داروهای گیاهی، سال هشتم، شماره ۳، صفحه ۱۳۳ تا ۱۳۹
doi: 10.18869/JHD.2017.133

فصل‌نامه داروهای گیاهی
journal homepage: **www.jhd.iaushk.ac.ir**

بهینه سازی استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از پوسته بادام با روش سطح پاسخ

غلامرضا ایسپره[۱]، فاطمه نجاتی[۲*]، مریم جعفری ولدانی[۲]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران؛

۲. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران؛
مسئول مکاتبات* (E-mail: nejati.iut3@gmail.com**)

شناسه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۵/۲۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۲/۲۱
نوع مقاله: علمی - پژوهشی
موضوع: غذایی

کلید واژگان:
- ✓ *پوسته بادام*
- ✓ *ترکیبات انتی اکسسیدانی*
- ✓ *ترکیبات فنولیک*
- ✓ *ضایعات کشاورزی*

چکیده

مقدمه و هدف: استخراج ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی اخیرا توجه محققان مختلف را به خود جلب کرده است. بادام از جمله محصولات بومی ایران است که سالیانه حجم زیادی از ضایعات در طی تولید و فرآوری آن حاصل می‌شود. هدف از تحقیق حاضر، بررسی عوامل زمان و درصد حلال (اتانول) بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و خواص آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده از پوست بادام با کمک روش اولتراسوند و بهینه سازی شرایط استخراج با استفاده از روش RSM است.

روش تحقیق: پوسته سبز بادام به پودر تبدیل شد و به منظور استخراج به نسبت ۱:۲۰ با حلال (اتانول-آب) مخلوط و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد تحت تاثیر امواج اولتراسوند برای مدت زمان کافی قرار داده شد. به منظور بهینه سازی فرایند دو فاکتور زمان (در سه سطح شامل ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه) و غلظت اتانول (در سه سطح شامل ۰، ۳۵ و ۷۰٪) در نرم افزار Design Expert وارد و درنهایت ۱۳ آزمون برای استخراج عصاره طراحی شد. در ادامه غلظت ترکیبات فنولیک کل با روش فولین سیوکالتیو و فعالیت آنتی اکسیدانی باروش DPPH اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث: براساس نتایج حاصل از بهینه سازی، شرایط نقطه بهینه برای حداکثر استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی، شامل ۳۵/۷۴دقیقه زمان استخراج و استفاده از حلا لی حاوی ۴۳/۶۹درصد اتانول پیش بینی شد. تحت این شرایط بهینه، حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی۴۷/۱۹ درصد و غلظت ترکیبات فنولیک کل ۹۱۷/ (mg/ml) بدست آمد. مقایسه نتایج پیش بینی شده توسط نرم افزار و مقادیر تجربی نشان داد که مدل از دقت کافی برای پیش بینی نقطه بهینه برخوردار است.

توصیه کاربردی صنعتی: این پژوهش نشان داد که پوسته سبز بادام می‌تواند بعنوان یک منبع ارزان و قابل دسترس برای استخراج ترکیبات با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین، این تحقیق نشان داد اولتراسوند روش مناسبی در تسریع استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می باشد.

۱. مقدمه

استفاده از آنتی اکسیدان ها در موادغذایی یکی از مؤثرترین روش های کاهش اکسیداسیون چربیها و بنابراین جلوگیری از کاهش کیفیت حسی و تغذیه‌ای محصولات غذایی حاوی چربی می‌باشد. در حال حاضر، آنتی اکسیدان های سنتزی همچون هیدروکسی آنیزول بوتیله (BHA)، هیدروکسی تولوئن بوتیله (BHT)، پروپیل گالات (PG) و ترسیو بوتیل هیدروکینون (TBHQ) بیشترین کاربردهای

صنعتی را دارند، اما از آنجا که مصرف آنها مشکوک به سرطان زایی است، در سالهای اخیر تمایل رو به رشدی در جهت پرهیز از استفاده یا به حداقل رساندن کاربرد آنها در مواد غذایی مشاهده شده است. براین اساس، تحقیقات مختلفی با هدف شناسایی، استخراج و به کارگیری ترکیبات طبیعی با فعالیت آنتی اکسیدانی در حال انجام است. شواهد مختلفی در دست است که رژیم‌های غنی از آنتی-اکسیدان های طبیعی، بر سلامت انسان در جهت کاهش ابتلا به سرطان و بیماری های قلبی تاثیرگذار است (Weisburger, 1999 ;Williams *et al.*, 1999).

فاکتورهای مختلفی در استخراج ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی از منابع گیاهی حائز اهمیت است که از جمله می توان به عواملی همچون زمان، دما و نوع حلال اشاره نمود. همچنین، نوع روش استخراج، شامل استفاده از روشهای سنتی (استفاده از دستگاه سوکسله و یا روش غرقابی با حلال) و یا بکارگیری روش های جدید همچون انرژی مایکروویو ویا اولتراسوند نیز می‌تواند در میزان راندمان و مدت زمان استخراج موثر باشد(Haydari-Majd *et al.*, 2012).

امواج اولتراسوند یکی از راههای موثر در بهبود استخراج ترکیبات طبیعی از جمله ترکیبات آنتی اکسیدان گزارش شده است (Haydari-Majd *et al.*, 2012). امواج اولتراسوند منجر به تورم بافت، ایجاد تخلخل دردیواره سلولها و جذب بهتر حلال شده و خروج ترکیبات از بافت به حلال شده و انتقال جرم را تسریع می‌کند (Vinatoru, 2001). برخلاف شیوه‌های سنتی، امواج اولتراسوند باعث تخریب دیواره سلولی در یک مدت زمان کوتاه می‌شود. کوتاه‌تر بودن زمان استخراج با کمک اولتراسوند نسبت به استخراج سنتی با سوکسله، ساده تر بودن تجهیزات استخراج نسبت به استخراج با سیال فوق بحرانی، پایین بودن هزینه کل فرایند استخراج و نهایتا سازگار بودن استخراج با کمک التراسوند با حلال‌های مختلف، از مزایای استفاده از اولتراسوند به شمار می‌رود Wang *et al.*, (2006).

درسالهای اخیر استفاده ازمحصولات کشاورزی حاوی ترکیبات آنتی اکسیدان توجه محققان مختلفی را به خود معطوف نموده است. بادام یکی از محصولات مهم کشاورزی ایران به شمار می رود. استان چهارمحال و بختیاری از تولید کنندگان اصلی آن به شمار رفته و هر سال مقدار زیادی ضایعات حاصل از پوست‌گیری بادام به جای می‌ماند. پوست سبز بادام دارای میزان زیادی ترکیبات فنولیک است که با توجه به دسترس بودن و ارزان بودن آن در این منطقه، استخراج و استفاده از آنها به عنوان ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی می‌تواند ارزشمند باشد. در این تحقیق برآن شدیم تا استخراج ترکیبات آنتی اکسیدان از پوست سبز بادام، واریته پوست کاغذی، با استفاده از امواج اولتراسوند مورد بررسی و بهینه سازی قرار گیرد.

۲. مواد و روش ها

۲-۱. آماده سازی پوست بادام زمینی جهت انجام آزمایشات

پوسته سبز بادام، واریته کاغذی، در شهریور۹۴ از بادامهای کشت شده در شهرستان چادگان جداسازی شد. پوسته ها پس از خشک کردن در آون (۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ساعت) توسط آسیاب با حداقل آسیب حرارتی پودر شد و سپس از الک با مش ۴۰ عبور داده شدند. پودر حاصله درکیسه های مقاوم به رطوبت، تا زمان مصرف در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد (Rezai *et al.*, 2015).

۲-۲. طراحی آزمایش

در تحقیق حاضر دو فاکتور زمان استخراج و درصد حلال اتانول هرکدام در ۳سطح (زمانهای ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه و درصد اتانول ۰، ۳۵ و ۷۰) به عنوان فاکتورهای ورودی نرم افزار design expert (ورژن6.0.2)، در میزان استخراج ترکیبات آنتی اکسیدان مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این نرم افزار، اثرات متغیرهای مستقل بر روی پاسخها با استفاده از رویه سطح پاسخ (RSM) به صورت طرح مرکب مرکزی (CCD) مورد بررسی قرارگرفت. بر این اساس ۱۳ آزمون استخراج طراحی و مورد مطالعه در پروژه حاضر قرار گرفت (جدول ۱).

۲-۳.استخراج

۵گرم ازنمونه با ۹۵ میلی لیتر حلال اتانول- آب (نسبت اتانول-آب مطابق مقادیر پیشنهاد شده توسط نرم افزار) درظروف شیشه ای تیره رنگ مخلوط و سپس برای مدت زمان مشخص (مطابق اعداد پیشنهاد شده توسط نرم افزار) درمعرض امواج حمام دستگاه

التراسونیک با فرکانس ثابت ۲۴ کیلو هرتز قرار گرفت. در مراحل استخراج دما بر روی ۳۵ درجه سانتیگراد تنظیم و کنترل شد. در ادامه عصاره استخراج شده از کاغذ صافی (واتمن شماره ۱)، جهت حذف تفاله ها و مواد غیر محلول، عبور داده شد. جهت تغلیظ نمونه ها، تمام ۱۳ نمونه در دمای ۴۵درجه سانتی گراد در اواپراتور چرخان تحت خلا به حجم ۴۰ میلی‌لیتر رسانیده شدند. تمامی نمونه های استخراج شده در ظروف در بسته تا زمان انجام آزمونها در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

۲-۴. ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدان با استفاده از DPPH

برای تعیین قدرت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها، ار روش توانایی به دام انداختن رادیکال آزاد $DPPH^0$ استفاده شد. عصاره به نسبت ۱:۴ با بافر فسفات (۰/۱مولار) مخلوط و به ۱ میلی لیتر از آن مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر محلول $DPPH^0$ تازه (۰/۱ مولار در متانول ۶۰٪) اضافه شد. پس از ورتکس کردن، مخلوط حاصل در اتاق تاریک و در دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شده و سپس جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. نمونه شاهد شامل ۱ میلی لیتر بافر فسفات و ۲/۵ میلی لیتر محلول $DPPH^0$ بود. متانول بافری شده نیز جهت صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. فعالیت مهار رادیکال $DPPH^0$ توسط عصاره مطابق معادله‌ی زیر محاسبه شد:

$$\%Inhibation = [(A_{control} - A_{test})/A_{control}] \times 100$$

معادله ۱

۲-۵. اندازه گیری مقدار ترکیبات فنولیک کل

از روش فولین سیوکالتیو برای اندازه گیری ترکیبات فنولیک استفاده شد. بدین منظور، ۱۰۰میکرولیتر از عصاره، با۲/۵ میلی لیتر معرف فولین(۱۰ برابر رقبق شده) مخلوط گردید، بعداز۱۰-۸ دقیقه، ۴۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم (۲۰٪) به آن اضافه و ورتکس گردید. در ادامه، نمونه ها به مدت یک ساعت در اتاق تاریک نگهداری شده و نهایتا جذب آنها درطول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول استانداردگالیک اسید در غلظتهای ۰،۵۰۰،۲۵۰،۱۵۰،۱۰۰،۵۰،۷۵۰ میلی گرم در میلی لیتراستفاده شده و براساس آن، تعیین میزان ترکیبات فنولیک در نمونه های استخراج شده بر حسب میلی گرم گالیک اسید در صد گرم نمونه انجام شد (Waterhouse, 2002).

۳. نتایج و بحث

ننایج بدست آمده از اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال DPPH و ترکیبات فنولیک کل برای هریک از آزمون‌های استخراج وارد نرم افزارDesign-Expert شده و با داده های پیش بینی شده توسط نرم افزار مقایسه گردید (جدول ۱).

جدول۱. طرح آزمایش و نتایج فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان ترکیبات فنولی در عصاره‌های استخراج شده

شماره استخراج	زمان (دقیقه)	حلال اتانول (٪)	فعالیت مهارادیکال DPPH (٪)		میزان فنل کل (mg GAE/100g)	
			مقدار پیش بینی شده	مقدار بدست آمده	مقدار پیش بینی شده	مقدار بدست آمده
۱	۴۵	۳۵	۴۴/۶۳	۴۴/۸۶	۷۵۷/۰۲	۸۱۹/۰۴
۲	۴۵	۳۵	۴۴/۶۳	۴۴/۵۷	۷۵۷/۰۲	۶۸۳/۰۴
۳	۳۴	۶۰	۴۲/۷۷	۵۱/۴۴	۵۲۵/۳۲	۵۶۴/۸۸
۴	۳۴	۱۰	۱۷/۹۵	۲۰/۶۶	۶۱۱/۶۱	۷۰۰/۸۸
۵	۴۵	۳۵	۴۴/۶۳	۴۴/۸۱	۷۵۷/۰۲	۷۵۰/۶۴
۶	۵۶	۶۰	۱۹/۰۳	۲۰/۴۸	۶۹۸/۶۹	۶۸۴/۸۸
۷	۶۰	۳۵	۲۲/۴۲	۲۵/۴۴	۶۶۸/۵۹	۵۱۷/۷۶
۸	۴۵	۳۵	۴۴/۶۳	۴۴/۳۴	۷۵۷/۰۲	۷۵۱/۵۲
۹	۵۶	۱۰	۹/۵۶	۵/۰۵	۵۹۱/۱۳	۶۲۷/۰۴
۱۰	۳۰	۳۵	۴۵/۱۴	۳۷/۹۶	۸۱۱/۸۷	۷۳۶/۴
۱۱	۴۵	۳۵	۴۴/۶۳	۴۴/۵۴	۷۵۷/۰۲	۶۸۳/۰۴
۱۲	۴۵	۰	۰	۰/۸۹	۳۳۹/۹۳	۲۶۷/۰۴
۱۳	۴۵	۷۰	۲۳	۱۶/۷۵	۳۵۴/۹۸	۳۵۲/۴

۳-۱. انتخاب بهترین مدل

پس از آنالیز داده ها توسط نرم افزار، آنالیز آماری مدل ها به صورت جدول ارائه می شود که در جدول ۲ قابل مشاهده است. آنالیز واریانس نشان داد که برای میزان ترکیبات فنلی و نیز خاصیت

آنتی اکسیدانی، مدل درجه دوم با p value بسیار کوچک (۰/۰۰۱>) و مقادیر بالای ضریب همبستگی (۰/۹۳۸۷ برای فعالیت آنتی اکسیدانی و ۰/۹۰۰۴ برای ترکیبات فنلی) از لحاظ آماری به طور معنی دار با داده ها منطبق بوده و از اعتبار قابل قبولی برخوردار است. در جدول ۲ مشاهده می‌شود که متغیرهای A، B، A^2 و B^2 برای درصد آنتی اکسیدان و B^2 برای غلظت ترکیبات فنولیک کل، معنی دار شده است.

جدول۲. تجزیه واریانس ضرایب برآورد شده مدل پیشنهادی

متغیرها	فعالیت آنتی اکسیدانی (درصد)		غلظت ترکیبات فنولیک کل (mg GAE/100g)	
	p-value	Coefficient Estimate	p-value	Coefficient Estimate
مدل	۰/۰۰۰۴	-	۰/۰۰۵۸	-
Intercept	-	۴۴/۶۳	-	۷۵۷/۰۲
A[1]	۰/۰۰۴۳	-۸/۰۳	۰/۲۹۵۰	۳۸/۲۲
B[2]	۰/۰۰۳۱	۸/۵۷	۰/۸۴۳۹	۵/۳۲
AB	۰/۲۰۳۹	-۳/۸۴	۰/۲۳۲۷	۴۸/۴۶
A^2	۰/۰۳۴۸	-۵/۴۲	۰/۱۷۶۸	۵۴/۴۵
B^2	۰/۰۰۰۱	-۱۶/۸۸	۰/۰۰۰۴	-۲۰۴/۷۹

[1] A: زمان (دقیقه)

[2] B: غلظت اتانول (درصد)

۳-۲. مدل مربوط به فعالیت آنتی اکسیدانی

نرم افزار مدلی را پیشنهاد کرد که دارای انحراف استاندارد (S.D.) و مجموع مربعات باقیمانده برآورد شده(PRESS) کم و ضریب همبستگی(R^2) زیاد باشد که در این تحقیق مدل درجه دوم برای خاصیت مهار رادیکال آزاد در سطح احتمال ۹۵ درصد به دلیل داشتن این ویژگی‌ها توسط نرم افزار پیشنهاد شد و معادله تعیین شده به صورت زیر می‌باشد:

(معادله۲)

$$\text{درصد مهار رادیکالهای آزاد} = 44.63-8.03A+8.57-5.42A^2-16.88B^2$$

همانگونه که از معادله نیز مشخص است در مورد فعالیت آنتی اکسیدانی هر دو متغیر به صورت درجه دوم موثر بوده و اثر متقابلی بین فاکتورها مشاهده نشد. اثر هر یک از این دو فاکتور بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره در ادامه مورد بحث قرار می‌گیرد.

۳-۲-۱. تأثیر زمان

به منظور بررسی اثر زمان بر فعالیت آنتی اکسیدانی، متغیر دوم یعنی غلظت اتانول را ثابت فرض کرده و مقدار متوسط آن در سطح مرکزی (مقدار صفر) در نظر گرفته شد. بر این اساس و مطابق با نمودار ۱، با افزایش زمان تا چهل دقیقه، تغییر محسوسی در فعالیت آنتی اکسیدانی مشاهده نمی شود ولی با افزایش بیشتر در زمان استخراج، کاهش قابل توجهی در این فاکتور مشاهده می شود. به عبارتی با طولانی‌تر شدن زمان استخراج، فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش می‌یابد.

تاثیر فاکتور زمان بر خاصیت مهار رادیکال آزاد را می توان از دو حیث مورد بررسی قرار داد:

الف) پدیده کاویتاسیون: افزایش زمان التراسوند منجر به پدیده کاویتاسیون می شود. درواقع در اثر انتشار امواج صوتی درفاز جامد-مایع، چرخه های انقباض و انبساطی درمحیط ایجاد می‌شود که این امر منجر به تشکیل حباب هایی شده که این حباب ها در ادامه رشد و در نهایت متلاشی می‌شوند. این عمل باعث نوسان ذرات جامد و مایع شده و تحت عمل التراسونیک سرعت پیدا می کنند. در نتیجه مواد حل شونده سریعا از فاز جامد به حلال انتشار پیدا می کنند. علاوه بر این، اثرات دیگر مانند امولسیفیکاسیون، انتشار و صدمه به بافت نیز به افزایش استخراج اجزای مورد نظر از مواد خام کمک می کند. البته در زمانهای بالاتر ممکن است به دلیل وقوع اکسیداسیون (به علت قرارگرفتن در معرض امواج فراصوت) فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش یابد (Rostagno *et al.*, 2003; Albu *et al.*, 2004).

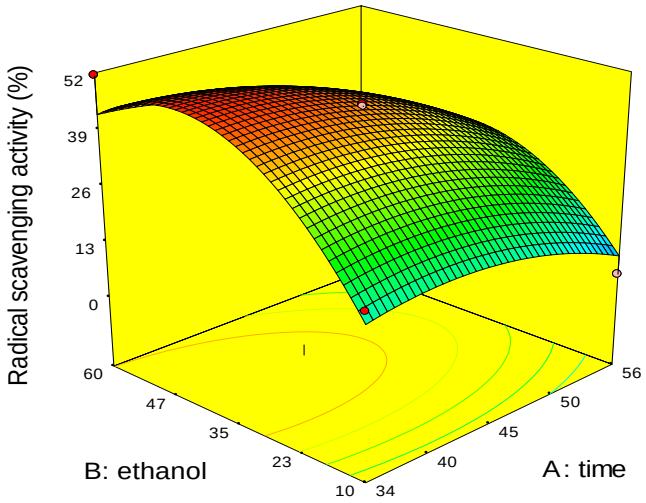
ب) تاثیر زمان در طی استخراج: زمان باعث می شود که حلال این فرصت راپیدا کند که به درون بافت گیاهی نفوذ کرده و ترکیبات فنولی نیز فرصت کافی برای جداشدن ازماتریکس و ورود به حلال داشته باشند(Spigno *et al* ., 2007). گرچه زمان باعث افزایش استخراج ترکیبات فنولی می شود، اما این افزایش تا یک زمان خاصی ادامه دارد و بعد از آن درروند استخراج ، روندکاهشی راشاهد هستیم که دلیل آن را می توان این گونه توجیه کرد که در زمانهای طولانی تر نمونه مورد استخراج نیز بیشتر تحت تاثیر دمای بکار رفته وامواج فراصوت قرار گرفته، لذا پایداری ترکیبات فنلی تحت تاثیر قرار می‌گیرد(Rostagno *et al.*, 2003).

یاکین و همکاران (۲۰۰۹) طی تحقیقی تاثیر دما و زمان را بر روی استخراج ترکیبات فنولی مرکبات بررسی نمودند و نتیجه گرفتند با افزایش دما و زمان استخراج (تاحدود۴۰درجه سانتی گراد) افزایش در استخراج ترکیبات فنولی مشاهده می‌شود اما یک روند کاهشی در مقدار استخراج این ترکیبات در زمان و دماهای بالاتر مشاهده می‌شود (Ya-Qin *et al.*, 2009) .

محققانی همچون پینلو و همکاران(۲۰۰۵) و یلماز و همکاران (۲۰۰۴) در پژوهش‌های خود روند استخراج ترکیبات فنولیک را بررسی نمودند. این محققان اعلام داشتند که در دماهای بالا، کاهش در میزان استخراج ترکیبات فنولیک مشاهده شده است که دلیل این موضوع را واکنش های پلیمریزاسیون ترکیبات فنولیک با خودشان بیان نمودند. (Yilmaz *et al.*, 2004; Pinelo *et al.*, 2005) وانگ و همکاران(۲۰۰۸) درخصوص بهینه سازی ترکیبات فنولی برروی سبوس گندم باکمک التراسوند پژوهشی انجام دادند و نتایج نشان داد استخراج میزان ترکیبات فنولی از زمان ۳۰-۱۰دقیقه به طورمعنی داری افزایش یافته ولی پس از آن تقریبا ثابت بوده است(Wang *et al.*, 2008).

۳-۲-۲. تاثیر غلظت اتانول

همانطورکه در نمودار۱ قابل مشاهده است تاثیر درصد اتانول بر میزان مهار رادیکال آزاد نیز به صورت درجه دوم معنی دار شده است. با افزایش مقدارحلال اتانول شاهد افزایش در استخراج ترکیبات فنولی بوده و این افزایش تا میزان حدود ۴۵ درصد اتانول افزایش و فراتر از این میزان، روند کاهشی داشته است. درجه قطبیت حلال های مختلف میزان استخراج ترکیبات فنولی را تحت تاثیر قرار می دهد. ترکیبات فنولی ترکیبات حجیم و با قطبیت پایین می‌باشند. درمقایسه با حلال هایی مانند اتانول و متانول، استخراج با آب مقدار کمتری از ترکیبات فنولی را به همراه دارد. آب بیشترین ثابت دی الکتریک را نسبت به حلال های معمول دارد. بنابراین میزان استخراج آنتی اکسیدان و ترکیبات فنولی توسط آب کمتر می‌باشد (Proestos *et al* ., 2008).



شکل ۱. تأثیر زمان و درصد حلال اتانول برفعالیت آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده از پوست سبز بادام

نتایج تحقیق حاضر نیز با این موضوع تطابق داشته و استفاده از درصدهای بالاتر اتانول درمقایسه با استفاده از آب به تنهایی، نتیجه بهتری را در استخراج ترکیبات فنلی و خاصیت رادیکال آزاد به همراه داشته است. علت این پدیده، نفوذ حلال اتانول به درون بافت گیاهی و شکستن پلی ساکاریدهای موجود از دیواره سلولی است که منجر به شکستن دیواره سلولی می گردد. به علاوه بین قطبیت حلال و ترکیبات فنلی مطابقت بیشتری وجود دارد که منجر به استخراج بیشتر و بهتر آنها می‌شود(Li *et al.*, 2006). اما دراستفاده از مقادیر بالای اتانول شاهد کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی بوده‌ایم که اشباعیت حلال از ترکیبات فنولی خصوصا در زمانهای طولانی‌تر را می‌توان از جمله دلایل آن برشمرد(Haydari-Majd *et al.*, 2012).

۳-۳. اثرمتغیرها بر استخراج مقدارکل ترکیبات فنولی

مطابق با جدول ۲، مدل درجه دوم با p value کوچکتر از ۰/۰۵ برای میزان ترکیبات فنلی استخراج شده در عصاره در سطح احتمال ۹۵ درصد معنی دار می‌باشد و معادله آن به قرار زیر است:

$$\text{میزان ترکیبات فنولی کل} = 757.02 - 204.79B^2 \qquad \text{معادله ۲}$$

همانگونه که در معادله نیز مشاهده می شود در مورد ترکیبات فنلی کل، فقط متغیر حلال به صورت توان دوم معنی‌دار بوده و اثر متقابلی بین فاکتورها مشاهده نشد.

طبق نمودار ۲ با افزایش درصد اتانول (مشابه آنچه درمورد خاصیتDPPH گزارش شد) ابتدا شاهد افزایش درترکیبات فنلی بوده ولی با افزایش بیش از حدود ۴۵ درصد اتانول، این روند سیر نزولی پیدا می کند که دلیل آن را می توان به قطبیت ترکیبات فنلی موجود در پوسته بادام و امکان استخراج آنها با حلالی که پلاریته کمتری نسبت به آب خالص دارد نسبت داد. به هرحال با افزایش بیشتر درصد اتانول با توجه به کاهش بیشتر در قطبیت محیط استخراج، امکان خروج کمتر این ترکیبات و در واقع کاهش میزان ترکیبات فنل کل درنمونه‌ها وجود دارد.

با توجه به ارتباط و همبستگی بین خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با محتویات فنولی، در این تحقیق به خوبی مشخص شد که کاهش در خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره ها معمولا باکاهش در میزان ترکیبات فنلی استخراج شده در عصاره همراه است و ارتباط مستقیم میان فعالیت آنتی اکسیدانی و محتویات فنولیکی در پوست بادام برقرار است. لذا به نظر می رسد شرایط و عواملی که در میزان تغییرات خاصیت های مهار رادیکالهای آزاد نقش داشته اند در تغییرات ترکیبات فنول کل هم تاثیرگذار بوده اند (Amarowicz *et al.*, 2004).

۳-۴. بهینه‌سازی شرایط واکنش

براساس نتایج حاصل بهینه سازی نقطه بهینه شامل شرایط زمان ۳۵/۷۴ دقیقه و استفاده از حلال حاوی ۴۳/۶۹ درصد اتانول پیش بینی شده که بر این اساس حداکثر درصد خاصیت مهار رادیکال آزاد (DPPH) ۴۷/۶۱۱۹ و درصد ترکیبات فنولی کل ۷۶۵/۷ میلی‌گرم گالیک اسید در صد گرم نمونه با مقدار مطلوبیت ۰/۹۲۲ است. تحت این شرایط آزمایشی در سه تکرار انجام شده و مقادیر بدست آمده با مقدار پیش بینی شده مورد مقایسه قرار گرفت. با توجه به اینکه تفاوت معنی‌داری بین نتایج به دست آمده و پیش‌بینی شده توسط نرم افزار مشاهده نشد بنابراین می‌توان گفت که مدل از دقت کافی برای پیش‌بینی نقطه بهینه برخوردار بوده و قابل استفاده برای دیگر شرایط مورد نظر می‌باشد.

۴. نتیجه گیری

نتایج آزمون ها نشان داد که پوسته سبز بادام واریته پوست کاغذی بعنوان یک منبع ارزان و قابل دسترس دارای ویژگی های آنتی اکسیدانی قابل توجهی بوده و همچنین درصد حلال و زمان استخراج بر روی مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده با کمک روش التراسونیک تاثیرگذار است. با افزایش درصد حلال و زمان، ابتدا مقدار استخراج ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش یافته ولی با طولانی‌تر کردن زمان استخراج و نیز استفاده از درصدهای بالاتر اتانول، میزان این ترکیبات در عصاره استخراج شده روند کاهشی نشان داد که می‌تواند ناشی از تجزیه این ترکیبات در زمانهای طولانی‌تر و تحت تاثیرامواج اولتراسوند و نیز عدم هماهنگی قطبیت این ترکیبات با حلال مورد استفاده در محیط استخراج باشد.

۵. منابع

Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J. A. 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies." *Food Chemistry* .84(4): 551-562.

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P., Mason, T.J. 2004. Potential for the use of Ultrasound în the Extraction of Antioxidants from Rosmarinusofficinalis for the Food and Pharmaceutical Industry. Journal of Ultrasonic Sonochemistry. 11, 261.

Ballard, T. S., et al. 2010. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. Food Chemistry.120(4): 1185-1192.

Haydari-Majd, M., et al. 2012. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Flomidoschema parviflora. Journal of Herbal Drugs. 3(1): 7-13.

Li, B., et al. 2006. "Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method." Separation and Purification Technology48(2): 189-196.

Ma, Y.-Q., et al. 2009. "Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: effect of ultrasound." Ultrasonics Sonochemistry16(1): 57-62.

Pinelo, M., et al. 2005. "Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace." Journal of Agricultural and Food Chemistry53(6): 2111-2117.

Proestos, C. and M. Komaitis 2008. "Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds." LWT-food science and technology41(4): 652-659.

Rezai, E. S., et al. 2015. "Isolation of Shahmirzadi husk walnut extractusing microwave assisted extraction (mae) and evaluation of its antioxidant activity."

Rostagno, M. A., et al. 2003. "Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones." Journal of Chromatography A1012(2): 119-128.

Sfahlan, A. J., et al. 2009. "Antioxidants and antiradicals in almond hull and shell (Amygdalus communis L.) as a function of genotype." Food Chemistry115(2): 529-533.

Spigno, G., et al. 2007. "Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics." Journal of food engineering81(1): 200-208.

Vinatoru, M. 2001. "An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs." Ultrasonics Sonochemistry8(3): 303-313.

Wang, J., et al. 2008. "Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran." Food Chemistry106(2): 804-810.

Waterhouse, A. L. 2002. "Determination of total phenolics." Current protocols in food analytical chemistry.

Weisburger, J. 1999. "Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea." Food and chemical toxicology37(9): 943-948.

Williams, G., et al. 1999. "Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives." Food and chemical toxicology37(9): 1027-1038.

Joyce, C., Pennycooke, S. and Stushnoff, C. 2005. Relationship of cold acclimation, totalphenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia. Enviromental andEeperimental Botany 53: 225-232.

Wang’L.and Weller’L.2006. Resent advances in extra ction of nutraceuticuls from plants.Trends food Sci.Technol’17’300-312.

Ya-Qin, Ma. Jian-Chu, Chen. 2009. Simultaneous extraction of phenolic compound of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. Journal of Ultrasonics Sonochemistry., 16: 57-62.

Yilmaz, Y. and R. T. Toledo 2004. "Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid." Journal of Agricultural and Food Chemistry52(2): 255-260.