جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تاثیر شرایط عصاره‌گیری به کمک فراصوت بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از میوه سنجد زینتی (*Elaeagnus umbellate*)

فائزه کمالی [a]، علیرضا صادقی ماهونک [b*]، زهرا نصیری فر [a]

[a] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران
[b] عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۷/۱۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۸/۳۰

چکیده

مقدمه: گیاهان منبع غنی از ترکیبات فنلی (اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها و تانن‌ها) هستند که مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به شمار می‌آیند. هدف از تحقیق حاضر بررسی تاثیر دو شیوه استخراج با فراصوت اعم از پروب و حمام، بر میزان استخراج ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی و قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH از میوه سنجد زینتی با استفاده از سه حلال استخراجی آب، متانول۸۰٪ و اتانول۷۰٪ بود.

مواد و روش‌ها: در دو روش حمام و پروب فراصوت از سه حلال مختلف آب، متانول۸۰٪ و اتانول ۷۰٪ در زمان‌های مختلف ۳۰، ۶۰، ۹۰ دقیقه (برای حمام اولتراسوند) و ۵، ۱۰، ۲۰ دقیقه (برای پروب اولتراسوند) استفاده شد و در نهایت میزان کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره‌ها به ترتیب با روش فولین سیوکالتیو و روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید تعیین شدند.

یافته‌ها: براساس نتایج، در روش استخراج با پروب فراصوت، حلال اتانول۷۰٪ و زمان ۲۰ دقیقه بیشترین میزان ترکیب‌های فنولی (۰/۰۵±۱۳/۸ میلی گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک) و قدرت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH (۹۸/۹۴٪) را نشان داد. در روش استخراج به کمک حمام فراصوت حلال اتانول ۷۰٪ در زمان ۹۰ دقیقه بالاترین میزان ترکیب‌های فنولی (۰/۰۵۷±۱۵/۸۲ میلی گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک) و فلاونوئیدی (۰/۱۱۰±۷/۰۹ میلی گرم معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک) را استخراج کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که استخراج به کمک پروب و حمام فراصوت تاثیر متفاوتی در میزان استخراج ترکیبات زیست فعال گیاه سنجد زینتی داشت. در هر روش استخراج، میزان استخراج ترکیبات زیست فعال بسته به نوع حلال متفاوت بود و در تمامی روش‌های استخراج حلال اتانول ۷۰٪ بهترین حلال برای استخراج ترکیبات مورد نظر بود.

واژه‌های کلیدی: *استخراج، ترکیبات فنولی، سنجد زینتی، فراصوت*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: sadeghiaz@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

در طی سال‌های اخیر مصرف میوه‌ها و سبزی‌ها به دلیل اثرمثبت آن‌ها بر روی سلامتی انسان، افزایش یافته است. میوه‌ها سرشار از ترکیبات ضد اکسایش هستند که منجربه کاهش بروز بیماری‌های مزمن مانند سرطان، آرتروز، تصلب شرائین، بیماری‌های قلبی و التهاب و اختلال عملکرد مغز می‌شوند (Ksouri *et al*., 2009). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که با جذب رادیکال آزاد و ممانعت از ادامه اکسیداسیون از فساد، تغییر رنگ یا تند شدن چربی‌ها جلوگیری می‌کنند. به خصوص آنتی‌اکسیدان‌هایی که بنیان حلقوی فنلی حاوی گروه OH را دارا می‌باشند نقش مهمی در جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌ها دارند (Mahdavi *et al*., 1995). در سالیان اخیر افزودن آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی به دلیل سمیت و خطراتی که در سلامتی انسان ایجاد می‌کنند محدود شده است (Weisburger, 1999). بنابراین در طی این سال‌ها تلاش برای شناخت آنتی اکسیدان‌های طبیعی خصوصا با منشا گیاهی افزایش یافته است. نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بعضی از سبزی‌ها و میوه‌ها به طور گسترده به محتوای کل ترکیبات فنولی آن‌ها وابسته است. با اینکه فرآیندهای استخراج ترکیبات فنولی، یک فاکتور اصلی در خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره است اما دما، قدرت استخراج کنندگی حلال، زمان و روش اتخاذ شده برای استخراج به طور قابل توجهی ترکیب عصاره را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Betancourt, 2008). این تغییر پذیری به تفاوت در پیوندهای درونی این ترکیبات و به خصوص به قطبیت مولکول‌های تشکیل دهنده حلال بستگی دارد. به همین جهت در فرآیند استخراج عواملی چون نوع حلال و زمان استخراج بسیار مهم هستند (Hayouni *et al*., 2007). به علاوه، استخراج مولکول‌ها از مواد بیولوژیک توسط روش‌های معمول به عنوان مثال غرقابی، نیاز به صرف زمان طولانی و مقدار حلال زیادی دارند بنابراین نیاز به روش‌های استخراج جدید با زمان استخراج کوتاه‌تر، مصرف حلال آلی کمتر و ایجاد آلودگی کمتر، افزایش یافته است (Betancourt, 2008). روش‌های استخراج جدید مانند استخراج به کمک فراصوت و استخراج به کمک مایکروویو از روش‌های سریع و موثر برای استخراج ترکیب‌های موثره از بافت گیاهی هستند (Wang *et al*., 2006). امروزه استفاده از امواج فراصوت با توجه به اثرات موثر آن در نگهداری و فرآیند مواد غذایی رو به گسترش می‌باشد. اثرات مکانیکی امواج فراصوت و پدیده کاویتاسیون ایجاد شده در اثر این امواج، سبب افزایش نفوذ پذیری حلال به داخل سلول‌های گیاهی، افزایش انتقال جرم و به دنبال آن افزایش بازدهی استخراج در دماهای پایین‌تر می‌شود (Vinatoru, 2001). سیستم‌های پروب و حمام دو روش رایج استفاده از امواج فراصوت هستند. در پروب فراصوت نمونه به طور مداوم در تماس با پروب قرار می‌گیرد و قابلیت تکرارپذیری کمی دارد. علاوه بر این، خطر آلودگی نمونه و تولید کف بیشتر است اما حمام فراصوت می تواند بر طیف وسیعی از نمونه‌ها به طور همزمان عمل کند و قابلیت تکرار پذیری بالایی دارد (Luque-Garcia & Luquede Castro, 2003).

سنجد زینتی(*Elaeagnus umbellate*) متعلق به خانواده *Elaeagnaceae* و جزو درختان برگ‌ریز است و در کشورهای پاکستان، هند، افغانستان، چین به صورت فراوان یافت می‌شود (Ahmad *et al*., 2006). بخش خوراکی این گیاه میوه و دانه آن است که میوه آن گوشتی و آبدار و غنی از ویتامین‌ها، اسیدهای چرب ضروری، مواد معدنی، فلاونوئیدها و کاروتنوئید است (Parmar & Kaushal, 1982). میزان لیکوپن موجود در میوه سنجد زینتی ۷ تا ۱۷ بار بیشتر از لیکوپن موجود در گوجه فرنگی است (Fordham *et al*., 2001) که این ترکیب به طور گسترده‌ای از بروز انواع مختلف سرطان جلوگیری می‌کند. در این مطالعه اثر نوع حلال و زمان‌های مختلف در دو روش استخراج به کمک حمام و پروب فراصوت، بر میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی از میوه سنجد زینتی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

– مواد

میوه سنجد زینتی مورد استفاده در این تحقیق در آذر ماه ۱۳۹۱ از محوطه دانشگاه منابع طبیعی گرگان جمع‌آوری گردید. میوه‌ها پس از شستشو و خشک کردن درآون با دمای۴۰ درجه سانتی‌گراد، توسط آسیاب صنعتی (توس شکن، مدل تی ۳۸۰۰)، به صورت پودر درآمدند. نمونه‌های پودر شده تا زمان آزمایش در یخچال با دمای ۴

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

درجه سانتیگراد نگهداری شدند. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده دارای خلوص بالایی بوده و از شرکت مرک تهیه شدند.

- استخراج به کمک حمام فراصوت

به منظور بررسی اثر حلال، عملیات استخراج با حلال‌هایی با قطبیت متفاوت انجام شد. در این روش حلال‌های آب، متانول۸۰٪ و اتانول ۷۰٪ به طور جداگانه با نمونه‌های ۳ گرمی پودر خشک شده سنجد زینتی به نسبت ۱:۶مخلوط شدند و بعد مخلوط‌های بدست آمده در یک حمام اولتراسوند (35 Starsonic) برای زمان‌های مختلف (۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه) در معرض امواج فراصوت (فرکانس ۲۸-۳۴ کیلوهرتز) قرار گرفتند. سپس عصاره‌های استخراج شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک از مواد جامد گیاهی جدا گردید (Martino *et al.*, 2006). عصاره به دست آمده به وسیله تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء (IKA-RV05 Basic ساخت آلمان) در دما ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و در نهایت توسط خشک‌کن انجمادی (Operun-FDB550 ساخت کره جنوبی) در دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد، خشک و به پودر تبدیل شدند. پودرهای فنولی به دست آمده تا زمان استفاده در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا و رطوبت در فریزر با دما ۱۸- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

- استخراج با پروب فراصوت

در این فرآیند استخراج، از پروب فراصوت (مدل Dr. Hilscher)، با قطر پروب ۲/۵ سانتی‌متر و دامنه نوسان[1] ۲۰٪ و نسبت حلال به نمونه ۱:۶استفاده شد (Ince *et al.*, 2012). ابتدا به پودرهای خشک شده سنجد زینتی حلال مورد نظراضافه شده و سپس هر کدام از حلال‌های آب، اتانول ۷۰٪ و متانول ۸۰٪ به طور جداگانه تحت امواج فراصوت برای زمان‌های مختلف (۵، ۱۰، ۲۰ دقیقه) قرار گرفتند. در نهایت عصاره‌های استخراج شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک از مواد جامد گیاهی جدا گردید و عصاره به دست آمده به وسیله تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء (IKA-RV05 Basic ساخت آلمان) در دما ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و در نهایت توسط خشک کن انجمادی (Operun-FDB550 ساخت کره جنوبی) در دمای ۵۰- درجه سانتیگراد، خشک و به پودر تبدیل شدند. پودرهای فنولی به دست آمده تا زمان استفاده در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا و رطوبت در فریزر با دما ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

- اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی

مقدار کل ترکیبات فنولی با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد (Slinkard & Singleton, 1977). به طور خلاصه ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۱/۱۶۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد. بعد از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم۲۰٪ به آن‌ها افزوده شد. لوله‌های آزمایش بعد از تکان دادن، درون حمام آب با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (S 2000 UV/VIS) در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک استفاده شد. میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره بر حسب معادل اسید گالیک و با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر حسب میلی گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره بیان شد.

مقدار کل ترکیب‌های فلاونوئیدی هر عصاره به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید انجام شد (Chang *et al.*, 2002). ۰/۵ میلی لیتر از عصاره درون لوله آزمایش در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰٪ و ۰/۱ میلی لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار به آن اضافه شد. در نهایت ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر به آنها اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. مقدار فلاونوئید براساس میزان میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم نمونه خشک گزارش شد (Chang *et al.*, 2002).

- میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH[2]

[1] Amplitude

[2] 2 2-Diphenyl-1- picrylhydrazhyl

اندازه‌گیری توانایی عصاره در مهار رادیکال های آزاد به این صورت انجام شد که یک میلی‌لیتر از محلول متانولیDPPH (با غلظت ۰/۱ میلی مولار) به ۳ میلی لیتر از عصاره افزوده و مخلوط به دست آمده به شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید که در آن، Ac و As به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند (Arabshahi-Delouee & Urooj, 2007). نمونه کنترل حاوی ۳ میلی‌لیتر متانول به همراه ۱ میلی‌لیتر معرف DPPH بود.

درصد مهار رادیکال آزاد $= (AC - AS)/AC \times 100$

- **تجزیه و تحلیل آماری**

در روش‌های اندازه گیری ترکیبات فنولی کل، میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد و میزان ترکیبات فلاونوئیدی کل، مقایسه میانگین‌های به دست آمده از سه تکرار با آزمون دانکن ($P<۰/۰۵$) بر پایه طرح کاملا تصادفی مورد بررسی گرفت. نرم افزار مورد استفاده برای تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها SPSS بود.

یافته‌ها

- **روش استخراج به کمک حمام فراصوت**

با بررسی نتایج آنالیز واریانس و نیز مقایسه میانگین مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH تیمارهای مختلف مشاهده شد که اثرات اصلی سطوح مختلف پارامترهای حلال و زمان و همچنین اثرات متقابل حلال و زمان در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بودند (جداول ۱، ۲ و ۳). درسطوح مختلف زمان مورد استفاده، اختلاف معنی‌داری میان سه زمان ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه مشاهده شد و زمان ۳۰دقیقه کمترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی و مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را نشان داد (جدول ۱). در بین حلال‌های مصرفی اتانول و آب به ترتیب بیشترین و کمترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی و مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را نشان دادند (جدول ۲). نتایج نشان داد که افزایش زمان تا ۹۰ دقیقه باعث افزایش میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی می‌گردد.

در بررسی اثر متقابل نوع حلال و زمان استخراج (جدول ۳)، تیمار اتانول ۷۰ درصد در طی زمان۹۰ دقیقه با ۱۵/۸۲ ±۰/۰۵۷ میلی‌گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی را داشت که از لحاظ آماری با اتانول ۶۰ و ۳۰ و همچنین متانول ۸۰ – ۹۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری داشت و کمترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی نیز مربوط به آب ۳۰ دقیقه با ۶/۳۵±۰/۰۹۶ میلی گرم معادل اسیدگالیک به گرم نمونه خشک بود. بین زمان‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بنابراین می‌توان گفت که استفاده از اتانول به عنوان حلال استخراجی در روش استخراج به کمک حمام فراصوت و افزایش زمان استخراج از ۳۰ تا ۹۰ دقیقه، تأثیر معنی‌داری در میزان استخراج ترکیب‌های فنولی خواهد داشت. در مورد ترکیب‌های فلاونوئیدی نیز در مقایسه سه نوع حلال مصرفی (اثر اصلی)، بیشترین مقدار استخراج ترکیب‌های فلاونوئیدی مربوط به حلال اتانول بود که با حلال‌های آب و متانول ۸۰ ٪ تفاوت معنی‌داری از نظرمیزان استخراج داشتند (جدول ۲). در بررسی اثر اصلی سطوح مختلف زمان مشاهده شد که تا زمان۹۰ دقیقه افزایش معنی‌داری در میزان استخراج ترکیب‌های فلاونوئیدی در سطح احتمال ۵٪ بوجود می‌آید (جدول۱).

در بررسی اثر متقابل حلال در زمان (جدول ۳)، تیمارهای آب– ۳۰ دقیقه و اتانول – ۹۰ دقیقه به ترتیب با ۱/۵۴±۰/۰۰۹ و ۷/۰۹±۰/۱۱۰ معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک، کمترین و بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فلاونوئیدی را در بین تیمارهاداشتند. همچنین تفاوت معنی‌داری میان تیمارهای آب ۳۰ دقیقه وآب – ۶۰ دقیقه در سطح احتمال پنج درصد مشاهده نشد. در بین سه نوع حلال مورد استفاده، بیشترین و کمترین مقدار مهار رادیکال‌هایDPPH به ترتیب مربوط به اتانول۷۰٪ و آب بود. بین سه حلال اختلاف معنی‌داری از این نظر وجود داشت (جدول ۲). در بررسی زمان‌های مختلف (اثر اصلی) بیشترین میزان مهار رادیکال‌هایDPPH مربوط به زمان۹۰ دقیقه و کمترین مربوط به زمان استخراج ۳۰دقیقه بود (جدول۱).

در بررسی اثر متقابل حلال و زمان استخراج (جدول ۳)، تیمارهای آب – ۳۰ دقیقه و اتانول۷۰ – ۹۰ دقیقه به ترتیب بـــا۵۳/۷۶±۴/۰۳۲ و۸۶/۵۳±۰/۶۹۸ درصـــد، کمتـــرین و بیشـترین میـزان مهـار رادیکـال‌هـای DPPH را در بـین تیمارها داشتند. همچنین تفاوت معنی‌داری میان تیمارهـای آب ۳۰ دقیقه وآب – ۶۰ دقیقه در سطح احتمال پنج درصد مشاهده نشد.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر زمان‌های مختلف بر روی میزان استخراج ترکیب های فنولی و فلاونوئیدی و مهار رادیکال های آزاد DPPH در روش استخراج به کمک حمام فراصوت

تیمار (زمان (دقیقه))	میانگین		
	ترکیبات فنولی (mg GAE/g dry sample	ترکیبات فلاونوئیدی (mg QE/g dry sample)	مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (%)
۳۰	۷/۹۵ ^{c}	۲/۸۱^{c}	۶۵/۴۴^{c}
۶۰	۹/۶۰^{b}	۳/۷۱^{b}	۷۴/۹۴^{b}
۹۰	۱۲/۶۸^{a}	۴/۶۷^{a}	۷۷/۶۶^{a}

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد است.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر نوع حلال مصرفی در میزان استخراج ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی و مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در روش استخراج به کمک حمام فراصوت

تیمار (حلال مصرفی)	میانگین		
	ترکیبات فنولی (mg GAE/g dry sample)	ترکیبات فلاونوئیدی (mg QE/g dry sample)	مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (%)
آب	۷/۲۸^{c}	۱/۷۹^{c}	۶۰/۹۸ ^{c}
متانول ۸۰٪	۱۰/۳۳ ^{b}	۳/۷۶ ^{b}	۷۴/۷۰ ^{b}
اتانول ۷۰٪	۱۲/۶۲^{a}	۵/۶۵^{a}	۸۲/۳۵^{a}

حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد است.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع حلال و زمان‌های مختلف در میزان استخراج ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی و مهار رادیکال های آزاد DPPH در روش استخراج به کمک حمام فراصوت

تیمار (حلال-زمان)	میانگین		
	ترکیبات فنولی (mg GAE/g dry sample)	ترکیبات فلاونوئیدی (mg QE/g dry sample)	مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (%)
آب– ۳۰	۶/۳۵±۰/۰۹۶^{j}	۱/۵۴±۰/۰۰۹^{hi}	۵۳/۷۶±۴/۰۳۲^{i}
آب – ۶۰	۷/۰۱±۰/۰۴۶^{gi}	۱/۷۷±۰/۰۱۹^{gh}	۶۱/۹۱±۱/۳۸۶^{h}
آب – ۹۰	۸/۴۸±۰/۰۳۸^{f}	۲/۰۵±۰/۰۲۱^{g}	۶۷/۲۸±۰/۰۴۱^{f}
متانول ۸۰– ۳۰	۷/۶۸±۰/۱۸۱^{fg}	۲/۸۵±۰/۰۲۵^{f}	۶۶/۵۰±۰/۴۲۷^{g}
متانول ۸۰ – ۶۰	۹/۵۶±۰/۰۱۲^{de}	۳/۵۷±۰/۰۴۹^{de}	۷۸/۴۵±۰/۳۰۹^{d}
متانول ۸۰ – ۹۰	۱۳/۷۵±۰/۲۲۷^{b}	۴/۸۵±۰/۰۲۴^{c}	۷۹/۱۶±۰/۴۳۱^{c}
اتانول ۷۰– ۳۰	۹/۸۲±۰/۶۰۷^{d}	۴/۰۷±۰/۰۱۰^{d}	۷۶/۰۶±۰/۵۰۳^{e}
اتانول ۷۰ – ۶۰	۱۲/۲۳±۰/۱۲۰^{c}	۵/۷۹±۰/۰۷۸^{b}	۸۴/۴۵±۱/۱۴۶^{b}
اتانول ۷۰ – ۹۰	۱۵/۸۲±۰/۰۵۷^{a}	۷/۰۹±۰/۱۱۰^{a}	۸۶/۵۳±۰/۶۹۸^{a}

میانگین های اثر متقابل حلال×زمان دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد هستند.

- روش استخراج به کمک پروب فراصوت

با بررسی نتایج آنالیز واریانس و نیز مقایسه میانگین مقدار کل ترکیبات فنولی تیمارهای مختلف، مشاهده شد که اثرات اصلی سطوح مختلف پارامترهای حلال و زمان و همچنین اثرات متقابل حلال و زمان در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بودند (جداول۴، ۵ و ۶). در بین حلال‌های مصرفی (اثر اصلی) اتانول و آب به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار کل ترکیب های فنولی را دارا بودند (جدول ۵). همچنین درسطوح مختلف زمان (اثر اصلی)، اختلاف معنی داری میان سه زمان ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه مشاهده شد و زمان ۵دقیقه کمترین میزان ترکیب‌های فنولی را نشان داد (جدول ۴). نتایج نشان داد که افزایش زمان تا ۲۰ دقیقه باعث افزایش مقدار ترکیب‌های فنولی گردید.

در بررسی اثر متقابل حلال در زمان(جدول ۶)، تیمار اتانول ۷۰ —۲۰ دقیقه با ۱۳/۷۸۶±۰/۰۵۷میلی گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی را داشت که از لحاظ آماری با اتانول ۱۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و کمترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی نیز مربوط به آب ۵ دقیقه با ۸/۴۶۴±۰/۳۰۳ میلی گرم معادل اسیدگالیک به گرم نمونه خشک بود. بنابراین می توان گفت که در صورت استفاده از اتانول به عنوان حلال استخراجی در روش استخراج به کمک فراصوت، افزایش زمان استخراج از تا ۱۰ دقیقه، تأثیر معنی‌داری در میزان استخراج ترکیب های فنولی دارد ولی افزایش زمان تا ۲۰ دقیقه دارای اثر معنی‌داری نبود.

در مورد ترکیب‌های فلاونوئیدی نیز در سه نوع حلال مصرفی (اثر اصلی)، بیشترین مقدار کل ترکیب‌های فلاونوئیدی مربوط به حلال اتانول بود که با حلال‌های آب و متانول ۸۰ ٪ تفاوت معنی‌داری از نظر میزان استخراج داشتند (جدول ۵). در بررسی اثر اصلی سطوح مختلف زمان مشاهده شد که میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی تا زمان ۲۰ دقیقه افزایش یافته بود و تا زمان ۲۰ دقیقه افزایش معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ نشان داد (جدول ۴). در بررسی اثر متقابل حلال در زمان(جدول ۶)، اثر معنی‌داری در استخراج فلاونوئید مشاهده نشد. تیمارهای آب ۵دقیقه و اتانول۲۰دقیقه به ترتیب با ۱/۱۰۵±۰/۰۶۶و ۳/۳۴۵±۰/۰۵۶ معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک، کمترین و بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فلاونوئیدی را در بین تیمارها داشتند. همچنین تفاوت معنی‌دار میان تیمارهای آب ۵ دقیقه و آب۱۰ دقیقه در سطح احتمال پنج درصد مشاهده نشد.

جدول ٤- مقایسه میانگین اثر زمان‌های مختلف بر روی میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی و مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در روش استخراج به کمک پروب فراصوت

تیمار (زمان (دقیقه))	میانگین		
	ترکیبات فنولی (mg GAE/g dry sample)	ترکیبات فلاونوئیدی (mg QE/g dry sample)	مهار رادیکال های آزاد DPPH (%)
۵	۱۰/۰۴۵[c]	۱/۶۵[c]	۹۳/۸۳۷[c]
۱۰	۱۱/۸۲۹[b]	۲/۱۲۴[a]	۹۴/۹۸۱[b]
۲۰	۱۲/۶۲۹[a]	۲/۷۷۹[a]	۹۵/۴۳۲[a]

حرف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد است

جدول ٥- مقایسه میانگین اثر نوع حلال مصرفی در میزان استخراج ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی و مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در روش استخراج به کمک پروب فراصوت

تیمار (حلال مصرفی)	میانگین		
	ترکیبات فنولی (mg GAE/g dry sample)	ترکیبات فلاونوئیدی (mg QE/g dry sample)	مهار رادیکال های آزاد DPPH (%)
آب	۱۰/۱۴۶[c]	۱/۵۷۵[c]	۹۱/۴۴۶[c]
متانول ۸۰٪	۱۱/۲۱۶[b]	۲/۲۰۴[a]	۹۴/۹۸۱[b]
اتانول ۷۰٪	۱۳/۱۴۰[a]	۲/۷۸۰[a]	۹۵/۴۳۲[a]

حرف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد است.

جدول ٦- مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع حلال و زمان‌های مختلف در میزان استخراج ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی و مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در روش استخراج به کمک پروب فراصوت

تیمار (حلال-زمان)	میانگین		
	ترکیبات فنولی (mg GAE/g dry sample)	ترکیبات فلاونوئیدی (mg QE/g dry sample)	مهار رادیکال های آزاد DPPH (%)
آب – ۵	۸/۴۶۴±۰/۳۰۳^{j}	۱/۱۰۵±۰/۰۶۶^{hi}	۹۰/۶۲۴±۰/۴۴۲^{i}
آب – ۱۰	۱۰±۰/۱۶۷^{h}	۱/۵۴۶±۰/۱۳۷^{gh}	۹۱/۶۳۴±۰/۲۳۳^{h}
آب – ۲۰	۱۱/۷۹۴±۰/۳۳۶^{efg}	۲/۰۷۵±۰/۰۵۶^{ef}	۹۲/۰۸۲±۰/۰۷۷^{fg}
متانول ۸۰ –۵	۹/۵۴۴±۰/۳۰۲^{i}	۱/۵۵۸±۰/۳۳۸^{fg}	۹۲/۴۳۹±۰/۳۲۳^{f}
متانول ۸۰ –۱۰	۱۱/۷۹۸±۰/۴۴۹^{ef}	۲/۱۳۶±۰/۱۵۴^{de}	۹۴/۶۱۹±۰/۲۳۵^{e}
متانول ۸۰ – ۲۰	۱۲/۳۰۸±۰/۱۸۴^{c}	۲/۹۱۸±۰/۰۴۱^{ab}	۹۵/۲۷۰±۰/۱۲۶^{d}
اتانول ۷۰ –۵	۱۱/۹۴۵±۰/۳۴۰^{de}	۲/۳۰۳±۰/۱۶۱^{cd}	۹۸/۴۴۷±۰/۵۰۳^{bc}
اتانول ۷۰ –۱۰	۱۳/۶۹۰±۰/۲۲۲^{ab}	۲/۶۹۲±۰/۱۹۲^{bc}	۹۸/۶۹۱±۰/۲۳۶^{ab}
اتانول ۷۰ – ۲۰	۱۳/۷۸۶±۰/۰۵۷^{a}	۳/۳۴۵±۰/۰۵۶^{a}	۹۸/۹۴۳±۰/۶۹۸^{a}

میانگین‌های اثر متقابل حلال×زمان دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد هستند.

در بررسی اثر اصلی سه نوع حلال مورد استفاده، بیشترین و کمترین مقدار مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به ترتیب مربوط به اتانول و آب به دست آمد. میان سه حلال اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۵). در بررسی زمان‌های مختلف (اثر اصلی) بیشترین میزان DPPH مربوط به ۲۰ دقیقه و کمترین مربوط به ۵ دقیقه بود (جدول ۴). در بررسی اثر متقابل حلال در زمان (جدول ۶)، تیمارهای آب – ۵ دقیقه و اتانول –۲۰ دقیقه به ترتیب با ۹۰/۶۲۴±۰/۴۴۲ و ۹۸/۹۴۳±۰/۶۹۸ درصد، کمترین و بیشترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را در بین تیمارها داشتند.

در مورد ترکیب‌های فلاونوئیدی نیز در سه نوع حلال مصرفی (اثر اصلی)، بیشترین مقدار کل ترکیب‌های فلاونوئیدی مربوط به حلال اتانول ۷۰٪ بود که با متانول ۸۰٪ تفاوت معنی‌داری از نظرمیزان استخراج نداشت (جدول ۵). در بررسی اثر اصلی سطوح مختلف زمان مشاهده شد که میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی تا زمان ۲۰ دقیقه افزایش یافته بود (جدول ۴). اثر اصلی سه نوع حلال مورد استفاده، بیشترین و کمترین مقدار مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به ترتیب مربوط به اتانول۷۰ –۲۰دقیقه و آب ۵ دقیقه بود. افزایش زمان استخراج از ۵ تا۱۰ دقیقه، تأثیر معنی‌داری در میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH داشت ولی افزایش زمان از ۱۰ تا ۲۰ دقیقه دارای اثر معنی‌داری نبود (شکل ۶).

بحث

- میزان ترکیبات استخراج شده با کمک حمام فراصوت

در روش حمام فراصوت تیمار اتانول ۷۰ درصد در طی زمان ۹۰ دقیقه با ۰/۰۵۷± ۱۵/۸۲میلی‌گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک و ۰/۱۱۰±۷/۰۹ معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک، به ترتیب بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی را در بین تیمارها داشتند. نتایج نشان داد که افزایش زمان تا ۹۰ دقیقه باعث افزایش میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی می‌گردد.

علت افزایش میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی با افزایش زمان فراصوت را می‌توان به پدیده

کاویتاسیون نسبت داد که در واقع در اثر انتشار امواج صوتی در فاز جامد–مایع، چرخه‌های انقباض و انبساطی در محیط ایجاد می شود که باعث تشکیل حباب‌هایی شده که این حباب‌ها در ادامه رشد و در نهایت متلاشی می‌شوند. این عمل باعث نوسان ذرات جامد و مایع شده و تحت عمل فراصوت سرعت پیدا می‌کنند. در نتیجه مواد حل شونده سریعا از فاز جامد به حلال انتشار پیدا می‌کنند. علاوه بر این، دیگر اثرها مانند امولسیفیکاسیون، انتشار و صدمه به بافت نیز به افزایش استخراج اجزای مورد نظر از مواد خام کمک می‌کند. به طوری که در زمان‌های بالاتر ممکن است به دلیل وقوع اکسیداسیون (به علت قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت) میزان استخراج کاهش یابد (Rostagno *et al*., 2003).

Ma و همکاران (۲۰۰۸) استخراج هیسپریدین را از پوست *Citrus reticuata* به کمک امواج فراصوت بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که بازده استخراج با افزایش زمان به طور معنی داری افزایش یافت که این افزایش از ۲۰ تا ۶۰ دقیقه با شیب زیاد ولی از ۶۰ تا ۱۶۰ دقیقه به آرامی افزایش یافت. Wang و همکاران (۲۰۰۸) ترکیبات فنولی سبوس گندم را به کمک روش فراصوت استخراج کردند و تاثیر پارامترهای حلال، دما و زمان را بر روی میزان استخراج مورد بررسی قرار دادند. در بررسی آنها از یک حمام فراصوت و سه حلال متانول ۷۰٪، استون و اتانول ۸۰٪ در دامنه دمایی ۲۵ الی ۷۵ درجه سانتی گراد و زمان بین ۱۰ تا ۵۰ دقیقه استفاده شد. آنها گزارش کردند که در شرایط یکسان دمایی و زمانی، بیشترین استخراج ترکیبات فنولی توسط حلال اتانول صورت می‌گیرد. همچنین با افزایش زمان و دما میزان استخراج این ترکیبات افزایش می یابد.

- میزان ترکیبات استخراج شده با کمک پروب اولتراسوند

در روش استخراج با پروب فراصوت، حلال اتانول۷۰٪ و زمان ۲۰ دقیقه بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فنول(۰/۰۵ ±۱۳/۸ میلی گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک) و قدرت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH (۹۸/۹۴٪) را نشان داد. بنابراین در تمامی روش‌های استخراج حلال اتانول ۷۰٪ بهترین حلال برای استخراج ترکیبات مورد نظر بود.

Albu و همکاران (۲۰۰۴) در تحقیقی تاثیر امواج فراصوت را بر استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از گیاه رزماری مورد بررسی قرار دادند. آنها از سه حلال بوتانول، استات اتیلن و اتانول استفاده کردند و دریافتند که امواج فراصوت اثر حلال اتانول که در شرایط معمولی حلال ضعیفی است به یک سطح استخراج مشابه با دو حلال دیگر رساند. ثابت شد استخراج از گیاه خشک شده با اتانول موثرتر از ماده تازه می‌باشد که احتمالا به دلیل آب موجود در دومی است. در پژوهشی دیگر، Falleh و همکاران (۲۰۱۲) نیز دریافتند عصاره اتانولی قدرت مهار رادیکال آزاد بیشتری نسبت به عصاره متانولی دارد.

نتیجه‌گیری

فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی به میزان قابل توجهی تحت تاثیر ماهیت حلال، زمان استخراج وتعامل این دو عامل وابسته است. با این حال، قدرت استخراج حلال، مهم‌ترین فاکتور موثر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محصول است. روش‌های سنتی استخراج نظیر روش غرقابی و سوکسله نیاز به صرف زمان طولانی و مقدار حلال زیاد دارند همچنین از لحاظ دمایی ایمن نیستند و باعث تجزیه تعدادی از ترکیبات می‌شوند. امواج فراصوت منجر به ایجاد نوسانات مکانیکی در یک مایع می‌گردند. تاثیر مکانیکی فراصوت باعث نفوذ حلال به درون مواد سلولی شده و انتقال جرم را بهبود می‌دهد. همچنین بازیافت پلی‌فنول‌ها از مواد گیاهی توسط قطبیت حلال مورد استفاده جهت فرآیند استخراج تحت تاثیر قرار می‌گیرد. نتایج این تحقیق نشان داد که استخراج به کمک پروب و حمام فراصوت تاثیر متفاوتی در میزان استخراج ترکیبات زیست فعال گیاه سنجد زینتی داشت. در هر روش استخراج، میزان استخراج ترکیبات زیست فعال بسته به نوع حلال متفاوت بود. در روش حمام فراصوت تیمار اتانول ۷۰ درصد در طی زمان ۹۰ دقیقه با ۰/۰۵۷± ۱۵/۸۲میلی گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک و ۰/۱۱۰±۷/۰۹ معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک، به ترتیب بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی را در بین تیمارها داشتند. درنمونه‌های استخراجی با روش پروب فراصوت نیز، بیشترین میزان قدرت مهار کنندگی رادیکال‌های‌آزاد DPPH با میزان

۹۸/۹۴۳±۰/۶۹۸ درصد مربوط به تیمار اتانول ۷۰ درصد و زمان ۲۰ بود. بنابراین در تمامی روش‌های استخراج حلال اتانول ۷۰٪ بهترین حلال برای استخراج ترکیبات مورد نظر بود.

منابع

Ahmad, S. D., Sabir, S. M. & Zubair, M. (2006). Ecotypes diversity in autumn olive (*Elaeagnus umbellate* Thunb): A single plant with multiple micronutrient genes. Chemistry and Ecology, (22): pp. 509-521.

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P & Mason, T. J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from Rosmarinus officinalis for the food and pharmaceutical industry. Ultrasonics Sonochemistry, 11(3-4), pp. 261-265.

Arabshahi-Delouee, S. & Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morusindica L.*) leaves. Food Chemistry, 102: pp. 1233–1240.

Betancourt, A. O. (2008). Analysis, extraction and recovery of poly-3-hydroxybutyrate in the biomass. University of Quebec at Montreal Thesis, pp. 45-55.

Chang, C., Yang, M., Wen, H. & Chern, J. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. Food and Drug Analysis, 10: pp. 178-182.

Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, M. E., Abdelly, CH. & Magné, CH. (2012). Ultrasound-Assisted Extraction: Effect of Extraction Time and Solvent Power on the Levels of Polyphenols and Antioxidant Activity of *Mesembryanthemum edule L. Aizoaceae* Shoot. Journal of Pharmaceutical Research, 11(2): pp. 243-249.

Fordham, I. M., Clevidence, B. A., Wiley, E. R. & Zimmerman, R. H. (2001). Fruit of autumn olive; A rich source of lycopene. Hort Science, 36: pp.1136-1137.

Hayouni, A., Abedrabba, M., Bouix, M. & Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L. and Juniperus phoenicea L. fruit extracts. Food Chemistry, 105 (3): pp.1126–1134.

Ince, A. E., Sahin, S. & Sumnu, S. G. (2012). Extraction of phenolic compounds from melissa using microwave and ultrasound. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 37: pp. 69-75.

Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Hamdi, B., Chaieb, K., Bakhrouf, A., Magné, C. & Abdelly, C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte Tamarix gallica L and related polyphenolic constituents. Food Chemistry Toxicology, 47: pp. 2083–2091.

Luque-Garcia, J. L. & Luque de Castro, M. D. (2003). Where is microwave based analytical treatment for solid sample pretreatment going? Trends Anal. Chemistry,22: pp. 90–99.

Ma, Y., Ye, X., Hao, Y., Xu, G., Xu, G. & Liu, D. (2008). Ultrasound assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. Ultrasonics Sonochemistry, 15: pp. 227-232.

Mahdavi, D. L., Deshpande, S. S. & Salunkhe, D. K. 1995. Food Antioxidant. Marcel Dekker Inc., New York, USA, 746p.

Martino, E., Ramaiola, I. & Urbano, M. (2006). Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from Melilotus officinalis Pallas Alternative to Soxhlet and ultrasound assisted extraction. Journal of Chromatography, 11(25): pp.147-151.

Parmar, C. & Kaushal, M. K. (1982). *Elaeagnus umbellate* Thunb. In Wild Fruits of Sub-Himalayan region. Kalyani Publishers. New Delhi, India, pp: 23-25.

Rostagno, A., Palma, M. & Barroso, C., (2003). Ultrasound assisted extraction of soy isoflavones. Journal of Chromatography A, 1012: 119-128.

Slinkard, K. & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28: pp. 49-55.

Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive herbs, Ultrasonics principles from Sonochemistry, v. 8, pp. 303-313.

Weisburger, J. H. (1999). Mechanisms of action antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes, and tea. Food and Chemical Toxicology,37: pp. 943-948.

Wang, L. & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science and Technology, 17: pp. 300-312.

Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y. & Li, X., (2008). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. Food Chemistry, 106: pp. 804-810.