور لیکوپن است. لیکوپن یک کاروتنوئید غیر اشباع زنجیره باز شامل 13 پیوند دوگانه است که در گوجه‌فرنگی و مشتقات آن به میزان زیادی وجود دارد. فعالیت بیولوژیکی لیکوپن شامل فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش‌دهنده خطر ابتلا به سرطان می‌باشد. در پایان فرآیند تولید رب گوجه‌فرنگی علاوه بر محصول، تفاله ای باقی می‌ماند که حاوی مقادیر زیادی پوست گوجه‌فرنگی است. بازبازی لیکوپن از ضایعات می‌تواند نقش اساسی در صنعت غذا و دارو ایفا کند (51). در یک پژوهش ضایعات صنعتی از کارخانه رب گوجه‌فرنگی طیعه شهریار تهیه و در دمای 4 درجه سانتیگراد و به مدت 15 روز نگهداری شد. ضایعات در سه زمان (6، 4، 2 ساعت) و سه دما (دمای یخچال، محیط و جوش) توسط سه حلال غیرقطبی پترولیوم اتر، ان‌هگزان و مخلوط حلال‌ها (ان‌هگزان/اتانول/استن) با نسبت 1:1:2 بررسی شد. حداکثر میزان رنگ در شرایط مخلوط حلال‌ها در دمای جوش و زمان 6 ساعت به دست آمد. بهترین نسبت ضایعات و حجم حلال طی یک آزمایش بررسی گردید و راندمان رنگ استخراج شده و راندمان خلوص لیکوپن محاسبه شد. شناسایی لیکوپن استخراج شده در این تحقیق توسط کروماتوگرافی لایه نازک صورت گرفت و مشخص شد بیشترین مقدار رنگ‌زا در گوجه فرنگی مربوط به لیکوپن می‌باشد (14).



لوحاچومپال، سرزدنیتسکی و کرسک در سال (2004) اقدام به استخراج آنتوسیانین از بلوبری نمودند. برای این منظور 20 گرم بلوبری تازه، منجمد و خشک را در یک دستگاه مخلوط کن صنعتی به مدت یک دقیقه و با 150 میلی لیتر مخلوط متانول، اسید استیک و آب مقطر به نسبت 25:1:24 مخلوط کردند. بلوبری‌های منجمد به مدت یک شب پیش از آزمایش در دمای 5 درجه سانتیگراد داخل فریزر یخ زدایی می‌شوند. نیمی از محلول مخلوط شده در مخلوط‌کن را با دور 12000 دور در دقیقه، زمان 20 دقیقه و دمای 20 درجه سانتیگراد در ساتریفوژ قرار دادند. پس از جدا کردن فاز مایع ساتریفوژ، به فاز جامد باقیمانده 75 میلی لیتر از مخلوط متانول، اسید استیک و آب مقطر اضافه کرده و دوباره ساتریفوژ نموده و فاز مایع را جدا نمودند. برای هر نمونه سه مرتبه استخراج انجام شد. مایع شفاف به دست آمده از سه مرحله استخراج را تحت خلأ در دمای 35 درجه سانتیگراد تغلیظ کردند. باقیمانده تغلیظ را دوباره در 5 میلی لیتر اسید فرمیک 3 درصد در آب حل کرده و این محلول بر روی کارتریج C18 Sep-Pak جذب شد. کارتریج با 5 میلی لیتر اسید فرمیک 3 درصد در آب و 3/5 میلی لیتر اسید فرمیک 3 درصد در متانول شسته شد. آنتوسیانین‌های شسته شده از کارتریج، تحت خلأ در دمای 35 درجه سانتیگراد تغلیظ شده تا خشک شوند (58).

روی، گولاپالی، چادهاری و چاکرابورتی در سال (2004) موفق به استخراج بتالائین از چغندر قرمز شدند. برای این منظور چغندر قرمز را شسته، پوست‌گیری کرده، وزن کرده و قطعه قطعه نمودند. سپس در دمای 100 درجه سانتیگراد و به مدت 10 دقیقه آن را آنزیم‌بری کرده و آن را در مخلوط‌کن با سرعت متوسط (8000 دور در دقیقه) و به مدت 2 دقیقه با آب مخلوط نمودند. استخراج رنگ در مخلوط کن انجام پذیرفت و پارامترهای موثر بر استخراج عبارتند از: سرعت پیش برنده، دما و زمان استخراج. در هنگام استخراج رنگ چغندر سرعت هم زدن به طور ثابت 900-1000 دور در دقیقه و زمان استخراج حدوداً یک ساعت بود. دمای مخلوط‌کن نیز بین



60-30 درجه سانتیگراد نگه داشته می‌شود. اگر دما از 60 درجه سانتیگراد تجاوز کند رنگ قرمز چغندر ثابت باقی نخواهد ماند به همین خاطر دمای استخراج رنگ چغندر زیر 60 درجه سانتیگراد در نظر گرفته می‌شود. سپس رنگ به دست آمده را به کمک اولترافیلتراسیون صاف کردند. و پس از آن رنگ خالص به دست آمده را تا بریکس 35-30 درجه در خشک‌کن انجمادی در دمای 40- درجه سانتیگراد و فشار 60 تور تغلیظ نمودند (50).

با توجه به مضرات استفاده از رنگدانه های سنتزی در مواد غذایی، نیاز بیشتری به بررسی مصرف تکنولوژیکی رنگدانه‌های طبیعی در مواد غذایی احساس می‌شود. بتالائین‌ها، رنگدانه چغندر قرمز هستند که از ترکیبات هتروسیکلیک نیتروژن دار محسوب می‌شوند (80).

روش‌های معمول استخراج بتالائین از چغندر قرمز، پرس هیدرولیک (کمتر از 50 درصد بازدهی) و دیفوزیون (70 درصد بازدهی) می‌باشند. در تهیه چغندر قرمز باید در نظر داشت که انواع کوچکتر پیگمنت بیشتری دارند. از جمله مشکلات استفاده از چغندر قرمز به عنوان منبع بتالائین آلودگی میکروبی زیاد آن می‌باشد که به ویژه در طعم محصول نهایی موثر است و بنابراین نیاز می‌باشد تا مرحله شستشو با دقت کافی انجام شود. در قسمت بلانچینگ از دمای 70 درجه سانتیگراد به مدت 2 دقیقه استفاده می‌شود هر چند که مقداری از رنگدانه کاهش می‌یابد اما این مقدار، دما و زمان بهینه فرآیند می‌باشد. در مرحله پوست‌گیری به دلیل تجمع زیاد رنگدانه در پوست، ضایعات 30 درصد خواهد بود اما حذف قسمت اعظم آنزیم‌های نامطلوب و کاهش بار میکروبی از مزایای آن است. شرایط بهینه در مرحله استخراج دمای 85 درجه سانتیگراد و رساندن تدریجی pH از 5/2 به 4/8 است. در صورتی که آب به عنوان حلال و نسبت حلال به چغندر قرمز 5 به 1 باشد، درصد استخراج 70 درصد خواهد بود. در مرحله تغلیظ بریکس عصاره به 65 می‌رسد. جهت تهیه پودر از عصاره حاصله، از تغلیظ در خلأ و یا خشک‌کن پاششی استفاده می‌شود که در این



روش، از شربت گلوکز با  $DE=29$  و یا مالتودکسترین به عنوان پرکننده و دمای 160 درجه سانتیگراد استفاده می‌شود (12 و 23).

## 2-1-1- استخراج کورکومین به کمک حلال

ماسون و همکارانش در سال (1996) بیان کردند استخراج با حلال مرحله کلیدی در استخراج و خالص‌سازی ترکیبات فعال بیولوژیکی از مواد خام گیاهی می‌باشد. استخراج مواد بیولوژیکی از منابع طبیعی نیازمند انتخاب یک حلال مناسب به همراه استفاده از هم‌زدن و حرارت‌دادن برای افزایش حلالیت مواد و انتقال جرم می‌باشد (65).

روش مادسن و همکاران در سال (2003)، برای دست یافتن به بیشترین مقدار بازده استخراج کورکومینوئیدها از زردچوبه شامل مراحل زیر بود:

الف- تهیه ریزوم زردچوبه، بریدن، خشک کردن و پودر کردن آن

ب- قرار دادن ریزوم‌ها در حلال آلی مانند هگزان برای جدا کردن اولین رسوب که همان فاز حاوی کورکومینوئید است.

ج- کریستاله کردن کورکومینوئید به دست آمده

د- پس از کریستاله کردن کورکومینوئیدها دو فاز به دست می‌آید: 1- کریستال‌های کورکومینوئید که اولین عامل رنگی به دست آمده از این استخراج بوده و حاوی کورکومین، دمتوکسی کورکومین و بیس دمتوکسی کورکومین می‌باشند. و 2 رسوب به دست آمده که حاوی کورکومینوئیدهای کریستال نشده است.

ه- در این مرحله دومین رسوب به دست آمده را در حلال آلی مانند استن قرار داده تا دومین عامل رنگی کورکومینوئید که مخلوطی از دمتوکسی کورکومین و بیس دمتوکسی کورکومین می‌باشد به دست آید (61).



ورجس در سال (1993) در پژوهش خود بیان کرد ریزوم گیاه زرد چوبه معمولاً حاوی 2/5 تا 8 درصد کورکومینوئید (در بهینه ترین حالت 12-14 درصد) می‌باشد. سایر اجزاء ریزوم که رنگدانه باید از آن جدا شوند شامل: روغن های ثابت و ضروری، نشاسته، پروتئین، فیبر و مواد تلخی است که نشاسته جزء اصلی آن می‌باشد (94).

در سال (2003) مادسن و همکاران به بهبود فرآیند استخراج کورکومین از زردچوبه پرداختند. در این مطالعه فرآیند جدیدی برای بهبود راندمان استخراج با انجام حداقل دو مرحله جداسازی از مواد حاوی کورکومینوئید بررسی شد. با انجام فرآیند کریستالیزاسیون درصد خلوص هر یک از اجزاء نیز مشخص گردید. این فرآیند بازده استخراج را 30 تا 40 درصد بهبود بخشید (61).

استرانسکی در سال (1979) عوامل رنگی محلول در آب و محلول در چربی کورکومین را از ریشه زرد چوبه با شستشوی ریشه آن با محلول صابونی که کورکومین را حل می‌کند، تولید کرد. در مرحله بعد محلول با اسید واکنش داده تا کورکومین رسوب نماید و خمیر یا پودر حاصل شود (91).

مجید و همکاران در سال (1999)، دریافتند که یک روش برای خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و برای جلوگیری از تشکیل رادیکال های آزاد در بیمار، استفاده از ترکیب کورکومین، دمتوکسی کورکومین و بیس‌دمتوکسی کورکومین می‌باشد. مراحل استخراج کورکومینوئیدها عبارتست از:

الف- خشک کردن و پودر کردن ریزوم زردچوبه برای به دست آوردن پودر مورد نظر

ب- استخراج پودر مورد نظر با یک حلال در دمای 30-60 درجه سانتیگراد برای به دست آوردن عصاره

ج- تغلیظ عصاره تحت خلأ

د- کاهش دمای عصاره تغلیظ شده تا دمای 0-15 درجه سانتیگراد تا تمامی کورکومینوئیدهای موجود تبدیل به کریستال شوند



- ه- جداسازی کریستال‌های به دست آمده
- و- حل کردن کریستال‌های کورکومینوئید جدا شده در حلال کتون‌ی مانند استن و متیل کتون در دمای 30-50 درجه سانتیگراد
- ز- کاهش دمای کریستال‌های کورکومینوئید حل شده تا دمای 0-15 درجه سانتیگراد
- ح- جداسازی تمام کورکومینوئیدهای موجود.
- یک روش برای مخلوط کردن کورکومینوئیدها با فلزات شامل مراحل زیر می‌باشد:
- الف- حل کردن حداقل یکی از کورکومینوئیدها در مخلوطی از متانول و استن
- ب- حرارت دادن مخلوط مذکور تا دمای 40-50 درجه سانتیگراد به مدت 1-2 ساعت
- ج- تهیه یک محلول فلزی با حل کردن کلرید کلسیم در متانول
- د- مخلوط کردن محلول فلزی و محلول کورکومینوئید با یکدیگر
- ه- تنظیم pH مخلوط بین 7/5-9/5 با استفاده از محلول آمونیاک، به طوری که کمپلکس فلزی رسوب کند.
- و- جداسازی کمپلکس فلزی و شستشوی آن با آب و متانول
- ز- خشک کردن کمپلکس فلزی در دمای بین 70-80 درجه سانتیگراد (63)
- ورجس در سال (1993) بیان کرد به منظور استخراج کورکومین می‌توان از تشکیل نمک این ترکیب استفاده نمود. کورکومینوئیدها حاوی گروه‌های اسیدی ( $pK_a$ , 7.8, 8.5, 9.0) می‌باشند که از دی‌کتون‌ها و دو گروه فنلی ملحق شده است. لذا با عمل قلیا و سپس رسوب در pH 3-4 می‌توان استخراج را انجام داد. از محدودیت‌های این روش می‌توان به حساسیت بالای ترکیب رنگی به قلیا، تقطیر با بخار به منظور حذف روغن‌های فرار و طولانی بودن و هزینه‌بر بودن روش اشاره کرد (94).

آهن و اوبندورف در سال (2006)، رنگ استخراج شده از زردچوبه را با کمک GC-MS آنالیز کردند. آنها در ابتدا ریزوم زردچوبه را شسته و پودر کردند و سپس پودر حاصل را برای استخراج اولیه در مجاورت استن قرار دادند و از دو نوع شیکر صفحه‌ای و حمام آب استفاده نمودند و پس از گذشت یک ساعت با استفاده از 200 میلی‌لیتر متانول استخراج ثانویه را انجام دادند و برای شیکر صفحه‌ای زمان 12 ساعت و برای شیکر حمام آب زمان 6 ساعت را در نظر گرفتند. PH مطلوب برای استخراج نیز 5 تا 6 بود. سپس رنگ استخراج شده با استفاده از روش GC-MS آنالیز شده و نتایج به دست آمده را با آنالیزهای حاصل از دو روش HPLC و TLC مقایسه گردید (15).

خانم‌ها روحانی، حاجی‌قاسمی و سلیمی در سال 1385 رنگدانه‌های موجود در ریشه گیاه زردچوبه را استخراج و آنالیز نمودند. آنها ابتدا پودر ریزوم زردچوبه را به مدت 24 ساعت در 10 میلی‌لیتر حلال هگزان نرمال خیسانده و پس از فیلتراسیون با 5 میلی‌لیتر حلال هگزان، چهار بار و هر بار به مدت 15 دقیقه استخراج را ادامه دادند و سپس عملیات فیلتراسیون را انجام دادند و سپس توده باقیمانده را با 5 میلی‌لیتر تولوئن، چهار بار و هر بار به مدت 15 دقیقه استخراج کردند و در نهایت نیز از متانول برای استخراج نهایی استفاده کردند و رنگدانه کورکومین و ایزومرهای آن در فاز متانولی استخراج شدند. سپس محلول‌های به دست آمده در مرحله آخر را تغلیظ و جهت آنالیز آماده سازی شدند. آنها محلول‌ها را به کمک دو روش TLC و HPLC آنالیز کردند (8).

در سال (2001) گیکر و همکارانش فرآیند استخراج کورکومین از زردچوبه که شامل مراحل تماس ریزوم زردچوبه با یک محلول هیدروتروپ آبی در دامنه دمایی 0-100 درجه سانتیگراد بود، بررسی کردند. جهت استخراج کورکومینوئید، جداسازی محلول بدست آمده از باقیمانده مواد جامد و بازیابی آن از محلول بوسیله روش‌های شناخته شده انجام گرفت. محلول‌های هیدروتروپ بکار



رفته نمک های سدیم بوتیل مونو گلیکول سولفات، کومن سولفات، سالیسیلات و پارا تولوئن اسید سولفونات بودند. نتایج تحقیق نشان داد که برای محلول‌های ذکر شده درصد استخراج به ترتیب، 51/5، 38/56، 50/79 و 13/79 و درصد خلوص کورکومین بدست آمده نیز به ترتیب 97، 90/7، 89/2 و 79/3 بود (38).

ساستری در سال (1970)، به منظور استخراج کورکومینوئید زردچوبه از استن و اتر نفتی استفاده نمود. اتانول، اتیل استات و بنزن از حلال‌های دیگری هستند که برای استخراج کورکومینوئید استفاده می‌شوند. استخراج کورکومینوئیدها با این حلال‌های آلی انتخابی نیست در نتیجه طی استخراج خلوص کورکومینوئیدها را کاهش می‌دهند که این موضوع فرآیندهای بعد از استخراج را مشکل می‌سازد.

در سال (2002) آمارگو و همکارانش فرایند تولید عصاره های قطبی و غیر قطبی کورکومین را مورد بررسی قرار دادند. آنها فرآیندی را برای بدست آوردن عصاره غیرقطبی شامل: (1) استخراج ریزومها با حلال آلی، (2) فیلتراسیون و تبخیر تا خشک کردن عصاره، (3) انحلال اولئورزین بدست آمده در شرایط داغ، ترسیب تا هنگامی که سرد شده و سپس فیلتراسیون آن، (4) خشک کردن و کریستالیزاسیون مجدد مواد جامد به منظور تولید محصولی با درجه خلوص بالاتر انجام دادند. بدست آوردن عصاره قطبی شامل: (1) استخراج ریزومها با آب در دمای 50-70 و (2) فیلتراسیون و تبخیر آب بود. کاربردهای این ترکیبات به خصوص به عنوان به دام اندازنده رادیکال‌های آزاد و عوامل ضد کلوخته‌ای شدن نیز مورد بررسی قرار گرفت (76 و 78).

در سال (1981) مینگ و همکارانش فرایند ساخت کمپلکس‌های اسیدی را با واکنش کورکومین با یون‌های فلزی بررسی کرده و کمپلکس‌های رنگی کورکومین-فلز محلول در آب را تولید کرد که توانایی تولید رنگ در سیستم‌های مختلف غذایی را دارد (62).





ورجس در سال (1993) ترتیب حلالیت کورکومین در حلال‌های مختلف را مورد بررسی قرار داد. او بیان کرد حلالیت هگزان >بنزن >تر > ایزوپروپانول >دی‌کلرو اتان > اتانول > متانول > اتیل استات > اتیل متیل کتون > استن می‌باشد. اما در میان حلال‌های فوق، اتر و بنزن از نظر تجاری مناسب نیستند، اتر بسیار اشتعال‌زا و بنزن سرطان‌زا می‌باشد. استن به دلیل رقیق‌سازی فرآیند مناسب نبوده و متانول، اتانول و ایزوپروپانول نیز مشابه استن مناسب نیست. از سویی کورکومین در دی‌کلرواتان و اتانول محلول بوده، اما این حلال‌ها با آب غیر قابل امتزاج می‌باشند و اجزاء محلول در آب را نمی‌توان استخراج کرد. بنابراین حلال هگزان مناسب‌ترین و ارزشمندترین حلال می‌باشد (94).

ران و همکارانش در سال (1998)، کورکومینوئیدها را با استفاده از آب قلیایی ( $\text{pH} \sim 9$ ) از Curcuma استخراج کردند. کورکومینوئیدها در  $\text{pH} = 3-4$  رسوب کرده و بازیابی می‌شوند محصول حاصل شامل 82/5 درصد کورکومینوئید بود. شایان ذکر است که کورکومینوئیدها در شرایط قلیایی ناپایدار بوده و سرعت تخریب آنها در  $\text{pH} 7/45$  تا  $10/2$  به سرعت افزایش می‌یابد.

دمیگی و هیساشیگ در سال (1992)، از دی‌اکسید کربن فوق بحرانی با هدف استخراج کورکومین استفاده نمودند. در واقع دی‌اکسید کربن فوق بحرانی برای استخراج روغن‌های ضروری استفاده می‌شود و سپس کورکومینوئیدها با استفاده از مخلوط اتانول و آب از Curcuma longa استخراج می‌شوند. این روش از نظر اقتصادی قابل توجیه نبود و کورکومینوئیدها پس از استخراج به کمپلکس محلول در آب سیکلودکسترین کورکومین تبدیل می‌شوند.

مندز و همکاران در سال (2000)، اقدام به استخراج کورکومین و روغن‌های ضروری از ریزوم زردچوبه به کمک دی‌اکسید کربن فوق بحرانی نمودند. آنها با دو روش دی‌اکسید کربن فوق بحرانی و دی‌اکسید کربن فوق بحرانی بعلاوه اتانول بر روی ریزوم زردچوبه استخراج انجام دادند.

استخراج در 25 و 30 مگاپاسکال و دمای 313 و 318 کلوین انجام شد. اثر دمای خشک کردن ماده اولیه بر روی بازده استخراج و کورکومینوئیدها بررسی شد. بیشترین مقدار کورکومینوئیدها در شرایطی استخراج شدند که از ریزوم‌های خشک شده در دمای 343 کلوین و دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی و اتانول برای استخراج استفاده شده بود. شناسایی کورکومینوئیدها هم در عصاره استخراج شده و هم در رسوب جامد باقیمانده با کمک روش اسپکتروفتومتری و HPLC انجام شد و همچنین ترکیب روغن‌های ضروری نیز با گاز کروماتوگرافی تعیین شد (27 و 83).

در سال (1981) لشیک تغییرات رنگی کورکومین را در مخلوط‌های غذایی در مقادیر مختلف pH های اسیدی و قلیایی بررسی کرد. نتایج حاصله نشان داد که کورکومین در دامنه pH 3/5 تا حدود 4/5 بدون تغییر می‌ماند و به منظور جلوگیری از تغییرات رنگ آن در دامنه pH های قلیایی پودر خشک شده کورکومین به روش خشک‌کن پاششی همراه با یک اسید آلی، بافر و یک ماده کپسوله‌کننده در پودینگ غذایی مورد بررسی قرار داد. استفاده از اسید سیتریک و محلول بافری آن نتایج خوبی را نشان داده است (55).

در سال (1983) اسپرانز کمپلکس محلول در آب کورکومین را جهت استفاده مناسب به عنوان عامل رنگی در مواد غذایی با انحلال و مخلوط کردن منبعی از کورکومین و ژلاتین در محلول آبی اسید استیک تولید کرد. کمپلکس از نظر وزنی حاوی 15 درصد کورکومین بود و می‌تواند با دامنه وسیعی از مواد غذایی به شکل مایع یا خشک بکار برده شود (82).

گولدزچر در سال (1979) کاهش یا حذف پایه طعم تلخ نامطلوب از غده‌های کورکومین یا مشتقات آن را مانند عصاره حلال، یا عصاره حلال تلخی‌زدایی شده را با افزودن گلیسین بررسی کرده است (40).

## 2-2- بررسی روش‌های آنالیز کورکومین استخراج شده و پایداری آن

برزاس در سال (1994) با استفاده از طیف‌سنجی مشتقی تعیین همزمان تارتازین، ریوفلاوین و کورکومین را انجام داد. در این پژوهش سنتز و مشخصات شیمیایی سه جزء اصلی رنگ کورکومینوئید و پتانسیل کاربرد آن و تعیین رنگ آن در مواد غذایی با استفاده از HPLC مورد بررسی قرار گرفته است (71).

محققان در سال 2005 پیگمان‌های کورکومینوئیدی را جداسازی و ویژگی‌های رنگی و فیزیکوشیمیایی آنها را تعیین نمودند. در این پژوهش جداسازی کروماتوگرافی لایه نازک پیگمان‌ها بر روی سلیکاژل 60G با استفاده از دی‌کلرومتان: متانول به نسبت 99 به 1 انجام شد. جداسازی مقدماتی پیگمان‌های کورکومینوئیدی به وسیله کریستالیزاسیون کورکومین در حلال آب-متانول انجام شد و جداسازی بیشتر با استفاده از کروماتوگرافی ستونی به وسیله سلیکاژل 60G و مشتقات هیدروژن سدیم و دی‌کلرومتان به عنوان حلال شستشو صورت گرفت.

میزان خلوص هر پیگمان کورکومینوئیدی توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و تعیین نقطه ذوب تایید گردید. سپس پیگمان‌های جدا شده در رابطه با اشعه فرابنفش، نور مرئی، NMR و مشخصات رنگی تعیین ویژگی شدند و جذب مولی هر پیگمان نیز مشخص گردید. این اطلاعات می‌تواند برای شناسایی و تعیین مقدار هر کدام از پیگمان‌های کورکومینوئیدی مورد استفاده قرار گیرد.

آهن و اوپندورف در سال (2006)، میزان خلوص هر پیگمان کورکومینوئیدی توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و تعیین نقطه ذوب تایید گردید. سپس پیگمان‌های جدا شده در رابطه با اشعه فرابنفش، نور مرئی، NMR و مشخصات رنگی تعیین ویژگی شدند و

جذب مولی هر پیگمان نیز مشخص گردید. این اطلاعات می‌تواند برای شناسایی و تعیین مقدار هر کدام از پیگمان‌های کورکومینوئیدی مورد استفاده قرار گیرد (15).

ژانگ، گوآن، یانگ، لی یو، چنگ و لی در سال (2008)، به تجزیه کمی و کیفی ریزوم چهارگونه مختلف از گیاه کورکوما با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک پرداختند. مدت زمان طولانی است که ریزوم کورکوما فوکالیس، کورکوما وانگ سینسیس، کورکوما ون یو جین و کورکوما لونگا برای تولید اژو و جیانگ هوآنگ که داروهای چینی هستند مورد استفاده قرار می‌گیرند. به دلیل خواص مورفولوژیکی مشابه آنها، تشخیص منشا مواد اولیه مورد استفاده در این داروها کار دشواریست. در این تحقیق از روش کروماتوگرافی لایه نازک که روشی ساده، سریع و مطمئن برای تجزیه کمی و کیفی چهار گونه مختلف از کورکوماست استفاده شده است. کروماتوگرافی بر روی سیلیکاژل 60F<sub>254</sub> و کلروفرم-متانول-اسید فرمیک (8/0:4:80 v/v/v) و پترولیوم اتر-اتیل استات (10:90 v/v) به عنوان فاز متحرک انجام شد. نشانگرهای TLC با محلول 1 درصد وانیلین-اسیدسولفوریک رنگ آمیزی شد. بدین وسیله چهار گونه مختلف از کورکوما به راحتی براساس خواص نشان داده شده در نمودار TLC از یکدیگر تفکیک شده و همزمان 8 ترکیب شامل بیسدمتوکسی کورکومین، دمتوکسی کورکومین، کورکومین، کورکومونول، کورکومول، کوردیون، فورانودینون و کورزرین در آنها قابل تشخیص می‌باشد. همچنین در کورکوما چگالی سنجی در  $\lambda_{\text{scan}}=518 \text{ nm}$  و  $\lambda_{\text{refrence}}=800 \text{ nm}$  انجام شد. ترکیبات مذکور در محدوده آزمایش از حالت خطی خوبی ( $r^2 > 0.9905$ ) برخوردار بودند. بنابراین از روش TLC می‌توان برای کنترل کیفیت ریزوم کورکوما استفاده نمود (107).

سوهاگیا، اسمیتا، سمپاتو، کریشنامورتی و بهاتاچاریا در سال (2004) پایداری کورکومین محلول در آب را در اسنک‌ها طی انبارمانی بررسی کردند. کورکومین رنگدانه زرد رنگ محلول در چربی موجود در زردچوبه است. کورکومین به صورت محلول در آب برای اسنک‌های تویی شکل تهیه

شده از ذرت و آرد سویای بدون چربی به کار برده می‌شود. پایداری کورکومین با تارترازین که یک رنگ مصنوعی مجاز است مقایسه شد. محصولات در کیسه‌های پروپیلن بسته‌بندی شده و ماندگاری آنها در دمای 27 درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی 65 درصد مورد مطالعه قرار گرفت. و همچنین مقدار رطوبت و رنگ و پایداری رنگدانه آنها آزمایش شد. شفافیت نمونه طی نگهداری بیش از 30 درصد کاهش می‌یابد. پس از 10 هفته نگهداری، پایداری کورکومین حدود 77 درصد بود. عمر مفید محصول 6 هفته بوده و پایداری کورکومین و تارترازین در شرایط محیط به ترتیب 83 و 93 درصد می‌باشد. پایداری هر دو رنگ از سینتیک مرحله اول پیروی می‌کند ( $0.86 \leq r \leq 0.98, p \leq 0.01$ ) در حالی که سرعت تخریب کورکومین از تارترازین بیشتر است. کورکومین ممکن است جایگزین مناسبی برای تارترازین برای استفاده از آن بر روی محصولات اکستروود شده باشد (88).

## 3-2- پژوهش‌های انجام شده در زمینه استخراج ترکیبات آلی توسط امواج

### فراصوت

#### 2-3-1- استخراج روغن‌ها و عصاره گیاهی

کاربرد امواج فراصوت در صنایع گیاهان دارویی به دلیل کمک به استخراج بیشتر و آسانتر عصاره بسیاری از گیاهان توسط محققان به ثبت رسیده است. مقایسات انجام گرفته در استخراج ترکیبات بیواکتیو از گیاهان نشان دهنده بهبود شاخص استخراج توسط به کارگیری امواج فراصوت در مقابل روش‌های سنتی استخراج با آب و یا اتانول می‌باشد. در یک مطالعه<sup>1</sup> استخراج آبی تری‌ترین‌ساپونین<sup>2</sup> از میوه گیاه Gardenia مورد بررسی قرار گرفته و دیده شده است که در

<sup>1</sup> Jian-Bing et al, 2006

<sup>2</sup> Geniposide

زمانی که امواج فراصوت به میزان  $0/15 \text{ W/cm}^2$  به کار گرفته شود بازده استخراج به میزان  $16/5\%$  نسبت به استفاده از 40 میلی لیتر حلال به ازاء گرم وزن میوه افزایش یافته است (95)

در سال های اخیر محققان<sup>1</sup> اثر حلال های متفاوت و امواج فراصوت را بر استخراج اسید کارنوزیک از گیاه رزماری مورد بررسی قرار دادند، نتایج نشان می دهد که استفاده از استخراج به کمک اتانول همراه با هم زدن مداوم تاثیر بسیار کمتری نسبت به استفاده از اتیل اتات و بوتانول داشته اما در هنگام به کارگیری امواج فراصوت به همراه حلال اتانول بازده استخراج به نحو چشمگیری افزایش یافته به طوریکه قابل مقایسه با استفاده از بوتانول و اتیل استات شده است. علاوه بر آن امواج فراصوت منجر به کاهش اثر ویژه و منحصر به فرد یک حلال شده و در نتیجه امکان استفاده از حلال های جایگزین مناسب را که دارای اثرات اقتصادی، سلامتی و محیطی بهتری می باشند فراهم میکند (95).

تری ترین ساپونین به عنوان ماده اصلی تشکیل دهنده ریشه عشقه<sup>2</sup> که دارای اثرات مفید بسیاری در طب سنتی و غذاهای سلامتی زا بوده، شناخته شده است. استخراج ساپونین عشقه به کمک امواج فراصوت تقریبا سه برابر سریعتر از روش استخراج سنتی شامل برگرداندن حلال جوشان به درون دستگاه استخراج سوکسله می باشد، علاوه بر آن استخراج به کمک امواج فراصوت در دماهای پایین تر امکان پذیر بوده که برای استخراج ترکیباتی که در دماهای بالا ناپایدار می باشند بسیار سودمند است (95).

نتایج مشابه نیز در استخراج کاروون و لیمونن از دانه زیره که منجر به افزایش بازده استخراج تا دو برابر شده، بدست آمد (95).

<sup>1</sup> Albu, Joyce and Mason, 2004

<sup>2</sup> Ginseng

استفاده از امواج فراصوت جهت استخراج روغن های گیاهی امکانپذیر بوده و اثرات مشخصی در کاهش زمان استخراج و افزایش کارایی آن دارد. این اثرات در استخراج روغن دانه سویا، لیمون و کاروون از دانه زیره دیده شده است. در واقع کاویتاسیون های ایجاد شده در اثر امواج فراصوت باعث افزایش نفوذپذیری بافت های گیاهی می شود، شکاف های میکروسکوپی و تخریب دیواره سلولی در فلس های سویا و دیواره دانه زیره جایگاه بیشتری برای تاثیر امواج فراصوت همچون آسانتر کردن رهایش مواد درونی در مقایسه با روش های سنتی استخراج با حلال را فراهم می کند که این تاثیرات از طریق میکروسکوپ الکترونی قابل ردیابی و مشاهده می باشند (73).

### 2-3-2- استخراج پروتئین

در یک آزمایش تحقیقاتی، استخراج پروتئین سویا به کمک امواج فراصوت در سیستم های بسته و پیوسته انجام گرفت و مشاهده شد که به کارگیری سیستم پیوسته به همراه امواج فراصوت منجر به افزایش 54 درصدی و به کارگیری امواج فراصوت به همراه سیستم بسته منجر به افزایش 23 درصدی نسبت به استخراج آبی و قلیایی شده و همچنین در طول این آزمایش مشاهده می شود که به کارگیری امواج فراصوت و سیستم پیوسته برای استخراج مقادیر مشابه پروتئین نسبت به کارگیری سیستم پیوسته، 70٪ انرژی کمتری مصرف می کند، همچنین تاثیر سونیکاسیون با افزایش غلظت مایع ورودی تا نسبت 10:1 فلس به حلال افزایش قابل توجهی می کند (75).

### 2-3-3- پلی فنول ها

ترکیبات پلی فنولی دارای اثراتی همچون کاهش خطر ابتلاء به بیماری های قلبی - عروقی از طریق جلوگیری از اکسیداسیون لیپوپروتئین ها با وزن مولکولی کم، اثرات ضد سرطانی، اثرات

ضد جهش زایی و اثرات ضد التهابی می باشند. ترکیبات فنولی شامل تانن ها و رنگدانه ها، آنتوسیانین ها در دانه انگور به خصوص انگور قرمز با غلظت های بالایی وجود دارد. در یک بررسی استخراج ترکیبات بیواکتیو (پلی فنل و کارتنوئید ها) در محیط های مایع و حلال با و بدون کمک امواج فراصوت انجام گرفته و مشاهده شد که به کارگیری استخراج به کمک امواج فراصوت منجر به افزایش بازده استخراج در دامنه 35-6 درصد می شود (59).

در جدول 1- 16 مثالهایی از ترکیبات استخراج شده به کمک امواج فراصوت نشان داده شده است.

جدول 2- 1- مثال هایی از ترکیبات استخراج شده به کمک امواج فراصوت

عصاره استخراجی	محصول مورد استفاده	حلال	فرآیند	شرایط فرآیند	دامنه بهبود (%)
بتاکاروتن	هویج	مایع اتیل استات	KHz.20-7 Ws ml 24 KHz.20-75 Ws ml 24	کنترل شده (محدود)	25 - 12 20 - 8
پلی فنل	تفاله انگور قرمز	مایع	KHz.20-75 Ws ml 24	محدود	35 - 11
پلی فنل	چای سیاه	مایع	KHz.8-10 Ws ml 24	90 °C	18 - 6
پلی فنل	سیب	مایع	KHz.20-75 Ws ml 40	80°C	6
مواد بیواکتیو	زنجبیل	دی اکسید کربن فوق بحرانی	20 KHz	فشار 160 بار	30



### 2-3-4- آنتوسیانین‌ها

آنتوسیانین‌ها گروه بزرگی از رنگدانه‌های محلول در آب با پایه 2 فنیل بنزوفلاوویوم که شامل بیش از 200 ترکیب مختلف هستند می‌باشند.<sup>1</sup>

آنتوسیانین‌ها رنگدانه‌های اصلی در میوه‌های وحشی و توت‌ها بوده و عموماً در شیره انگور نیز یافت می‌شوند.<sup>2</sup> رنگدانه‌های موجود در پوست انگور شامل دیگلوکوزیداز، مونوگلوکوزیداز مونو و دی گلوکوزیداز استیل‌ه شده می‌باشند، مقادیر آنتوسیانین در انگور در محدوده 30-75 میلی‌گرم در 100 گرم می‌باشند (73).

مشاهدات نشان می‌دهد که استخراج به کمک امواج فراصوت در نمونه‌های انگور منجر به افزایش 15-18 درصدی در رنگ آب میوه شده است.

اخیراً محققان کیفیت آب میوه حاصله از فرآوری توسط روش‌های غیر حرارتی همچون امواج فراصوت را مورد بررسی قرار داده و مشاهده کردند که این روش‌ها می‌تواند جایگزین مناسب و کارآمدتری با اثرات ملایم‌تر در مقایسه با سایر روش‌های شکستن دانه باشد. آنالیز کیفیت (به عنوان مثال درصد قند، آنتوسیانین و مواد معدنی، اسیدیته و رنگ) در نمونه‌هایی که تحت تیمار با امواج فراصوت بوده‌اند، نشان می‌دهد که این نمونه‌ها دارای کیفیت بسیار بهتری نسبت به نمونه‌های تیمار نشده بوده و کیفیت آنها قابل مقایسه با نمونه‌هایی می‌باشد که تیمار غیر فعال کردن آنزیمی را طی کرده‌اند (73).

### 2-3-5- اسید تارتاریک

<sup>1</sup> IPCS, 2001

<sup>2</sup> Springett, 2001

اسید تارتاریک به طور طبیعی در میوه‌ها و با غلظت‌های بالاتری در انگور دیده می‌شود. تقریباً 90% کل اسیدهای ارگانیک در دانه انگور، اسید تارتاریک و اسید مالیک بوده، اسید تارتاریک کاربرد گسترده‌ای در صنایع نانوایی، دارویی و شیمیایی داشته است (73).

### 2-3-6- ترکیبات معطر

در طول زمان نشان داده شده است که امواج فراصوت می‌تواند اثرات بسیار موثری جهت استخراج ترکیبات شیمیایی مولد عطر داشته باشد. بعضی از ترکیبات معطر مانند روتین که از جوانه‌های گل یک درخت چینی بدست می‌آید دارای استخراج بسیار بهتر و موثرتری در حلال‌های آلی متفاوت در مقایسه با سیستم‌های مایع می‌باشد که این مسئله به دلیل تشکیل رادیکال هیدروکسیل و هیدروژن پراکسید در محیط مایع و در نتیجه تجزیه روتین می‌باشد، به کارگیری امواج فراصوت به همراه حلال متانول به دلیل حلالیت بالای روتین در متانول و عدم تشکیل هیدروژن پراکسید توسط امواج فراصوت در متانول در استخراج این ماده موثر می‌باشد (73 و 95).

### 2-3-7- پلی‌ساکاریدها و ترکیبات کارکردی

استخراج کربوهیدرات‌ها، پلی‌ساکاریدها و سایر ترکیبات کاربردی در سال‌های اخیر بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است. راه‌های متفاوت استخراج با و بدون بکارگیری امواج فراصوت جهت بررسی اثر سونیکاسیون بر قابلیت خروج ترکیبات سلولوز از نیشکر و گزیلوگلوکان از تفاله سیب<sup>1</sup> به کار گرفته شد (56). نتایج نشان می‌دهد که به کارگیری امواج فراصوت نه تنها موجب بهبود پروسه استخراج بلکه منجر به بروز خواص ساختمانی و عملکردی ویژه‌ای در محصول می‌گردد. در استخراج همی سلولوز از نیشکر فراصوت موجب افزایش خروج همی سلولوز از طریق تخریب دیواره سلول‌ها و شکسته شدن اتصالات بین همی سلولوز و لیگنین

<sup>1</sup> Cailliet et al, 2006

می‌گردد. در حالیکه استخراج آبی پلی ساکاریدها به کمک امواج فراصوت از قارچ‌های خوراکی مانند (*Pleurotus tuberrgium*) منجر به تشکیل کمپلکس گلیکان-کیتین با وزن مولکولی بالاتر نسبت به ترکیبات مشابه حاصله از استخراج با آب داغ می‌شود؛ که این مسئله می‌تواند به دلیل اصلاح سونو شیمیایی دو پلی ساکارید باشد، همچنین بهبود اثرات ایمونولوژیکی این ترکیبات مانند فعالیت ضد توموری در آزمایشات بر روی حیوانات نیز گزارش شده است (87).

به کارگیری امواج فراصوت امکان استخراج در دماهای پایین تر را فراهم می‌کند در آزمایشی در سال 2000 استخراج فلاوونوئیدها از برگ‌های بامبو به کمک آب داغ و امواج فراصوت مورد بررسی قرار گرفت؛ نتایج نشان می‌دهد که شرایط بهینه برای استخراج به کمک امواج فراصوت در دماهای بسیار پایینتری نسبت به استفاده از حمام آب داغ در دمای 80 درجه سانتی‌گراد رخ می‌دهد (95).

### 2-3-8- استخراج ترکیبات فعال زیستی از منابع حیوانی

مطالعات محدودی در مورد اثر به کارگیری امواج فراصوت در استخراج از منابع حیوانی انجام گرفته است، در آزمایشاتی استخراج لوتئین از زرده تخم مرغ انجام گرفته است، در مورد استخراج کیتین مشاهده شد که بازده استخراج کیتین در طول فرآیند کاهش پیدا کرد که این کاهش به دلیل دپلمریزاسیون عصاره استخراجی در آب مورد استفاده جهت شستشو می‌باشد، علاوه بر آن درجه استیله شدن کیتین تحت سونیکاسیون قرار نگرفته اما درجه استیله شدن کیتوزان تولید شده از کیتین سونیکاته شده کاهش می‌یابد (65).



زرده تخم مرغ یکی از منابع اصلی لوتئین در غذاها می باشد و گزارش شده است که مصرف زرده تخم مرغ اثر مستقیمی بر روی افزایش لوتئین پلاسما دارد. اخیراً بازده بالاتری از استخراج لوتئین را در هنگامی که امواج فراصوت در ترکیب با ساپونیفیکاسیون حلال های آلی به کار می رود گزارش کرده اند، علاوه بر آن کاربرد امواج فراصوت تاثیر بسیار بهتری در استخراج لوتئین از نمونه های ماتریکس داشته که می تواند به دلیل جلوگیری از واکنش های تجزیه ای باشد (65)

Archive of SID

**فصل سوم**  
**روش اجرای تحقیق**

### 3-1- مواد شیمیایی

ریزوم زردچوبه از شهرستان بجنورد، استان خراسان شمالی، خریداری شد. مواد شیمیایی مورد استفاده شامل پترولیوم اتر، استن و اتانول از شرکت مرک<sup>1</sup> آلمان تهیه شدند. همچنین پلی وینیل پیرولیدون<sup>2</sup> از شرکت سیگما<sup>3</sup> تهیه گردید.

### 3-2- روش‌ها

#### 3-2-1- آماده‌سازی ماده جامد

ریزوم زردچوبه در خرداد 1389 به میزان لازم از شهرستان بجنورد تهیه گردید. نمونه‌ها به کمک آسیاب چکشی صنعتی خرد می‌شوند. برای این که نمونه‌های مورد آزمایش دارای اندازه یکنواخت و یکسانی باشند پس از آسیاب کردن، پودر حاصل را از الک با مش 30 عبور می‌دهیم؛ سپس عملیات استخراج را مطابق روش‌های توضیح داده شده در بندهای بعد بر روی آن‌ها انجام می‌دهیم (8).

#### 3-2-2- جداسازی روغن‌های از زردچوبه

جهت روغن‌گیری از زردچوبه، ابتدا مقدار مشخصی از زردچوبه را درون کاغذ صافی در محفظه دستگاه سوکسله قرار می‌دهیم و مقداری حلال پترولیوم اتر تقطیر شده را درون بالن دستگاه می‌ریزیم (شکل 3-1). بالن محتوی حلال را بر روی همزن مغناطیسی و حرارتی با دور 500 دور در دقیقه و دمای 150 درجه سانتیگراد به مدت 24 ساعت قرار می‌دهیم. با این روش تمام پودر زردچوبه مورد نیاز را روغن‌گیری می‌کنیم (38).

<sup>1</sup> Merck

<sup>2</sup> Polyvinylpyrrolidone- PVP

<sup>3</sup> SIGMA



شکل 3-1- دستگاه سوکسله مورد استفاده برای روغن گیری

### 3-2-3- نحوه استخراج کور کومین

جهت استخراج کور کومین، ابتدا مقدار مشخصی از پودر روغن‌گیری شده زردچوبه را با توجه به جدول (3-1) با مقادیر مشخصی از استن، اتانول و یا مخلوط استن-اتانول مخلوط نموده و توسط شیکر مدل Gerhardt (شکل 3-2) با دور 120 دور در دقیقه به مدت مشخص مطابق با جدول ذکر شده هم زده می‌شوند (94).

مخلوط تیمار شده را توسط کاغذ صافی واتمن<sup>3</sup> صاف نموده و از محلول حاصله از صافی جهت عملیات بعدی استفاده می‌نماییم.

<sup>3</sup> Waltman



شکل 3-2- دستگاه شیکر مورد استفاده

### 3-2-4- تعیین مقدار کورکومین استخراج شده

جهت تعیین مقدار کورکومین استخراج شده، از دستگاه اسپکتروفتومتری مدل BC47358، شرکت Biochrom، ساخت انگلستان (شکل 3-4) استفاده می‌نماییم. برای این منظور کورکومین از زردچوبه با حلال استن و با استفاده از روش مذکور استخراج شد. به این منظور 0/2 میلی لیتر از محلول کورکومین را در بالن ژوژه 50 با استن به حجم می‌رسانیم. سپس از این محلول درون سل دستگاه اسپکتروفتومتری رقت 0/1 می‌سازیم یعنی 0/3 میلی لیتر از محلول و 2/7 میلی لیتر استن. سپس مقدار کورکومین در طول موج 425 نانومتر اندازه‌گیری گردید. منحنی استاندارد با استفاده از محلول های با غلظت متفاوت کورکومین در استن رسم گردید. جهت رسم منحنی استاندارد از کورکومین تجاری با خلوص 93 درصد به عنوان استاندارد استفاده گردید.



به منظور محاسبه غلظت کورکومین پس از قراردهی میزان جذب‌های خوانده شده در معادله خط به دست آمده از طریق نمونه‌های استاندارد میزان غلظت واقعی نمونه محاسبه می‌شود



شکل 3-3- دستگاه اسپکتروفتومتر مورد استفاده

### 3-2-5- تهیه پودر کورکومین از عصاره کورکومین به دست آمده

برای این منظور با استفاده از دستگاه روتاری مدل Heidolph حلال موجود در عصاره کورکومین جدا شد. سپس به عصاره خشک شده مقداری پلی وینیل پیرولیدون و اتانول اضافه کرده و سپس با کمک دستگاه روتاری اتانول را نیز از محلول جدا کردیم (شکل 3-5) به عصاره خشک شده و پلی وینیل پیرولیدون آب مقطر افزوده شد. محلول به دست آمده را با دستگاه سانتریفوژ مدل 2-16p، شرکت سیگما، ساخت آلمان با سرعت 2500 دور در دقیقه به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ نموده (شکل 3-6) تا فاز جامد از فاز مایع جدا شود. فاز مایع را بیرون ریخته

و فاز جامد که همان کورکومین است را داخل پلیت ریخته و در مجاورت هوا قرار داده تا خشک شود (شکل 3-7)



شکل 3-4- دستگاه روتاری مورد استفاده



شکل 3-5- دستگاه سانتریفوژ مورد استفاده



شکل 3-6- نمونه پودر به دست آمده

### 3-2-6- طیف سنجی تشدید مغناطیسی هسته

تشدید مغناطیسی هسته‌ای (NMR)، یک پدیده فیزیکی براساس مکانیک کوانتومی است. این روش، یک روش طیف سنجی برای شیمیدانان آلی از اهمیتی والاتر نسبت به طیف سنجی مادون قرمز برخوردار است. بسیاری از هسته‌ها را می‌توان با فنون NMR مطالعه کرد، ولی هیدروژن و کربن به طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرند. در حالی که طیف سنجی مادون قرمز اطلاعاتی راجع به نوع گروه‌های عاملی موجود در مولکول در اختیار می‌نهد، تشدید مغناطیسی هسته‌ای ما را از تعداد هیدروژن مطلع می‌سازد. بعلاوه این روش، اطلاعاتی راجع به طبیعت محیط اطراف این گونه اتمهای هیدروژن به دست می‌دهد. مجموع اطلاعات داده شده از مادون قرمز و تشدید مغناطیسی هسته‌ای اغلب اوقات برای تشخیص ساختمان یک مولکول مجهول کافی است.

طیف‌بینی NMR هم به منظور کارهای کمی و هم به منظور شناسایی کیفی مولکول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. هر چند که قدرت اصلی این دستگاه در شناسایی کیفی ترکیبات آلی و زیستی بسیار پیچیده‌است (74).

### 3-2-6-1 - دستگاه طیف‌سنج NMR

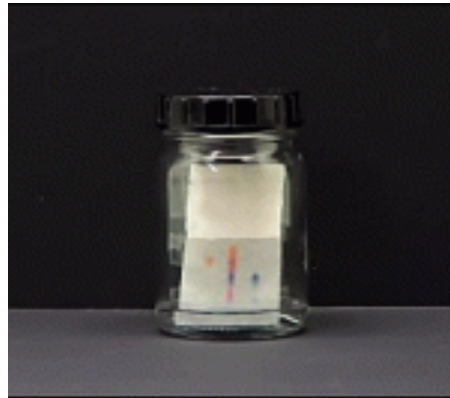
اجزای مهم یک طیف‌سنج NMR عبارت است از:

1. مغناطیس
2. پیمایش میدان مغناطیسی: یک جفت سیم‌پیچ به صورت موازی با سطوح مغناطیسی، که تناوب میدان اعمال شده در یک گستره کوچک را امکان‌پذیر می‌سازد.
3. منبع موج رادیویی
4. آشکارساز

### 3-2-7 - کروماتوگرافی لایه نازک<sup>1</sup>

کروماتوگرافی لایه نازک نوعی کروماتوگرافی جذبی جامد- مایع است و اصول آن مانند کروماتوگرافی ستونی است. ولی در این مورد جسم جاذب جامد را به صورت یک لایه نازک در روی یک قطعه شیشه یا پلاستیک محکم پخش می‌کنند. یک قطره از محلول نمونه یا مجهول را در نزدیکی لبه صفحه می‌گذارند و صفحه را همراه مقدار کافی از حلال استخراج کننده در ظرفی قرار می‌دهند. مقدار حلال باید آن قدر باشد که فقط به سطح زیر لکه برسد (شکل 4-5). حلال به طرف بالای صفحه می‌رود و اجزاء مخلوط را با سرعت‌های متفاوت با خود می‌برد. در نتیجه ممکن است تعدادی لکه روی صفحه ظاهر شود. این لکه‌ها روی یک خط عمود بر سطح حلال ظرف قرار می‌گیرند (107).

<sup>1</sup> TLC



شکل 3-7- کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

این روش کروماتوگرافی بسیار آسان است و به سرعت هم انجام می‌شود. این روش برای تفکیک اجزاء یک مخلوط بسیار مفید است و همچنین می‌توان از آن برای تعیین بهترین حلال استخراج‌کننده جهت کروماتوگرافی ستونی استفاده کرد.

در TLC می‌توان از همان مواد جامد که در کروماتوگرافی ستونی استفاده می‌شود استفاده کرد و در این میان سیلیکا و آلومینا بیشتر به کار می‌رود. معمولاً جسم جاذب را با مقدار کمی از ماده نگهدارنده مانند گچ شکسته‌بندی، کلسیم سولفات و یا نشاسته مخلوط می‌کنند تا جسم جاذب چسبندگی لازم را پیدا کند و به صفحه بچسبد. صفحه‌ها را می‌توان قبل از مصرف تهیه کرد و یا از ورقه‌های پلاستیکی آماده که در بازار موجود است استفاده نمود.

یکی از مزایای مشخص TLC آن است که احتیاج به مقدار بسیار کمی از نمونه دارد. در بعضی موارد می‌توان تا مقدار ۹-۱۰ گرم را تشخیص داد. اما ممکن است اندازه نمونه تا ۵۰۰ میکروگرم برسد. تشخیص لکه‌های رنگین در روی کروماتوگرام آسان است و برای تعیین محل لکه‌های اجسام بیرنگ روش‌های متعددی وجود دارد. برای مثال می‌توان با تابش نور ماوراء بنفش به صفحه محل لکه، ترکیب‌هایی را که خاصیت فلوئورسانس دارند مشخص کرد. به روش دیگر می‌توان جسم جاذب را با ماده فلوئورسانس دار بی اثر دیگری مخلوط کرد. هنگامی که نور

ماوراءبنفش به این صفحه بتابد، لکه اجسامی که نور ماوراءبنفش را جذب می‌کنند ولی خاصیت فلوئورسانس ندارند در زمینه فلورسانس دار صفحه به صورت تیره رنگ ظاهر می‌شوند. ید نیز معرف آشکار ساز دیگری است که مصرف می‌شود. در این مورد صفحه را در ظرفی می‌گذارند که محیط آن از بخار ید اشباع باشد. بسیاری از ترکیبات آلی ید را جذب می‌کنند و لکه آنها روی کروماتوگرام رنگین (معمولا قهوه ای) می‌شود (107).

### 3-3- بهینه‌سازی و تجزیه و تحلیل آماری

#### 3-3-1- بهینه‌سازی

بهبود کارایی سیستمها و افزایش راندمان فرآیندها بدون افزایش هزینه دارای اهمیت می‌باشد. روش به کار رفته بدین منظور، بهینه‌سازی<sup>1</sup> نامیده می‌شود. در عملیات معمول برای اندازه‌گیری شرایط عملیاتی بهینه، یکی از پارامترها با ثابت در نظر گرفتن سایر پارامترها تغییر می‌یابد. این شیوه، تکنیک یک متغیری<sup>2</sup> نامیده می‌شود. از معایب اصلی این تکنیک این است که بر هم کنش میان متغیرها را لحاظ نکرده و در نتیجه اثرات کامل پارامترها بر فرآیند را پوشش نمی‌دهند. به منظور غلبه بر این مشکل، می‌توان از متدولوژی رویه پاسخ<sup>3</sup> (RSM) بهره گرفت (70).

#### 3-3-2- متدولوژی رویه پاسخ

متدولوژی رویه پاسخ (RSM) که برای نخستین بار توسط باکس و ویلسون (1951) معرفی شد، مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضی است که در مورد فرآیندهایی کاربرد دارد که چند متغیری هستند یا مکانیسم‌های دخیل در آنها به خوبی مشخص نشده‌اند و اطلاعات موجود در

<sup>1</sup> Optimization

<sup>2</sup> One-variable-at-a-time technique

<sup>3</sup> Response Surface Methodology

مورد سیستم بسیار کم می‌باشد، یا میان متغیرها بر هم کنش وجود داشته و پاسخ غیر خطی است (29, 47 و 69).

باکس و ویلسون، کارایی شمار زیادی از طرح‌های آزمایشی را مقایسه کرده و مفهوم طرح‌های مرکب<sup>1</sup> را برای نخستین بار معرفی کردند. پیشرفت اصلی مقاله‌های باکس و همکارانش در دهه 1950، ارائه طرح‌های آزمایشی بود که به پیشنهاد بکارگیری طرح‌های مرکب توسط آنان منتهی گردید. با وجود این که مزایای طرح فاکتوریل برای تخمین زدن تابع پاسخ مدت‌های مدیدی است که شناخته شده ولی از معایب آن، بکارگیری شمار زیادی واحدهای آزمایشی است که برای فاکتورهای زیاد، مورد نیاز می‌باشد که از نظر عملی غیر ممکن است. باکس و ویلسون (1951) ایده‌های ساده آزمایش‌های فاکتوریل با استفاده طرح مرکب را از طریق افزودن نقاط اضافی به طرح فاکتوریل متحول ساختند (67).

طبق گزارش این محققین، هدف اصلی متدولوژی رویه پاسخ، سوق یافتن به شرایط بهینه است که توسط حداکثر رویه پاسخ حاصل می‌شود. کنتون توجه مقاله باکس و ویلسون و مقاله‌های بعدی آن‌ها، بکارگیری نتایج آزمایش برای برآزش مدل پاسخ چند جمله‌ای و در نتیجه تصمیم‌گیری در مورد سطوح فاکتورها در آزمایش‌های بعدی بوده است؛ در نتیجه برای آزمایشی که هدف آن بهینه‌سازی است، طرح مرکب مرکزی<sup>2</sup> ارجحیت دارد (67).

یکی از مهمترین ویژگی‌ها و جنبه‌های RSM، چرخش‌پذیری<sup>3</sup> آن می‌باشد. در تعریف طرح مرکب مرکزی (CCD) که توسط باکس و ویلسون (1951) پیشنهاد شده، در نظر گرفتن رابطه بین سطوح نقاط محوری<sup>4</sup> و نقاط طرح فاکتوریل<sup>2n</sup> که به عنوان پایه طرح مرکب است، دارای اهمیت می‌باشد. طرح‌هایی که تابع واریانس آن‌ها کروی یا نزدیک کروی است، اصطلاحاً

<sup>4</sup> Composite design

<sup>1</sup> Central Composite Design (CCD)

<sup>2</sup> Rotatability

<sup>3</sup> Axial point

طرح‌های چرخش پذیر خوانده شده‌اند به طوری که واریانس پاسخ پیش‌بینی شده در یک نقطه معین، مقداری است که تنها بستگی به فاصله آن نقطه از مرکز طرح و نه جهت آن دارد. دباون (1959) اذعان داشت که رده CCD های چرخش‌پذیر نیازمند پنج سطح برای هر فاکتور هستند (67).

RSM به طور موفقیت‌آمیزی برای مدل‌سازی و بهینه‌سازی فرآیندهای استخراج مربوط به سیستم‌های غذایی به کار رفته است که شامل استخراج پروتئین از آرد بذر کتان لوبیای سودانی<sup>4</sup>، دانه‌های جوانه زده کدو تنبل، ترکیبات فنولیک از توت‌ها و گندم، عصاره موز و ساپودیل با آب داغ، صمغ از دانه بذر کتان، ویتامین E از جوانه گندم، روغن پنبه دانه توسط دی‌اکسید کربن فوق بحرانی، آنتی‌اکسیدان از ضایعات انگور، کلسترول از زرده تخم مرغ و پکتین از تفاله سیب توسط مایکروویو می‌باشند.

### 3-3-3- تئوری RSM

RSM مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضی است که برای توسعه، بهبود و بهینه‌سازی فرآیندهایی به کار می‌رود که پاسخ مورد نظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تاثیر قرار می‌گیرد و هدف، توصیف رابطه میان پاسخ و متغیرهای مستقل توسط مدل‌های ریاضی و بهینه‌سازی این پاسخ می‌باشد. این تکنیک، اثر متغیرهای مستقل بر فرآیندها را به تنهایی یا در تلفیق با سایر متغیرها مشخص می‌نماید. شمای گرافیکی مدل ریاضی سبب تعریف واژه متدولوژی رویه پاسخ شده است. رابطه میان پاسخ و ورودی‌ها به صورت ذیل بیان می‌گردد:

<sup>4</sup> Pigeon pea



$$Y = f(\varepsilon_1, \varepsilon_2, \dots, \varepsilon_k) + \varepsilon \quad \text{رابطه (1-3)}$$

که  $Y$  پاسخ،  $f$  تابع نامشخص پاسخ،  $\varepsilon_1, \varepsilon_2, \dots, \varepsilon_k$  بیانگر متغیرهای ورودی قابل کنترل یا به عبارت دیگر متغیرهای مستقل<sup>1</sup>،  $k$  تعداد متغیرهای مستقل و نهایتاً  $\varepsilon$  خطای آماری است که مربوط به سایر منابع تغییر می‌باشد که توسط  $f$  لحاظ نشده‌اند. این منابع خطا شامل اثراتی مانند خطای اندازه‌گیری یا سایر انواع خطاهای فردی یا فرآیندی می‌باشند. به طور معمول چنین فرض می‌شود که  $\varepsilon$  دارای توزیع نرمال با میانگین و واریانس صفر است (19 و 68). در این صورت:

رابطه (2-3)

$$E(y) \equiv \eta = E[f(\varepsilon_1, \varepsilon_2, \dots, \varepsilon_k)] + E(\varepsilon) = f(\varepsilon_1, \varepsilon_2, \dots, \varepsilon_k)$$

فرآیند بهینه‌سازی توسط RSM را می‌توان به سه مرحله تفکیک کرد. مرحله نخست، مشخص نمودن پارامترهای مستقل و سطوح آن‌ها می‌باشد؛ مرحله دوم گزینش طرح آزمایشی و پیش بینی و ارزیابی رابطه مدل و مرحله نهایی، به دست آوردن و رسم نمودار رویه پاسخ و نمودار کنتور پاسخ به عنوان تابعی از پارامترهای مستقل و تعیین نقاط بهینه می‌باشد (70).

### 3-3-1- انتخاب متغیرهای مستقل و سطوح آن‌ها

در این مرحله، فاکتورهای تاثیر گذار بر فرآیند، گزینش شده و سپس سطوح آن‌ها تعیین می‌شوند. تعیین این سطوح به دلیل این که موفقیت فرآیند مستقیماً مربوط به این سطوح می‌باشد، دارای اهمیت است. به دلیل این که این پارامترها در آزمایش، واحد یا محدوده‌های متفاوت دارند، آنالیز رگرسیون را نمی‌توان مستقیماً انجام داد. در همین راستا، ابتدا بایستی پارامترها را پیش از انجام

<sup>1</sup> در حالت کلی این متغیرها، متغیرهای طبیعی نامیده می‌شوند زیرا به صورت واحدهای طبیعی اندازه‌گیری (مانند درجه سانتیگراد) بیان می‌شوند.



آنالیز رگرسیون، نرمال‌سازی کرد. هر کدام از متغیرهای کدبندی شده<sup>۱</sup> در محدوده -1 تا +1 قرار می‌گیرند، به طوری که متغیرها بدون بعد می‌شوند. مقادیر سطوح متغیرها به صورت کد بندی شده در آنالیز طرح به کار می‌روند به طوری که نقاط کعب<sup>۲</sup> با کدهای +1 و -1، نقاط مرکزی<sup>۳</sup> با کد صفر و نقاط محوری<sup>۴</sup> با کد -a و +a مشخص می‌شوند.

رابطه (3-3) به صورت کدبندی شده به صورت ذیل در می‌آید:

رابطه (3-3)

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon$$

### گزینش طرح آماری و پیش بینی و ارزیابی رابطه مدل

ده مورد از ویژگی‌هایی که بایستی در گزینش طرح رویه پاسخ به حساب آیند شامل (70):

- برآزش دادن مدل مناسب بر داده‌ها
- فراهم آوردن اطلاعات کافی برای آزمودن ضعف برآزش<sup>۵</sup>
- توان افزایش دادن درجه‌های مدل
- توان تخمین خطای خالص<sup>۶</sup> آزمایش
- عدم حساسیت به حضور انحراف در داده‌ها
- در مقابل خطاهای مربوط به کنترل سطوح طرح توانمند باشد
- از لحاظ هزینه‌ها به صرفه باشد

<sup>1</sup> Coded variable

1. Cube points  
2. Central points  
3. Axial points  
4. Lack-of-fit  
5. Pure error

- امکان انجام آزمایش‌ها به صورت بلوکی را فراهم آورد
- در فرضیه واریانس یکنواخت مصداق داشته باشد
- توزیع خوبی از  $\frac{\text{var} [\hat{y}(x)]}{\sigma^2}$  داشته باشد.

نرم افزارهای کامپیوتری، طرح‌های بهینه را بر پایه معیارهای خاص و ورودی‌هایی که کاربر مدنظر قرار می‌دهند، ایجاد می‌کنند. تفاوت این طرح‌ها با توجه به انتخاب نقاط آزمایش در تعداد آزمایش‌ها<sup>1</sup> و بلوک‌ها می‌باشد. پس از گزینش طرح، رابطه مدل تعریف شده و ضرایب آن تخمین زده می‌شوند. مدل مورد استفاده در RSM، عموماً رابطه درجه دوم کامل یا درجه دوم کاسته می‌باشند. مدل درجه دوم را می‌توان به صورت ذیل نوشت:

رابطه (3-4)

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ii} X_i^2 + \sum b_{ij} X_i X_j$$

که  $b_0$  و  $b_i$  و  $b_{ii}$  و  $b_{ij}$  ضرایب رگرسیونی برای به ترتیب عرض از مبدأ، خطی، درجه دوم و برهم کنش و  $X_i$  و  $X_j$  متغیرهای مستقل کد بندی شده هستند.

ضرایب مدل با استفاده از روش حداقل مربع‌ها<sup>2</sup> محاسبه می‌گردند که یک تکنیک رگرسیون چندگانه است. پس از به دست آوردن ضرایب رگرسیونی، پاسخ تخمین زده شده را می‌توان به سادگی با استفاده از رابطه مدل محاسبه کرد. معمولاً رفتار سیستم ناشناخته است و بنابراین بایستی توان برازش مدل بر داده‌های آزمایش را بررسی کرد. برای ارزیابی کیفیت مدل،

<sup>3</sup> Runs

<sup>1</sup> Least squares



پاسخ را بررسی کرد. به ویژه در مواقعی که در سیستم سینرژیسیم یا آنتاگونیسم داشته باشیم، RSM را می‌توان به خوبی مورد استفاده قرار داد. به علاوه، مدل تجربی که پاسخ را به متغیرهای مرتبط می‌سازد، برای کسب اطلاعات در مورد فرآیند مورد استفاده قرار می‌گیرد (20).

### 3-3-4- طرح آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها

#### 3-3-4-1- RSM و بهینه‌سازی با استفاده از روش متداول

به دلیل آن که مهمترین مسئله در این پژوهش بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورهای نسبت حلال به ماده جامد، نسبت حلال‌ها به یکدیگر و زمان بر درصد بازده استخراج می‌باشد، بنابراین طرح آماری RSM انتخاب گردید. روش رویه پاسخ، کمکی مضاعف برای یافتن حالت بهینه فاکتورها می‌باشد و نشان‌دهنده چگونگی تاثیر فاکتورها در دامنه مورد بررسی بر نتایج آزمون‌هاست (70).

فرآیند بهینه‌سازی توسط RSM را می‌توان به سه مرحله تفکیک کرد. مرحله نخست، مشخص نمودن پارامترهای مستقل و سطوح آن‌ها می‌باشد. مرحله دوم، گزینش طرح آزمایشی و پیش بینی و ارزیابی رابطه مدل و مرحله نهایی، به دست آوردن و رسم نمودار رویه پاسخ و نمودار کنتور پاسخ به عنوان تابعی از پارامترهای مستقل و تعیین نقاط بهینه می‌باشد (20).

در این مطالعه از طراحی سطح پاسخ با سه متغیر برای بررسی ارتباط بین پاسخ‌های به دست آمده و متغیرهای فرآیند و بهینه‌سازی این پاسخ‌ها استفاده می‌شود. اثر متغیرهای مستقل شامل  $X_1$  نسبت حلال به ماده جامد،  $X_2$  نسبت استن و اتانول به یکدیگر و  $X_3$  زمان، در سه سطح در جدول (1-3) نشان داده است.

شش تکرار نقطه مرکزی برای تخمین خطای آزمایش استفاده شد. در ضمن، متغیرها مطابق معادله زیر کد گذاری شدند:

رابطه (3-5)

$$x_i = (X_i - \bar{X}_i) / \Delta X_i$$

در این جا،  $x_i$  مقدار بدون بعد متغیر مستقل فرآیند،  $X_i$  مقدار واقعی متغیر مستقل فرآیند،  $\bar{X}_i$  مقدار واقعی متغیر مستقل در نقطه مرکزی و  $\Delta X_i$  تغییر پله‌ای است. کدهای مشخص شده عبارتند از:

$$X_1 = (1/75 - \text{نسبت حلال به ماده جامد}) / 0/25$$

$$X_2 = (50 - \text{نسبت استن و اتانول نسبت به یکدیگر}) / 50$$

$$X_3 = (36 - \text{زمان}) / 12$$

جدول 3-1- نمایش متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آنها

کد و سطح مربوطه			نماد ریاضی	متغیرهای مستقل
-1	0	+1		
1/5	1/75	2	$X_1$	نسبت حلال به ماده جامد (حجمی/وزنی)
0	50	100	$X_2$	نسبت استن و اتانول به یکدیگر (حجمی/حجمی)
24	36	48	$X_3$	زمان (ساعت)

در مرحله بعد، طرح آماری گزینش شده و رابطه مدل مورد استفاده برای پیش بینی برآزش شده و مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. مدل مورد استفاده در RSM، عموماً رابطه درجه دوم کامل یا درجه دوم کاسته می‌باشند. میانگین غلظت کورکومین به دست آمده از سه مرتبه تکرار هر آزمایش به عنوان متغیر وابسته یا پاسخ (Y) در نظر گرفته می‌شود، در روش RSM برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می‌نماید، مدل چند متغیره به صورت زیر می‌باشد. در این آزمایش (Yi) به عنوان متغیر وابسته یا پاسخ و معادله درجه دوم زیر برای بررسی نتایج استفاده می‌شود:

رابطه (3-6)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

در معادله ذکر شده Y پاسخ پیش‌بینی شده  $\beta_0$  ضریب ثابت،  $\beta_1$ ،  $\beta_2$ ،  $\beta_3$  اثرات خطی،  $\beta_{33}$ ،  $\beta_{11}$ ،  $\beta_{22}$  اثر مربعات و  $\beta_{12}$ ،  $\beta_{13}$ ،  $\beta_{23}$  اثرات متقابل می‌باشند. به منظور تجزیه و تحلیل اطلاعات و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ از نرم افزارهای Design-Expert 7.1.6 استفاده می‌گردد.

در این تحقیق از طرح مرکب مرکزی<sup>1</sup> با سه متغیر مستقل؛ نسبت حلال به ماده جامد و نسبت حلال‌ها به یکدیگر و زمان استخراج، سه سطح، سه بلوک و شش تکرار در مرکز طرح (برای محاسبه تکرارپذیری فرآیند) به منظور بررسی تاثیر شرایط استخراج کورکومین و بهینه‌سازی فرآیند مذکور استفاده خواهد شد.

تعداد کل آزمایشات با سه تکرار برابر 60 بوده و متغیر وابسته (پاسخ)؛ غلظت کورکومین استخراج شده می‌باشد.

<sup>1</sup> Central Composite design (CCD)



جدول 3-2 نشان‌دهنده 20 تیمار استخراجی از نقطه نظر نسبت حلال به ماده جامد، نسبت حلال‌ها به یکدیگر و زمان می‌باشد.

جدول 3-2- نمایش متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آن‌ها در روش استخراج کورکومین با کمک حلال

تیمار	نسبت حلال به ماده جامد	نسبت حلال‌ها به یکدیگر	زمان (ساعت)
1	1/75	50	24
2	1/75	50	36
3	1/75	50	36
4	1/50	0	24
5	1/50	100	48
6	2	0	24
7	1/75	50	36
8	1/50	0	48
9	1/75	50	36
10	1/75	0	36
11	2	0	48
12	2	100	24
13	1/75	50	36
14	1/50	100	24
15	2	50	36
16	1/75	50	48
17	2	100	48
18	1/75	50	36
19	1/75	100	36
20	1/50	50	36



### 3-3-4-2-RSM و بهینه‌سازی شرایط استخراج با استفاده از امواج فراصوت

پس از تعیین شرایط بهینه استخراج با استفاده از روش متداول در فاز اول، از امواج فراصوت با هدف کاهش زمان و افزایش بازدهی استخراج بهره گرفته شد. در این بخش نیز از طراحی سطح پاسخ با سه متغیر برای بررسی ارتباط بین پاسخ‌های به دست آمده و متغیرهای فرآیند و بهینه‌سازی این پاسخ‌ها استفاده می‌شود. اثر متغیرهای مستقل شامل  $X_1$  زمان،  $X_2$  دما و  $X_3$  توان دستگاه فراصوت، در سه سطح در جدول 3-3 نشان داده است.

شش تکرار نقطه مرکزی برای تخمین خطای آزمایش استفاده شد. در ضمن، متغیرها مطابق معادله زیر کد گذاری شدند:

$$x_i = (X_i - \bar{X}_i) / \Delta X_i$$

در این‌جا،  $x_i$  مقدار بدون بعد متغیر مستقل فرآیند،  $X_i$  مقدار واقعی متغیر مستقل فرآیند،  $\bar{X}_i$  مقدار واقعی متغیر مستقل در نقطه مرکزی و  $\Delta X_i$  تغییر پله‌ای است. کدهای مشخص شده عبارتند از:

جدول 3-3- نمایش متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آن‌ها

متغیرهای مستقل	نماد ریاضی	کد و سطح مربوطه
		-1      0      +1
زمان	$X_1$	1      8      15
دما	$X_2$	25      35      45
توان (وات)	$X_3$	10      55      100

در این فاز هم تعداد کل آزمایشات با سه تکرار برابر 60 بوده و متغیر وابسته (پاسخ)؛ غلظت کورکومین استخراج شده می‌باشد.



جدول 3-4، نشان‌دهنده 20 تیمار استخراجی از نقطه نظر نسبت حلال به ماده جامد، نسبت

حلال‌ها به یکدیگر و زمان می‌باشد:

جدول 3-4- تیمارهای صوت انجام گرفته بر روی ریزوم زردچوبه

تیمار	زمان (دقیقه)	دما (درجه سانتی‌گراد)	قدرت صوت	غلظت کورکومین استخراجی
1	1	25	10	3/58283
2	15	25	10	4/9323
3	1	45	10	3/13539
4	15	45	10	5/98214
5	1	25	100	4/080153
6	15	25	100	4/51065
7	1	45	100	3/05431
8	15	45	55	4/014219
9	1	35	55	3/67323
10	15	35	55	4/086339
11	8	25	55	4/001745
12	8	45	55	4/105992
13	8	35	10	4/109556
14	8	35	100	4/109556
15	8	35	55	4/2566
16	8	35	55	4/120248
17	8	35	55	4/019565
18	8	35	55	4/034712
19	8	35	55	4/08639
20	8	35	55	5/53251



**فصل چهارم**  
**یافته‌های تحقیق**

#### 4-1- مدل‌سازی RSM

##### 4-1-1-4- گزینش مدل مناسب

به منظور حصول مدل‌های تجربی برای پیش‌بینی پاسخ (غلظت)، رابطه‌های خطی و چند جمله‌ای درجه دوم (رابطه 3-4) بر داده‌های به دست آمده از آزمایش‌ها (جدول 4-1) برازش شدند. سپس این مدل‌ها مورد آنالیز آماری قرار گرفتند تا مدل مناسب گزینش گردد. معنی‌داری آماری مدل‌ها با استفاده از آزمون F و مقدار احتمال (P) بررسی شدند که هر چه مقدار مطلق F بزرگتر و مقدار P کوچک‌تر ( $P < 0.01$ ) باشد، میزان معنی‌داری بیشتر خواهد بود (18).

به طور متداول جهت بررسی صحت مدل از ضریب تبیین<sup>1</sup> ( $R^2$ ) و آزمون عدم برازش<sup>2</sup> استفاده می‌شود. معنی‌دار بودن آزمون عدم برازش برای یک مدل بیانگر این است که نقاط به خوبی اطراف مدل قرار نگرفته‌اند و در نتیجه نمی‌توان از مدل برای پیشگویی مقادیر متغیرهای تابع استفاده نمود. بنابراین عدم معنی‌داری آزمون عدم برازش بدین معنی است که مدل توانسته است به خوبی بر داده‌های مورد بررسی برازش شود.

برای این که مدل توانایی خوبی برای برازش اطلاعات داشته باشد لازم است که  $R^2_{\text{adjusted}}$  و  $R^2_{\text{predicted}}$  دارای بالاترین مقدار باشد. ضریب تبیین ( $R^2$ ) به عنوان نسبت تغییرات توصیف شده توسط مدل به تغییرات کل بیان می‌شود که معیاری از درجه تناسب برازش می‌باشد. بنابراین هر چه مقدار  $R^2$  به یک نزدیک‌تر شود، قدرت مدل برازش یافته در توصیف تغییرات پاسخ به عنوان تابعی از متغیرهای مستقل بیشتر می‌باشد. چنین عنوان کرده‌اند که برای یک مدل با برازش خوب، مقدار  $R^2$  بایستی حداقل 0/8 باشد (49)

<sup>1</sup> Coefficient of determination

<sup>2</sup> Lack of fit



نتایج آزمون ضعف برآزش و ارزیابی صحت مدل‌های برآزش شده به ترتیب در جدول 4-2 و 4-4-3 خلاصه شده است.

همانطور که در جدول 4-2 مشاهده می‌شود، آزمون ضعف برآزش مربوط به مدل برآزش یافته (چند جمله‌ای درجه دوم) بر پاسخ معنی‌دار نمی‌باشد.

جدول 4-1- تیمارهای انجام گرفته بر روی ریزوم زردچوبه

تیمار	نسبت حلال به ماده جامد	نسبت حلال‌ها به یکدیگر	زمان (ساعت)	غلظت
1	1/75	50	24	3/63179
2	1/75	50	36	3/5839
3	1/75	50	36	3/61174
4	1/50	0	24	3/64886
5	1/50	100	48	3/63699
6	2	0	24	3/70084
7	1/75	50	36	3/6329
8	1/50	0	48	3/68525
9	1/75	50	36	3/58464
10	1/75	0	36	3/66223
11	2	0	48	3/82298
12	2	100	24	3/75356



3/60988	36	50	1/75	13
3/598	24	100	1/50	14
3/68785	36	50	2	15
3/68859	48	50	1/75	16
3/69787	48	100	2	17
3/59541	36	50	1/75	18
3/6136	36	100	1/75	19
3/55457	36	50	1/50	20

جدول 4-2- نتایج آزمون ضعف برازش مدل‌های برازش یافته بر داده‌های پاسخ

Lack of Fit Tests						
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Linear	0.039	11	3.527E-003	9.92	0.0101	Suggested
2FI	0.035	8	4.357E-003	12.26	0.0067	
Quadratic	4.844E-003	5	9.688E-004	2.73	0.1477	Suggested
Cubic	1.765E-004	1	1.765E-004	0.50	0.5126	Aliased
Pure Error	1.778E-003	5	3.555E-004			

با توجه به مقادیر  $R^2$ ،  $R^2_{adjusted}$  و  $R^2_{predicted}$  مربوط به مدل‌ها (جدول 4-3)، مشاهده می‌شود که مدل چند جمله‌ای درجه دوم دارای مقادیر بالاتری است، پس نتیجه می‌گیریم که در برازش داده‌ها توان بیشتری را دارا می‌باشد.

جدول 4-3- نتایج آنالیز آماری مدل برازش یافته بر داده‌های پاسخ

Model Summary Statistics						
Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0.050	0.4829	0.3859	0.0503	0.075	Suggested
2FI	0.053	0.5331	0.3176	-2.4545	0.27	
Quadratic	0.026	0.9156	0.8397	-0.3102	0.10	Suggested
Cubic	0.018	0.9751	0.9211	-1.7925	0.22	Aliased

بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز آماری مدل چندجمله‌ای درجه دوم<sup>1</sup> گزینش شده و بر داده راندمان برازش داده شد. پس از برازش مدل، رابطه‌های به دست آمده در معرض الگوریتم حذف دستی قرار گرفتند زیرا که این الگوریتم به میزان بسیار کمی از ساختار همبسته رگرورها (متغیرهای مستقل) تاثیر می‌پذیرد (70). با استفاده از الگوریتم مذکور (جدول 4-4)، جملات مدل که از نظر آماری در سطح 95 درصد معنی‌دار نبودند حذف شده و در نتیجه تعداد جملات مدل کاهش دادند (مدل درجه دوم کاسته).

<sup>1</sup> Quadratic

جدول 4-4- الگوریتم

Intercept	M
A	M
B	M
C	M
A <sup>2</sup>	M
B <sup>2</sup>	M
C <sup>2</sup>	M
AB	M
AC	M
BC	M
A <sup>3</sup>	~
B <sup>3</sup>	~
C <sup>3</sup>	~
A <sup>2</sup> B	~
A <sup>2</sup> C	~
AB <sup>2</sup>	~
AC <sup>2</sup>	~
B <sup>2</sup> C	~
BC <sup>2</sup>	~
ABC	~

#### 4-1-2- تجزیه مدل برازش یافته

همان‌طور که در جدول 4-5 مشاهده می‌شود، مدل درجه دوم کاسته برای راندمان از نظر آماری معنی‌دار بوده ( $P < 0.001$ ) است؛ و آزمون ضعف برازش آن معنی‌دار نمی‌باشد ( $P > 0.05$ ) که نشانگر مناسب بودن مدل، پس از کاهش دادن تعداد جملات آن است. عبارتهای مدل که معنی‌دار بوده‌اند شامل نسبت حلال به ماده جامد ( $P < 0.01$ )، نسبت حلال‌ها به یکدیگر ( $P \leq 0.05$ )، زمان ( $P \leq 0.05$ )، عبارت درجه دوم زمان ( $P \leq 0.01$ ) بوده‌اند. همچنین عبارات مربوط به اثرات درجه دوم به شکل مدل، حالت انحنا بخشیده‌اند. همچنین عبارتهای مربوط به برهم‌کنش معنی‌دار نبودند و از مدل حذف شدند، به عبارت دیگر هیچ‌گونه برهم‌کنشی میان متغیرهای مستقل وجود نداشت. مقدار بالای  $R^2$  ( $R^2 = 0/9156$ ) و متناسب بودن مقدار  $R^2_{\text{predicted}}$  و  $R^2_{\text{adjusted}}$ ، بیانگر قدرت بالای مدل در پیش‌بینی می‌باشد (جدول 4-6).





جدول 4-5- نتایج جدول آنالیز واریانس (ANOVA) مدل سطح پاسخ درجه دوم کاسته برای

راندمان

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	0.072	9	7.982E-003	12.05	0.0003	significant
A	0.029	1	0.029	43.94	< 0.0001	
B	4.847E-003	1	4.847E-003	7.32	0.0221	
C	3.945E-003	1	3.945E-003	5.96	0.0348	
A <sup>2</sup>	3.218E-004	1	3.218E-004	0.49	0.5016	
B <sup>2</sup>	2.083E-003	1	2.083E-003	3.15	0.1065	
C <sup>2</sup>	6.820E-003	1	6.820E-003	10.30	0.0093	
AB	8.932E-005	1	8.932E-005	0.13	0.7211	
AC	9.926E-006	1	9.926E-006	0.015	0.9050	
BC	3.838E-003	1	3.838E-003	5.80	0.0368	
Residual	6.622E-003	10	6.622E-004			
Lack of Fit	4.844E-003	5	9.688E-004	2.73	0.1477	not significant
Pure Error	1.778E-003	5	3.555E-004			
Cor Total	0.078	19				

جدول 4-6- خلاصه نتایج آماری مدل برازش یافته (درجه دوم کاسته)

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0.050	0.4829	0.3859	0.0503	0.075	Suggested
2FI	0.053	0.5331	0.3176	-2.4545	0.27	
Quadratic	0.026	0.9156	0.8397	-0.3102	0.10	Suggested
Cubic	0.018	0.9751	0.9211	-1.7925	0.22	Aliased

#### 4-1-3- تاثیر متغیرهای مستقل بر پاسخ

ماهیت سیستم رویه پاسخ (تشخیص نقاط حداکثر، حداقل یا زینی<sup>1</sup>) بستگی به علامت و بزرگی ضرایب مدل رگرسیونی دارد که در این رابطه بیشترین سهم را ضرایب درجه دوم و برهم کنش دارند. همچنین تشخیص ماهیت سیستم و موقعیت نقطه هدف، بخش مهمی از آنالیز مدل های درجه دوم است که توسط نمودارهای سه بعدی و نقشه کنتور میسر می‌گردد. این شیوه شهودی کردن مدل‌ها در زمینه تعیین ماهیت رویه نقش بسزایی دارد (70).

ضرایب مدل درجه دوم کاسته که بیانگر تاثیر شرایط مختلف استخراج بر راندمان است، با استفاده از تکنیک حداقل مربعات (70) محاسبه گردیدند که در جدول 4-7 ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد، مدل مربوط به راندمان دارای عبارات درجه دوم است.

جدول 4-7- مقادیر ضرایب مدل‌های درجه دوم کاسته برای پاسخ‌های استخراج کورکومین از

ریزوم زردچوبه

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$C = +3.61 + 0.054 * A - 0.022 * B + 0.020 * C + 0.011 * A^2 + 0.028 * B^2 + 0.050 * C^2 + 3.341E-003 * A * B - 1.114E-003 * A * C - 0.022 * B * C$$

پاسخ (غلظت)	ضرایب
3/61	$\beta_0$
0/054	$\beta_1$
-0/022	$\beta_2$
0/020	$\beta_3$
3/341	$\beta_{12}$
-1/114	$\beta_{13}$
-0/022	$\beta_{23}$
0/011	$\beta_{11}$
0/028	$\beta_{22}$
0/050	$\beta_{33}$

<sup>1</sup> Saddle points

برای شهودی کردن رابطه متغیرهای مستقل و پاسخ، نمودارهای سه بعدی رویه پاسخ با دو متغیر مستقل در مقابل پاسخ رسم شدند. در حالی که متغیر سوم ثابت در نظر گرفته شد.

#### 4-2- تاثیر امواج فراصوت در بهینه سازی استخراج

در این مطالعه از طراحی سطح پاسخ با سه متغیر برای بررسی ارتباط بین پاسخ‌های به دست آمده و متغیرهای فرآیند و بهینه‌سازی این پاسخ‌ها استفاده می‌شود. اثر متغیرهای مستقل شامل  $X_1$  زمان،  $X_2$  دما و  $X_3$  توان دستگاه فراصوت، در سه سطح در جدول 4-8، نشان داده است.

شش تکرار نقطه مرکزی برای تخمین خطای آزمایش استفاده شد. در ضمن، متغیرها مطابق معادله زیر کد گذاری شدند:

رابطه (3-5)

$$x_i = (X_i - \bar{X}_i) / \Delta X_i$$

در این جا،  $x_i$  مقدار بدون بعد متغیر مستقل فرآیند،  $X_i$  مقدار واقعی متغیر مستقل فرآیند،  $\bar{X}_i$  مقدار واقعی متغیر مستقل در نقطه مرکزی و  $\Delta X_i$  تغییر پله‌ای است. کدهای مشخص

شده عبارتند از:

جدول 4-8- نمایش متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آنها

متغیرهای مستقل	نماد ریاضی	کد و سطح مربوطه		
		-1	0	+1
رمان	$X_1$	1	8	15
دما	$X_2$	25	35	45
توان (وات)	$X_3$	10	55	100

در مرحله بعد، طرح آماری گزینش شده و رابطه مدل مورد استفاده برای پیش بینی برآزش شده و مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. مدل مورد استفاده در RSM، عموماً رابطه درجه دوم کامل یا درجه دوم کاسته می‌باشند.

میانگین غلظت کورکومین به دست آمده از سه مرتبه تکرار هر آزمایش به عنوان متغیر وابسته یا پاسخ (Y) در نظر گرفته می‌شود، در روش RSM برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می‌نماید، مدل چند متغیره به صورت زیر می‌باشد. در این آزمایش (Y<sub>i</sub>) به عنوان متغیر وابسته یا پاسخ و معادله درجه دوم زیر برای بررسی نتایج استفاده می‌شود:

رابطه (3-6)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

در معادله ذکر شده  $Y$  پاسخ پیش‌بینی شده  $\beta_0$  ضریب ثابت،  $\beta_1, \beta_2, \beta_3$  اثرات خطی و  $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$  اثرات متقابل می‌باشند. به منظور تجزیه و تحلیل اطلاعات و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ از نرم افزارهای Design-Expert 7.1.6 استفاده می‌گردد. در این تحقیق از طرح مرکب مرکزی<sup>1</sup> با سه متغیر مستقل، زمان فراصوت‌دهی، دما و توان دستگاه فراصوت، سه سطح و شش تکرار در مرکز طرح (برای محاسبه تکرارپذیری فرآیند) به منظور بررسی تاثیر شرایط استخراج کورکومین و بهینه‌سازی فرآیند مذکور استفاده خواهد شد.

تعداد کل آزمایشات با سه تکرار برابر 60 بوده و متغیر وابسته (پاسخ)؛ غلظت کورکومین استخراج شده می‌باشد.

جدول 4-9، نشان‌دهنده 20 تیمار استخراجی از نقطه نظر نسبت حلال به ماده جامد، نسبت حلال‌ها به یکدیگر و زمان می‌باشد:

جدول 4-9. تیمارهای صوت انجام گرفته بر روی ریزوم زردچوبه

تیمار	زمان (دقیقه)	دما (درجه سانتی گراد)	قدرت صوت	غلظت کورکومین استخراجی
1	1	25	10	3/58283
2	15	25	10	4/9323
3	1	45	10	3/13539
4	15	45	10	5/98214
5	1	25	100	4/080153

<sup>1</sup> Central Composite design (CCD)



4/51065	100	25	15	6
3/05431	100	45	1	7
4/014219	55	45	15	8
3/67323	55	35	1	9
4/086339	55	35	15	10
4/001745	55	25	8	11
4/105992	55	45	8	12
4/109556	10	35	8	13
4/109556	100	35	8	14
4/2566	55	35	8	15
4/120248	55	35	8	16
4/019565	55	35	8	17
4/034712	55	35	8	18
4/08639	55	35	8	19
5/53251	55	35	8	20

Archive of SID

## فصل پنجم

### تجزیه و تحلیل یافته‌های تحقیق

#### 5-1- بهینه‌سازی شرایط استخراج به روش متداول (ماسراسیون)

تأثیر متغیرهای مستقل بر راندمان استخراج کورکومین از ریزوم زردچوبه به صورت روبه پاسخ و کنترل نشان داده شده است. تأثیر نسبت حلال به ماده جامد بر غلظت در شکل 5-1 و 5-2، نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود، نسبت حلال به ماده جامد تأثیر عمده‌ای بر راندمان داشته است. تأثیر مستقل نسبت حلال به ماده جامد بر راندمان، بدون لحاظ نمودن سایر متغیرها، به صورت خطی است به طوری که با افزایش نسبت حلال به ماده جامد، میزان راندمان افزایش پیدا می‌کند که معنی‌دار بودن اثر خطی نسبت حلال به ماده جامد ( $P \leq 0.01$ ) مؤید آن است (جدول 4-5)؛ در حقیقت تنها اثر معنی‌دار برای نسبت حلال به ماده جامد، اثر خطی

است که در شکل‌های رویه و کنتور مشهود است. افزایش بازده احتمالا به دلیل نفوذ بیشتر حلال و افزایش پدیده اسمز بوده که قابلیت حل شدن کورکومین افزایش یافته و در نتیجه میزان کورکومین بیشتری خارج می‌شود. در تمامی شرایط اعمال شده برای استخراج کورکومین، براساس نتایج به دست آمده مشخص شد که نسبت حلال به ماده جامد بیشترین تاثیر را بر غلظت استخراج اعمال می‌کند. نتایج مشابهی توسط مجید و همکاران (1999) و سیر و همکاران (1963) مبنی بر تاثیرپذیری استخراج کورکومین از میزان حلال و نهایتا افزایش راندمان گزارش شده است (63).

شکل های 1-5 و 3-5 بیانگر تغییرات غلظت با نسبت حلال‌ها به یکدیگر می‌باشد. اثر نسبت حلال‌ها به یکدیگر بر غلظت بدون در نظر گرفتن سایر متغیرها به گونه‌ای است که بیشترین بازده استخراج مربوط به زمانبست که از استن به تنهایی استفاده شد و پس از آن بیشترین بازده مربوط به زمانبست که از اتانول به تنهایی استفاده شد و کمترین بازده استخراج مربوط به زمانبست که از استن و اتانول به نسبت 50:50 استفاده شده است.

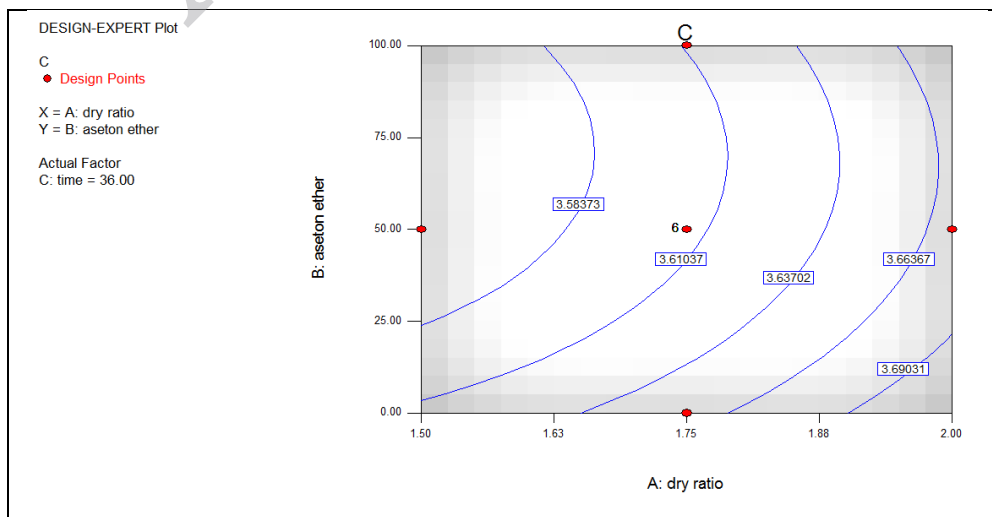
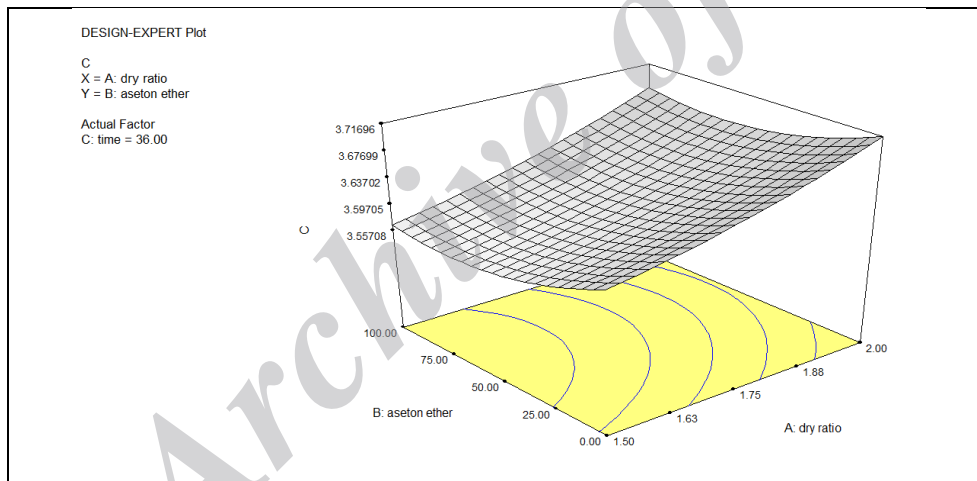
مجید و همکاران (1999) در پژوهش خود در استخراج کورکومین از ریزوم زردچوبه، اظهار نمودند که استن حلال مناسبی برای استخراج کورکومین بوده است (63).

در شکل‌های 2-5 و 3-5، تاثیر مدت زمان بر غلظت استخراج نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تاثیر زمان بر غلظت بدون لحاظ نمودن تغییرات سایر متغیرها، به گونه‌ای است که با افزایش زمان از 24 ساعت تا 48 ساعت، به تدریج بازده استخراج کورکومین افزایش می‌یابد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود نسبت تاثیر زمان بر غلظت بسیار کمتر از نسبت حلال به ماده جامد است.

پووی و همکاران (1998) بیان کردند خیساندن ساده فرآیند استخراج کندی است. به این جهت تلاش‌های فراوانی در جهت کاهش زمان مورد نیاز برای عمل استخراج صورت گرفته است (73).



در مورد اثرات درجه دوم برای فاکتورهای مورد بررسی، ضریب رگرسیون درجه دوم مربوط به فاکتور دما در سطح 1 درصد و فاکتور زمان در سطح 5 درصد معنی‌دار بود (جدول 4-5).  
 آثار متقابل فاکتورهای مورد بررسی برای راندمان معنی‌دار نبود (جدول 4-5). نتایج به دست آمده از اثر متقابل فاکتورها در جدول 4-7 درج گردیده است. اثر متقابل بین دو فاکتور نسبت آب به ماده جامد و نسبت حلال‌ها به یکدیگر، نسبت آب به ماده جامد و زمان، نسبت حلال‌ها به یکدیگر و زمان از نظر آماری معنی‌دار نبود که نشان‌دهنده عدم وجود رابطه خطی توأم بین فاکتورهای مورد بررسی بر میزان غلظت می‌باشد.



شکل 5-1- نمودار رویه پاسخ و کنتور راندمان؛ تاثیر نسبت حلال به ماده جامد- نسبت

حلال‌ها به یکدیگر

DESIGN-EXPERT Plot

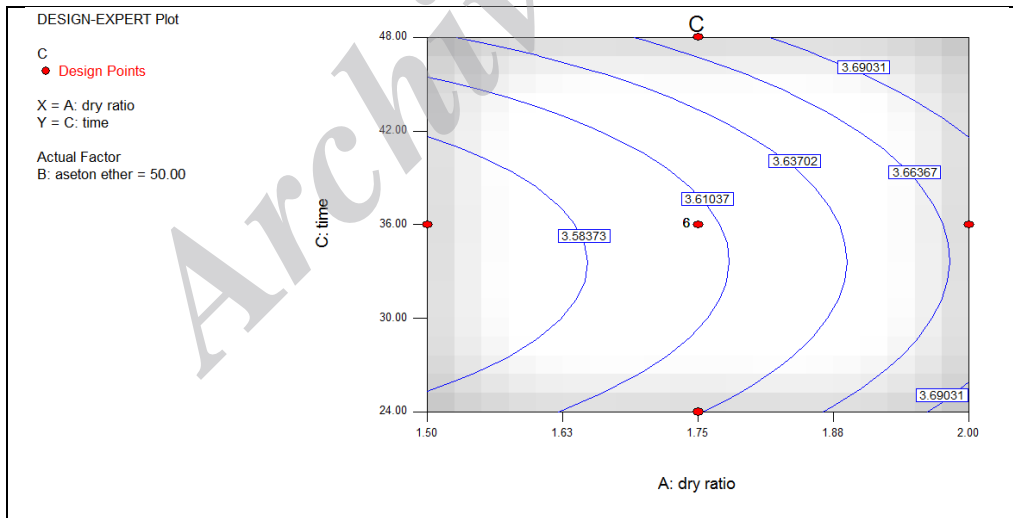
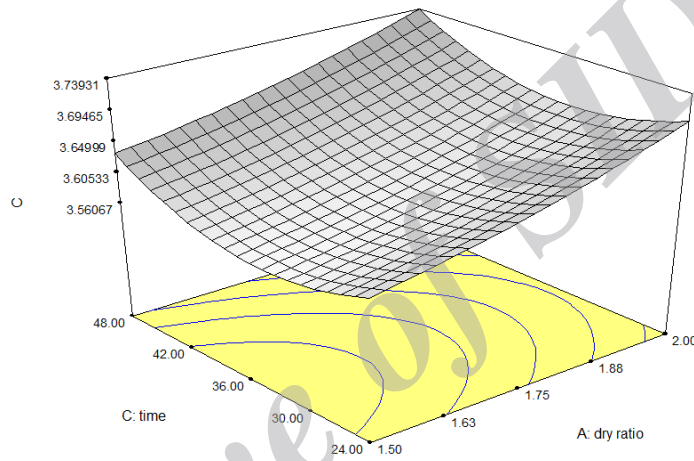
C

X = A: dry ratio

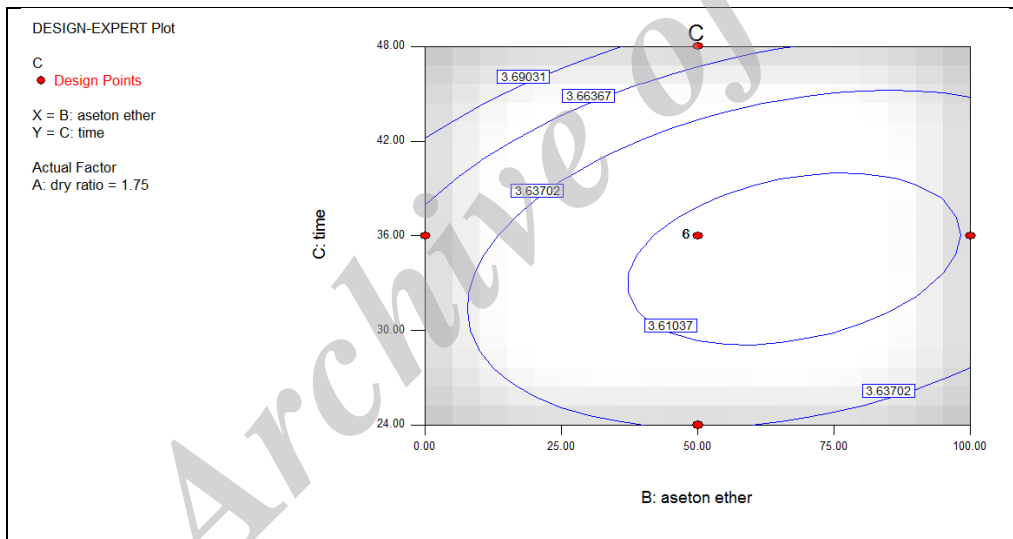
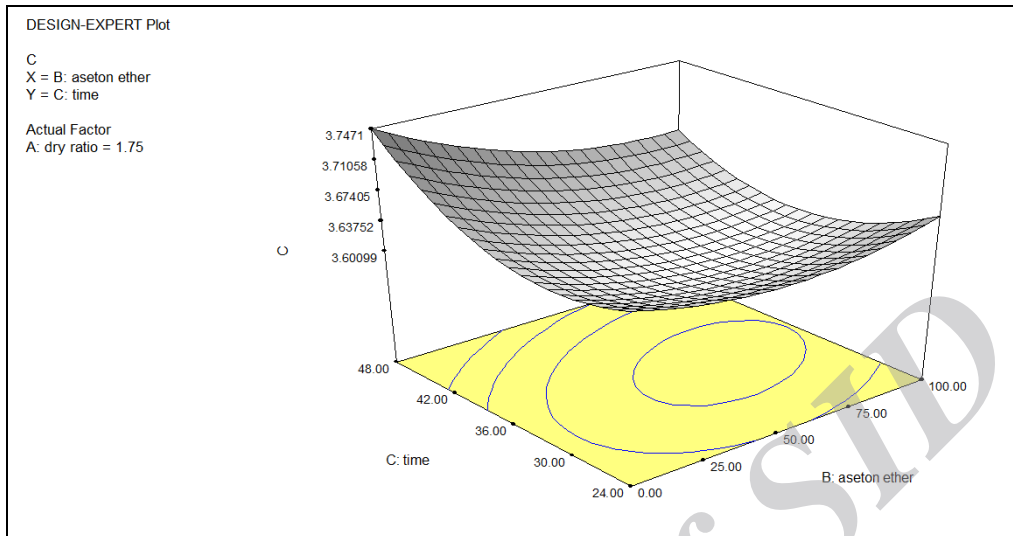
Y = C: time

Actual Factor

B: aseton ether = 50.00



شکل 5-2- نمودار رویه پاسخ و کنتور راندمان؛ تاثیر نسبت حلال به ماده جامد- زمان



شکل 5-3- نمودار رویه پاسخ و کنتور راندمان؛ نسبت حلال‌ها به یکدیگر- زمان

### 5-1-1- بهینه‌سازی

شرایط عملیاتی بهینه برای استخراج کورکومین از ریزوم زردچوبه، با استفاده از تکنیک بهینه‌سازی عددی<sup>1</sup> جستجو شد. در علم ریاضیات، واژه بهینه‌سازی عددی به مطالعه مسائلی اطلاق می‌شود که جستجو برای یافتن حداکثر یا حداقل یک تابع حقیقی با استفاده از گزینش سیستماتیک مقادیر

<sup>1</sup> Numerical optimization

متغیرهای حقیقی یا صحیح از میان یک مجموعه امکان‌پذیر انجام می‌شود. تکنیک بهینه‌سازی عددی بر مدل به دست آمده برای راندمان اعمال شد. در تکنیک مذکور، فضای پاسخ با استفاده از مدل‌های ایجاد شده (به بخش مدل‌سازی RSM مراجعه شود) و به منظور یافتن بهترین شرایطی که اهداف بهینه‌سازی مورد نظر را برآورده می‌کنند، جستجو می‌شود. بدین منظور، در ابتدا اهداف بهینه‌سازی را مشخص کرده و سپس سطوح پاسخ و متغیرهای مستقل را تنظیم کرده و با استفاده از تکنیک فاین تیونینگ<sup>1</sup>، بهترین جواب‌ها را به دست خواهیم آورد. تکنیک فاین تیونینگ به مواردی اطلاق می‌گردد که پارامترهای یک مدل بایستی به طور دقیق تنظیم گردند تا با مشاهده‌ها همخوانی داشته باشند؛ به عبارت دیگر طوری به فواصل مشخص تقسیم‌بندی گردند تا معیارهای بهینه‌سازی را برآورده سازند.

با به کارگیری روش آماری سطح پاسخ، معادله زیر که نشان‌دهنده ارتباط تجربی میان میزان درصد راندمان و متغیرهای آزمایش به صورت کدگذاری شده است به دست آمد:

رابطه (5-1)

$$Y = 3.61 + 0.054X_1 - 0.022X_2 + 0.020X_3 + 0.011X_1^2 + 0.028X_2^2 + 0.050X_3^2 + 3.341X_{12} - 1.114X_{13} - 0.022X_{23}$$

مقایسه مقادیر مشاهده شده ( $Y_0$ ) با مقادیر پیش‌بینی شده ( $Y$ ) در جدول 5-1 آمده است که نشان‌دهنده تطابق نزدیک این اعداد است به عنوان مثال در آزمون شماره 9، پاسخ پیش‌بینی شده برابر 3/56 بوده و میزان پاسخ به دست آمده 3/55 بوده است و در آزمون شماره 18 نیز میزان پاسخ پیش‌بینی شده 3/61 و میزان پاسخ به دست آمده 3/58 می‌باشد که این امر نشان‌دهنده

<sup>1</sup> Fine tuning



همبستگی بسیار خوب بین نتایج به دست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش‌بینی شده با روش آماری است. مقادیر بکار رفته در بهینه سازی در جدول 5-2 آمده است.

جدول 5-1- مقایسه مقادیر مشاهده شده با مقادیر پیش‌بینی شده حاصل از هر تیمار

Standard Order	Actual Value	Predicted Value
1	3.65	3.62
2	3.70	3.73
3	3.60	3.62
4	3.75	3.73
5	3.69	3.71
6	3.82	3.81
7	3.64	3.61
8	3.70	3.73
9	3.55	3.56
10	3.69	3.67
11	3.66	3.66
12	3.61	3.61
13	3.63	3.64
14	3.69	3.68
15	3.60	3.61
16	3.63	3.61
17	3.58	3.61
18	3.58	3.61
19	3.61	3.61
20	3.61	3.61

جدول 5-2- مقادیر به کار رفته در بهینه‌سازی

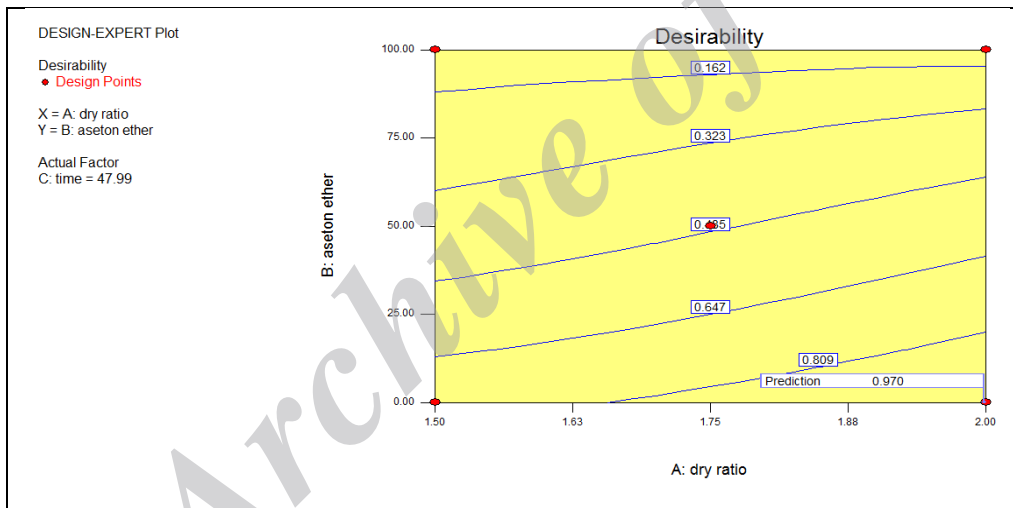
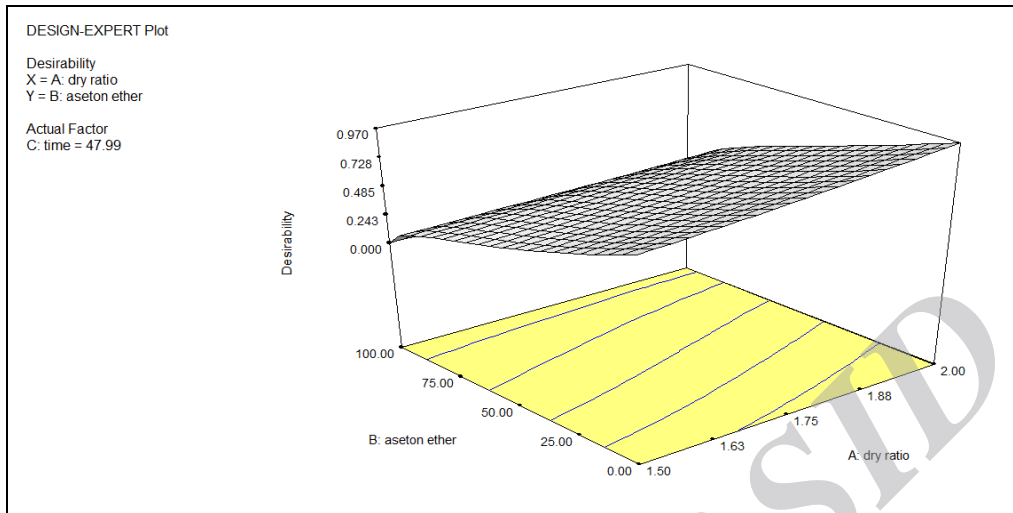
مقدار	پاسخ	مقدار	متغیر مستقل
3/55 - 3/82	غلظت	1/5-2	نسبت حلال به ماده جامد (v/w)
		0-100	نسبت حلال‌ها به یکدیگر (v/v)
		24-48	زمان (ساعت)

شرایط بهینه برای استخراج کورکومین از ریزوم زردچوبه به طوری که بالاترین راندمان را داشته باشیم، تعیین گردید. نتایج بهینه شرایط استخراج در جدول 5-3 و شکل 5-4 نشان داده شده است. بیشینه مقدار کورکومین در حالتی است که سه پارامتر مورد نظر در محدوده بررسی قرار داشتند.

جدول 5-3- نتایج به دست آمده از فرآیند بهینه‌سازی

مقدار	پاسخ	مقدار	متغیر مستقل
3/80739	غلظت	2	نسبت حلال به ماده جامد (v/w)
		100 درصد استن	نسبت حلال‌ها به یکدیگر (v/v)
		48	زمان (ساعت)

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، نسبت حلال به ماده جامد در مقادیر نزدیک به 2 بیشترین مقدار پاسخ (غلظت) را حاصل می‌کرد که تقریباً چنین نتیجه‌ای را در جدول 5-3 نیز مشاهده می‌شود. مقادیر به دست آمده برای نسبت حلال‌ها به یکدیگر نیز تا حدودی قابل انتظار بود به طوری که با افزایش آن، تا حدودی پاسخ (غلظت) به حداکثر خود نزدیک شد. در مورد زمان نیز تا حدودی قابل انتظار بود، به طوری که در زمان 48 ساعت حداکثر راندمان را خواهیم داشت.



شکل 5-4- نتایج بهینه‌سازی شرایط استخراج

## 5-2- بهینه‌سازی استخراج کورکومین با استفاده از امواج فراصوت

در ابتدا جهت تعیین مناسب ترین مدل، جهت برآزش داده های آزمون صورت پذیرفت. بنابراین به ترتیب فاکتورهای مستقل به مدل افزوده و معنی داری آن ها در مدل مورد آزمون قرار گرفت. همان طور که در جدول 3، مشاهده می‌گردد مدلی که دارای اثرات خطی و متقابل متغیرهای



مستقل را دارد، در سطح معنی‌داری 0/05 می‌تواند بهترین مدل برای برازش داده‌های به دست آمده باشد.

جدول 4-5. آنالیز مدل‌های مورد استفاده جهت یافتن بهترین مدل برای پاسخ‌های مورد بررسی

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقادیر F	P
میانگین	348/0411	1	348/0411		
خطی	4/0557	3	1/3519	4/4821	0/0182
<b>2F</b>	2/0618	3	0/6873	3/2323	<b>0/0475</b>
درجه دوم	0/1000	3	0/0333	0/1251	0/9431
مکعب	0/6460	4	0/1615	0/4802	0/7509
باقیمانده	2/0181	6	0/3364		
کل	356/9227	20	17/8461		

جدول 5-5. آنالیز واریانس متغیرهای مدل میزان کورکومین استخراج‌شده و ضرایب پیشگویی مدل

منبع	درجه آزادی	ضرایب	جمع مربعات	F
مدل	6	4/1716	6/1175	4/7952
خطی				
$b_1$	1	0/6000	3/5997	16/9300
$b_2$	1	-0/0816	0/0665	0/3129
$b_3$		-0/1973	0/3894	1/8314
اثرات متقابل				
$b_{12}$	1	1/2533	0/5135	2/4147
$b_{13}$	1	-0/3507	0/9841	4/6282
$b_{23}$	1	-0/2656	0/5643	2/6539
باقیمانده	13		2/7641	
عدم برازش	8		1/0271	0/3696
خطا	5		1/7370	
کل	19		8/8816	
ضریب تبیین	0/9654			





0/9587	ضریب تبیین اصلاح شده
8/053	ضریب پراکندگی
2/9464	مجموع مربع های خطای پیش بینی شده

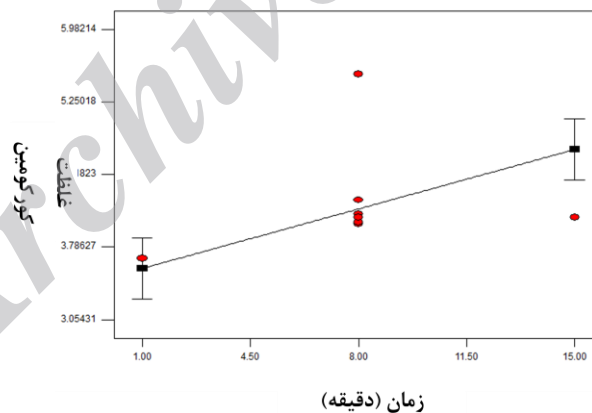
زمان، دما و توان دستگاه فراصوت به صورت خطی و اثرات متقابل بر میزان استخراج کورکومین اثر داشتند. نتایج جدول آنالیز واریانس (جدول 5-5) نشان داد که زمان به صورت خطی ( $p < 0/01$ ) اثر معنی دار داشت. شایان ذکر است که اثر متقابل زمان و توان دستگاه فراصوت نیز معنی دار بود ( $p < 0/05$ ).

اثر خطی زمان بر استخراج کورکومین به صورت خطی و مستقل در شکل 5-5، نشان داده شده است. با افزایش میزان فراصوت دهی مقدار کورکومین استخراجی افزایش می‌یابد. اثرات همزمان توان دستگاه فراصوت و زمان و دما بر میزان استخراج کورکومین در شکل‌های 5-6 و 5-7، نشان داده شده است. با افزایش زمان، میزان استخراج کورکومین افزایش نشان داد در حالی که با افزایش توان و دمای فرایند، در میزان استخراج کورکومین، کاهش مشاهده شد گرچه این کاهش در هیچ یک از سطح آماری معنی‌دار نبود ولیکن اثر کاهندگی توان فراصوت بیشتر مشاهده گردید.

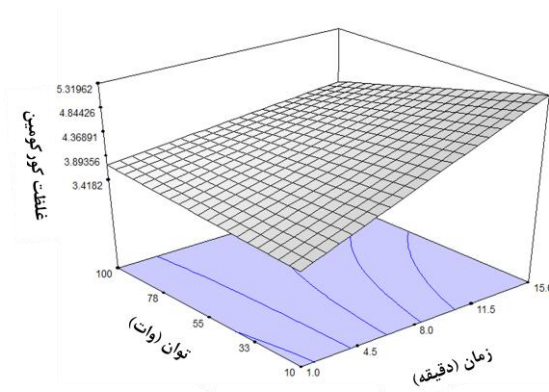
افزایش دما سبب افزایش ضریب نفوذ حلال و افزایش زمان نیز مدت زمان انتقال جرم را افزایش می‌دهد. در یک مطالعه، شرایط بهینه استخراج سلولز سیوس برنج بررسی گردید؛ بر این اساس، استفاده از زمان فراصوت 30 دقیقه بیشترین بازده را در راندمان استخراج داشت، این مسئله به دلیل تخریب دیواره سلولی و قابلیت خروج و در دسترس بودن بیشتر این ترکیبات بود؛ در مقابل زمان های 5-10 دقیقه افزایش معنی داری در روند استخراج در مقایسه با استخراج معمولی نداشت و لذا مستلزم به کارگیری شدت های صوتی بالاتر بود.

زانگ (2008)، از پروب مستقیم فراصوت در استخراج اپیمدین استفاده کرد؛ نتایج بررسی نشان داد، افزایش زمان فراصوت تا 20 دقیقه منجر به افزایش بازده استخراج شد اما به کارگیری زمان های بیشتر از 40 دقیقه منجر به ظهور روند کاهشی در پروسه استخراج شد (107).

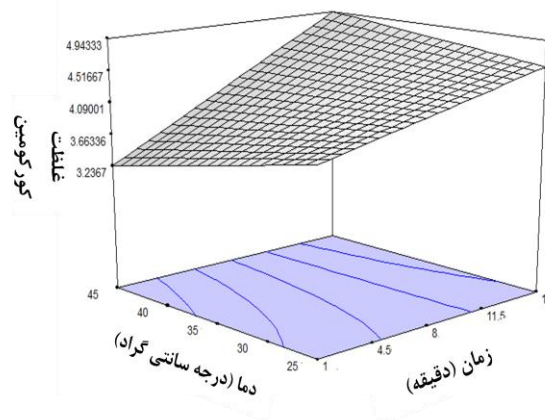
هررا و همکاران (2005) و همچنین پینلو و همکاران (2005) بیان داشتند که افزایش زمان استخراج به طور معنی‌داری بر روی میزان استخراج ترکیبات فنولیک از توت آسیاب شده و تفاله انگور موثر است. محققانی دیگر از جمله بیلماز (2004) و مانسی (2001) نیز در کارهای تحقیقاتی خود که روند استخراج ترکیبات فنولیک را بررسی می‌کردند بیان داشتند که در دماهای بالای 40 درجه سانتیگراد، کاهش در میزان استخراج ترکیبات فنولیک مشاهده شده است. همه این محققان دلیل این امر را واکنش‌های پلی‌مریزاسیون ترکیبات فنولیک با خودشان بیان نمودند (59).



شکل 5-5- اثر زمان و توان بر میزان استخراج کوکومین از ریزوم زردچوبه با استفاده از منحنی پاسخ سطحی.



شکل 5-6- اثر زمان و توان بر میزان استخراج کوکومین از ریزوم زردچوبه با استفاده از منحنی پاسخ سطحی.

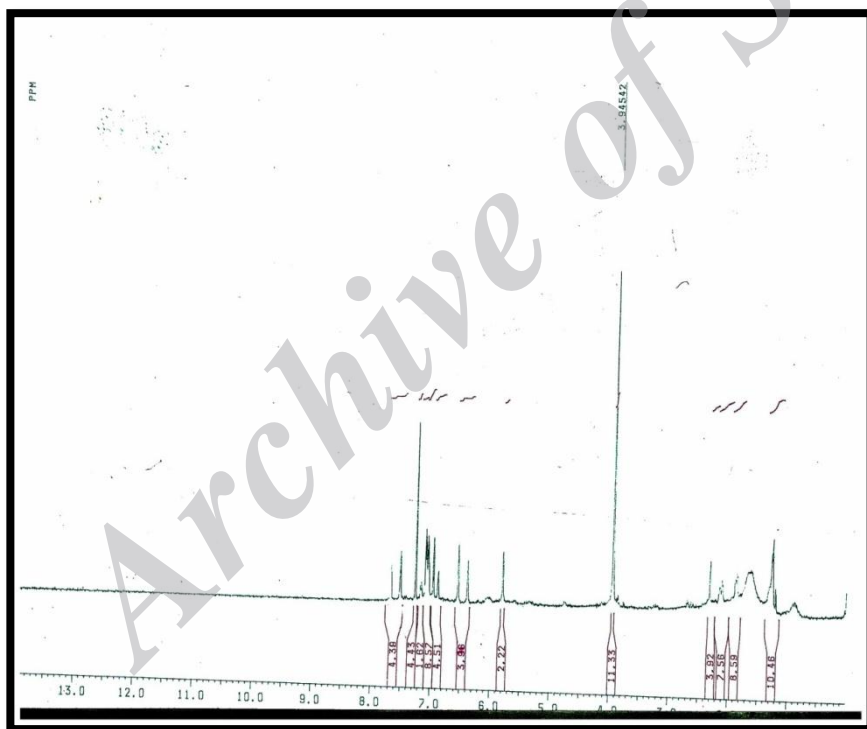


شکل 5-7- اثر زمان و دما بر میزان استخراج کوکومین از ریزوم زردچوبه با استفاده از منحنی پاسخ سطحی.

### 5-3- دستگاه طیف‌سنج NMR

طیف‌بینی NMR هم به منظور کارهای کمی و هم به منظور شناسایی کیفی مولکول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. هر چند که قدرت اصلی این دستگاه در شناسایی کیفی ترکیبات آلی و زیستی بسیار پیچیده است (74).

شکل 5-8- نمودار HNMR به دست آمده از طیف سنجی پودر کورکومین به دست آمده را نشان می‌دهد.



شکل 5-8- نمودار HNMR پودر کورکومین به دست آمده

#### 5-4- کروماتوگرافی لایه نازک<sup>1</sup>

کروماتوگرافی لایه نازک پرکاربردترین روش در صنایع داروسازی برای تمام اندازه‌گیری‌های مهم و تعیین درجه خلوص محصولات است.

شکل 5-9- TLC نمونه پودر کورکومین به دست آمده را نشان می‌دهد.



شکل 5-9- TLC نمونه پودر کورکومین

#### 5-5- نتیجه‌گیری و پیشنهادات

آنالیز رویه پاسخ با سه متغیر مستقل؛ شامل نسبت حلال به ماده جامد، نسبت حلال‌ها به یکدیگر و زمان، و یک پاسخ (غلظت) به منظور بررسی تاثیر شرایط استخراج کورکومین ریزوم زردچوبه و بهینه‌سازی فرآیند مذکور به انجام رسید. نتایج به دست آمده در این تحقیق حاکی از آن بودند که متدولوژی رویه پاسخ را می‌توان به خوبی در بهینه‌سازی این فرآیند به کار برد.

از میان شرایطی که برای استخراج کورکومین از ریزوم زردچوبه اعمال شد، مشخص شد که راندمان استخراج از نسبت حلال به ماده جامد و نسبت حلال‌ها به یکدیگر تاثیر می‌پذیرند، به

<sup>1</sup> TLC

طوری که نسبت حلال به ماده جامد به میزان بیشتری از نسبت حلال‌ها به یکدیگر تاثیر داشت و اثر زمان نسبت به دو فاکتور دیگر به میزان کمتری بود.

از نتایج به دست آمده می‌توان چنین برداشت نمود که استخراج کورکومین از ریزوم زردچوبه در کشور با توجه به هزینه بالای واردات آن و کاربرد وسیع آن در زمینه تغذیه‌ای، منطقی خواهد بود. بایستی اشاره نمود که هدف از انجام این تحقیق، به دست آوردن شرایط تاثیر گذار بر استخراج کورکومین از ریزوم زردچوبه به عنوان یک کار آغازین بود که به هر حال، انجام تحقیقات بیشتر در این رابطه ضروری جلوه می‌نماید.

#### 5-6- بهینه‌یابی

به منظور بهینه‌یابی شرایط استخراج کورکومین از پودر ریزوم زرد چوبه بر اساس تیمارهای فراصوت از ماکزیمم مقدار کورکومین استخراجی (4/17) استفاده گردید. نتایج نشان داد که با زمان صوت‌دهی، دمای فرایند و توان دستگاه فراصوت به ترتیب 8 دقیقه،  $35^{\circ}\text{C}$  و 55 درصد می‌توان بیشترین میزان کورکومین را از پودرهای ریزوم زردچوبه استخراج نمود. شایان ذکر است که در مقایسه با روش ماسراسیون، 1/5 درصد افزایش بازدهی در استخراج کورکومین رخ داد.



معاونت پژوهش و فناوری

بهینه‌سازی شرایط استخراج ....

فهرست منابع

Archive of SID

## فهرست منابع

- 1- آذر، م. 1380. تولید بتا کاروتن از گونه‌های مخمر *Rhodotorula*. دانشگاه امیرکبیر. مقاله علمی. 12 : 236-228.
- 2- استاندارد ملی به شماره 740. 1373. نشر موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.
- 3- اکبری، م. 1379. بررسی تولید بتا کاروتن از جبلک دونالیاسالینا. اولین کنگره بیولوژی کاربردی ایران.
- 4- آمارنامه اداره صنایع و معادن. 1387. انتشارات وزارت صنایع و معادن ایران.
- 5- امامی، ا. و ع، آهی. 1387. گیاه‌شناسی دارویی. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران.
- 6- پیروای ونک، ز. 1378. تولید رنگ بتا کاروتن با استفاده از میکرو ارگانیسم‌ها. اداره استاندارد. 10 : 27-32.
- 7- حسینی، ه. م. شابزاز و ش. اسدی نژاد. 1387. افزودنی های مجاز خوراکی ایران. انتشارات وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی معاونت غذا و دارو.
- 8- روحانی، ش.؛ حاجی قاسمی، ط. و سلیمی، ش. (1385) استخراج و آنالیز رنگدانه‌های موجود در ریشه گیاه زردچوبه. شانزدهمین کنگره ملی صنایع غذایی (گرگان-ایران، 23-24 فروردین).
- 9- زارع، د. 1380. گزارش طرح پژوهشی "بهینه‌سازی تولید بتاکاروتن با استفاده از قارچ بلاکسلاتریسپورا". پژوهشکده بیوتکنولوژی.
- 10- زند، ن. 1381. جایگزین کردن رنگ‌های طبیعی به جای رنگ مصنوعی در فرآورده حجیم شده برپایه ذرت. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه شهید بهشتی.
- 11- طاهرپور، آ. 1381. استخراج با خلوص بالا از خمیر هویج. هفدهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران، دانشکده فنی دانشگاه تهران.
- 12- غیاثی، ح.؛ جعفری، م. و مقصدلو، ی. (1390). مروری بر ویژگی، استخراج و مصرف رنگدانه چغندر قرمز. نخستین همایش فراملی بهینه سازی زنجیره تولید، توزیع و مصرف در صنایع غذایی (گرگان-ایران، 20-21 اردیبهشت).
- 13- مشرف بروجنی، ل. 1386. بررسی تولید رنگ خوراکی قرمز از چغندر لبوئی و پایداری آن در خلال فرآیندهای غذایی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان.
- 14- یوسفی سیاهگورابی، م. و وزیر، ع. (1390). بهینه‌سازی استخراج لیکوپن از ضایعات کارخانجات رب گوجه فرنگی به روش حلال. نخستین همایش فراملی بهینه سازی زنجیره تولید، توزیع و مصرف در صنایع غذایی (گرگان-ایران، 20-21 اردیبهشت).





- 15- Ahn, Ch. and Obendorf, S.K. 2006. GC-MS Analysis of Dyes Extracted from Turmeric. *Fibers and Polymers*, 7 (2): 158-163.
- 16- Ahsan, H.; Parveen, N.; Khan, N.U. and Hadi, S.M. 1999. Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Chemico-Biological Interactions*, 121: 161–175.
- 17- Akhtar, M.H. and Bryan, M. 2008. Extraction and quantification of major carotenoids in processed foods and supplements by liquid chromatography. *Food Chemistry*, 111: 255–261.
- 18- Atkinson, A.C., & Donev, A. 1992. Optimum experimental designs. Oxford University Press:132-189
- 19- Babu, S. and Shenolikar, I. 1995. Health and nutritional implications of food colours. *Indian Journal of Medical Research*, 102, 245-249.
- 20- Bas, D.; Boyanci, I.H. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78, 836-845.
- 21- Billmeyer, F.W. and M. Saltzman. 1981. Principles of Color Technology. John Wiley & Sons, New York.
- 22- Bridle P. and C. F. Timberlake. 1997. Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. *Food Chemistry*, 58: 103-109.



- 23-Caia, Y. Z., M. Sunb and H. Corke. 2005. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 370–376.
- 24-Carmen, S. 2008. Food Colorants Chemical and Functional Properties. CRC Press, Taylor & Francis Group. pp.551-583.
- 25-Carrubba, I. C. 2008. Vegetable Extracts as Natural Sources of Dyes. *ISHS Acta Horticulturae*. 457.
- 26-CFSAN/Office of Food Additive Safety. 2007. Food and Drug Administration (FDA). Color Additive Status List.
- 27-Chassagnez-Mendez, A.L.; Machado, N.T.; Araujo, M.E.; Maia, J.G. and Meireles, M.A. 2000. Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of Curcumins and Essential Oil from the Rhizomes of Turmeric (*Curcuma longa* L.). *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39: 4729-4733.
- 28-De Ancos, B., Iban E.Z, Reglero, G. and Pilar Cano, M. 2000. Frozen storage effects on anthocyanins and volatile compounds of raspberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 873–879.
- 29-Dean, A.; Voss, D. 2002. Design and analysis of experiments. Springer Verlag, New York. pp. 547-592.



- 30-Delgado Vargas, E., Jimenez, A.R., Paredes-Lopez, O. 2000. Natural pigments. Carotenoids, anthocyanins and betalains—characteristics, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3):173–289
- 31-Delgado, V. F. and P. L. Octavio. 2003. Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses/CRC Press.
- 32-Delgado-Vargas,F., Jimenez, A. R. and Paredes-LoPez, O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains – characteristics, biosynthesis, processing and stability, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40: 173–289.
- 33- Deman, J. M. 1925. Principles of Food Chemistry.
- 34- Demann, J. M. 1980. Principles of Food Chemistry. AVI Publishing Company, Westport, Connecticut.
- 35- Extraction of carotenoids from natural sources, United States Patent 5245095.
- 36- Fisher, J.F. and Rouseff, R.L. 1986. Solid-phase extraction and HPLC determination of  $\beta$ -cryptoxanthin and  $\alpha$  and  $\beta$ -carotene in orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34: 985–989.
- 37- Fraser, P.D. and Bramley, P.M. 2004. The biosynthesis and nutritional



- 38-Gaikar, V.G. and Dandekar, D.V. 2001. Process for extraction of curcuminoids from curcuma species. U.S. PATENT, US 6224877 B1.
- 39-Goel, A.; Kunnumakkara, B. and Aggarwal, B. 2008. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. *Biochemical pharmacology*, 75: 787–809.
- 40-Goldscher, K.J. 1979. Turmeric coloring process and composition for foods and beverages. U.S. PATENT, 4163803.
- 41-Gonzalez, Toma´ L. J. Coll-Marque´ s, E. Costell. 2008. Viscoelasticity of inulin–starch-based dairy systems. aInfluence of inulin average chain length. *Food Hydrocolloids*, 73:89.
- 42- Gonzalo,L.Alonso,M.Salinas,R.and Saez, J. R.(1998).Crosin as coloring in the food industry. *Agricultural & Food Chem*,2:141-253.
- 43-Green, C.L. 1995. Natural Colourants and Dyestuffs. 93-113.
- 44-Haghnazari, M., Freire, I, Pazos, C., 1999. Compositional diversity of the yacon storage root. In: Impact on a Changing World: Program Report 1997–98. International Potato Centre (CIP), Lima: 425–432.
- 45-Hendry, G.A.F. 1996. Natural pigments in biology, in Natural Food Colorants. G.A.F.Hendry and J.D. Houghton, Eds. Chapman & Hall, New



- 46-Henry, B. S. 1996. Natural Food Colours, in Hendry, G. A. F. and Houghton, J. D., Natural Colorants, 2nd edition Blackie, Glasgow, 40-79.
- 47- Hill, W.J.; Hunter, W.G. 1966. A review of response methodology: A literature survey, *Technometrics*. 8 (4): 571-590.
- 48-International Food Information Council (IFIC) and Foundation US Food and Drug Administration (FDA). 2004. Food ingredients and colors. Washington, DC. IFIC Foundation.
- 49-Joglekar,A.M., & May, .T. 1987. Product excellence through design of experiments, *Cereal Foods World*. 32: 857-868
- 50-Kakali, R., S. Gullapalli, U. R. Chaudhuri and R. Chakraborty. 2004. The use of a natural colorant based on betalain in the manufacture of sweet products in India. *International Journal of Food Science and Technology*. 39: 1087-1091.
- 51-Kaur, D.; Wani, A. A.; Oberoi, D. P. S. and Sogi, D.S. 2008. Effect of extraction conditions on lycopene extractions from tomato processing waste skin using response surface methodology. *Food Chemistry*, 108, 711-718.
- 52-Konczak, I. and W. Zhang. 2004. Anthocyanins-more than nature's



colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 101: 239-240.

53- Krinsky, N. I. 1989. Carotenoids and cancer in animal models. *Journal of Nutrition*, 119: 123-126.

54- Kyllonen, H. M. 2005. Membrane filtration enhanced by ultrasound: a review, *Desalination*, 181: 319-335.

55- Leshik. 1981. Stabilized curcumin colorant. *US patent No.* 4307117.

56- Li, J.; S. Ding and X. Ding. 2007. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. *Jinsixiaozao. Journal of Food Engineering*, (80) 1: 176-183.

57- Li, N. Lin, G. Kwan, Y.W. and Min, Z.D. 1999. Simultaneous quantification of five major biologically active ingredients of saffron by high performance liquid chromatography. *J. Chromatography A*, 849:349-355.

58- Lohachoompol, V.; Srzednicki, G. and Craske, J. 2004. The Change of Total Anthocyanins in Blueberries and Their Antioxidant Effect After Drying and Freezing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5:248-252.

59- Lou, Zaixiang. Wang. Hongxin, Danxi Wang, Yan Zhang. 2009. Preparation of inulin and phenols-rich dietary fibre powder from burdock root. *Carbohydrate Polymers*, 78: 666-671



60- MacDougall, D.B. Colour in Food, Improving Quality. CRC Press. New York.

61- Madsen, B.; Garcia, V.H.; Murcia, A and Vera, L.H. 2003. Purification process for improving total yield of curcuminoid colouring agent.. U.S. PATENT, US 6576273 B2.

62- Maing et al. 1981. Curcumin metal color complex. US *patent No.* 4263333.

63- Majeed, M. et. al. 1999. Bioprotectant composition, Method of use and extraction process of curcuminoids. U.S. PATENT, 5861415.

64- Markakis, P. 1982. Stability of Anthocyanins in Foods. Academic Press, New York.

65- Mason, T.J., Paniwynka, L. and Lorimer, J.P. 1996. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3: 253-260.

66- McCann, D., A. Barrett, A. Cooper, D. Crumpler, L. Dale., K. Grimshaw, E. Kitchin, K. Lok and L. Porteous. 2007. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*. 370(9598):1560-7.

67- Mead, R.; Pike, D.J. 1975. A review of response surface methodology



from a biometric viewpoint. *Journal of the Biometrics*, 31 (4): 803-851.

68- MedRes, I. J. 1995. Health and nutritional implications of food colours. 1: 9-245.

69- Mizubuti, I.Y.; Junior, O.B.; de Olivia souza, L.W.; dos Santos Ferreira da Silva, R.S.; Ida, E.I. 2000. Response surface methodology for extraction optimization of pigeon pea protein. *Food Chemistry*, 70: 259-265.

70- Myers, R.H.; Montgomery, D.C. 2002. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. 2<sup>nd</sup> Edition. Wiley, New York.

71- Nevado, J.J.B., Flores, J.R. and Llerena, M.J.V. 1994. Simultaneous determination of tartrazine, riboflavine, curcumin and erythrosine by derivative spectrophotometry. *Journal Analytical chemistry*, 350: 610-613.

72- Nichenametla, S. N., T. G. Taruscio, D. L. Barney and J. H. Exon. 2006. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Food Science and Nutrition*, 46: 161-183.

73- Povey, M.J.W.; Mason, T. J. 1998. Ultrasound in food processing. Blackie Academic, London p. 219.

74- Qin, N.Y.; Yang, F.Q.; Wang, Y.T. and Li, S.P. 2007. Quantitative determination of eight components in rhizome (*Jianghuang*) and tuberous root (*Yujin*) of *Curcuma longa* using pressurized liquid extraction and gas





chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43: 486–492.

75-Quahong, L. and F. Caili. 2005. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food Chemistry*, 92: 701–706.

76-Quintanilla Almagro, E. and Diaz Alperi, J. (2002). Method for obtaining apolar and polar extracts of curcuma and applications thereof. U.S. PATENT, US 6440468 B1.

77-Quiros A. R. B. and Costa H.S. (2006). Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 97–111.

78-Ravindran, P.N., Nirmal Babu, K., Sivaraman, K. 2007. Turmeric: the genus Curcuma. Taylor & Francis Group, LLC. Pp.257-368.

79-Rich, D.C. 1998. Artificial intelligence in today's colorant management systems. *Cereal Foods World*, 43: 415–417.

80-Roy, K.; Gullapalli, S.; Roy Chaudhuri, U. and Chakraborty, R. 2004. The use of a natural colorant based on betalain in the manufacture of sweet products in India. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 1087–1091.

81-Sair, L.; Park, E.; Klee, L. 1967. Extracting values from turmeric. U.S. PATENT, 3340250.



82-Schranz. 1983. Water - soluble curcumin complex. *US patent No.* 4368208.

83-Scotter, M.J. 2009. Synthesis and chemical characterisation of curcuminoid colouring principles for their potential use as HPLC standards for the determination of curcumin colour in foods. *LWT - Food Science and Technology xxx.*, 1-7.

84-Sharma, R.A., Gescher, A.J. and Steward, W.P. 2005. Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer.*, 41: 1955-1968.

85-Sheeja, T.T., Krishna, M., Indira K.P., Kallikat N. R., Bharat B.A. 2008. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature, *biochemical pharmacology*; 76 (11):1590 – 1611.

86-Socaciu, C .(2008).*Food Colorants Chemical and Functional Properties*.CRC Press. New York.

87-Somboonpanyakul, P. Wang, Q. Cui, W. Barbut, S. Jantawat, P.2005. Malva nut gum. (Part I): Extraction and physicochemical characterization. *Carbohydrate polymers*, 64: 247-253.

88-Sowbhagya, H. B. and S. R. Sampathu, N. Krishnamurthy. 2004. Natural colorant from marigold-chemistry and technology. *Food Reviews International*, 20 : 33-50.

89-Sowbhagya, H.B.; Smitha, S.; Sampathu, S.R.; Krishnamurthy, N. and



Bhattacharya, S. 2005. Stability of water-soluble turmeric colourant in an extruded food product during storage. *Journal of Food Engineering*, 67, 367–371.

90- Stintzing, F. C. and R. Carle. 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 15: 19–38.

91- Stransky. 1979. Process for producing water and oil soluble curcumin coloring agent. *US patent No.* 4138212.

92- Taungbodhitham, A. k.; Jones, G.P.; Wahlqvist, M. L. and Briggs, D.R. (1998). Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 63 (4): 577-584.

93- U. S. Food and Drug Administration. FDA/IFIC Brochure. 1993. Food Color Facts.

94- Verghese, J. 1993. Isolation of Curcumin from *Curcuma longa* L. Rhizome. *Flavour and Fragrance Journal*, 8: 315-319.

95- Vilkhua, Kamaljit, Mawsona, Raymond, Lloyd Simonsa and Darren Bates. 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry-A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2): 161-169.

96- Von Goethe, J.W. (1997). *Theory of Colours*. MIT Press, Cambridge ,



97- Wissgott, U and K. Bortlik. 1996. Prospects for new natural food colorants. Trends in Food Science and Technology. 71: 298-302.

98- Wongsakorn, P. 1985. Extraction of dyes from turmeric by circulating solvent systems. Chiang Mai (Thailand).

99- [www.Alibaba.com](http://www.Alibaba.com)

100- [www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/index.htm](http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/index.htm)

101- [www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/search.html?lang=en](http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/search.html?lang=en)

102- [www.fdo.ir](http://www.fdo.ir)

103- [www.irica.gov.ir/Persian/AmarView/MonthView.aspx](http://www.irica.gov.ir/Persian/AmarView/MonthView.aspx)

104- [www.isiri.org](http://www.isiri.org)

105- [www.whattoeatbook.com/2007/09/07/food-additives-and-hyperactivity-again](http://www.whattoeatbook.com/2007/09/07/food-additives-and-hyperactivity-again)

106- [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)

107- Zhang, J.S.; Guan, J.; Yang, F.Q.; Liu, H.G.; Cheng, X.J. and Li, S.P. (2008). Qualitative and quantitative analysis of four species of Curcuma rhizomes using twice development thin layer chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 48, 1024–1028.



### **Abstract:**

There are several reports in the literature indicating a variety of pharmacological activities of turmeric, such as anti-inflammatory, anti-human immunodeficiency virus, antimicrobial, antioxidant, antiparasitic, antimutagenic and anticancer.

Curcumin is widely used in functional foods throughout the world for its health-promoting & technological properties. In this thesis, to optimize conventional extraction of curcumin with solvent & maceration method is used. In this research, response surface methodology (RSM) & central composite design (CCD) methods were used. In order to investigate the effect of solvent-solid ratio, ratio of solvents on each other and time on curcumin extraction.

The results show that solvent-solid ratio, ratio of solvents on each other and time, respectively are the most effective factors on the extraction of curcumin.

Based on the experiments, the optimal conditions to extract curcumin for the maximum yield (3.80739) are as follows: solvent-solid ratio (2), acetone ratio (100%) and time (48 hrs).

Ultrasound has attracted considerable interest in food science and technology. Due to its promising effects in food processing and preservation. Sonication increased the efficiency of extraction at lower temperatures producing a purer product in a shorter time. The objective of



this study was to develop a set of optimum extraction conditions for Turmeric with an aim towards improving curcumin extraction yield. To optimise ultrasound-assisted extraction of curcumin, various combinations were used. The independent variables for ultrasound extraction were sonication amplitude (10–100%), sonication temperature (25–45 C) and sonication time (1–15 min) while for conventional extraction. It was shown that increasing the amplitude and

extraction time increased the extraction yield. Optimum extraction condition was found to be sonication time: 8 min, sonication amplitude 55% and temperature: 35 °C.

**Keywords:** Turmeric, extraction, high intensity ultrasound, curcumin, response surface methodology

Archive of SID



**The Final Project Report:**

**Optimization of curcumin extraction from turmeric rhizomes by ultrasonic technique and its comparison with ordinary method ( maceration )**

**Funded by:**

Food Science and Technology Research Institute  
ACECR

Shadi Bolourian

**2014**