



## فصل نامه‌ی داروهای گیاهی

Journal homepage: [WWW.ojs.iaushk.ac.ir](http://WWW.ojs.iaushk.ac.ir)



### بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک از گیاه پونه گاوی

(*Flomidoschema parviflora*) با استفاده از دستگاه اولتراسوند

مجتبی حیدری مجد<sup>۱</sup>، سید علی مرتضوی<sup>۲</sup>، جواد اصیلی<sup>۳</sup>، شادی بلوریان<sup>۴</sup>،

محمد آرمین<sup>۵</sup>، آنا عبدالشاهی<sup>۶</sup>

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، گروه علوم و صنایع غذایی، سبزوار، ایران؛

۲. گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛

\*مسئول مکاتبات: (E-mail: [Morteza1937@yahoo.com](mailto:Morteza1937@yahoo.com))

۳. گروه فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛

۴. گروه پژوهشی و افزودنی های غذایی جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد، ایران؛

۵. دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، سبزوار، ایران؛

۶. شبکه بهداشت و درمان دامغان دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران؛

#### چکیده

مقدمه و هدف: با پیشرفت علوم و صنایع غذایی گرایش به جایگزینی افزودنی های طبیعی به جای انواع سنتزی در مواد غذایی به وجود آمده است. با توجه به اثرات سوء و نامطلوب آنتی اکسیدان های سنتزی استفاده از آنتی اکسیدان های حاصل از منابع طبیعی در چربی ها و روغن های خوراکی به عنوان یک راه حل منطقی در نظر گرفته می شود. در این پژوهش، بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک از عصاره متابولی ۸۰ درصد گیاه پونه گاوی با استفاده از اولتراسوند و به کمک روش سطح پاسخ پرداخته شده است. روش تحقیق: برای بهینه سازی فرآیند در آزمون ها ۳ عامل دما (۱۵، ۳۰ و ۴۵ درجه سانتی گراد)، زمان (۱۵، ۳۵ و ۵۵ دقیقه) و pH (۶، ۷ و ۸) هر کدام در ۳ سطح مورد بررسی قرار گرفت. این طرح از طریق Box-Behnken در سه عامل و در سه سطح که شامل ۱۷ آزمون است انجام شد. نتایج و بحث: نتایج به دست آمده نشان می دهد که مناسب ترین شرایط برای استخراج ترکیبات فنولیک زمان ۴۷ دقیقه، دمای ۳۴ درجه سانتی گراد و pH=۶ می باشد. در بررسی نتایج و روند نمودارها زمان به عنوان موثرترین عامل شناسایی شد. هم چنین مقایسه بین دو روش استخراج، یعنی غرقابی و اولتراسوند نشان داد که راندمان استخراج ترکیبات فنولیک در روش اولتراسوند نسبت به روش غرقابی بیشتر است. توصیه کاربردی/صنعتی: در نهایت عصاره گیری به روش اولتراسوند ممکن است از نظر کارایی استخراج مواد فنولیک از گیاه پونه گاوی پیشنهاد می شود.

#### شناسه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۴/۲۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۰۹/۲۰

نوع مقاله: پژوهشی

موضوع: به زراعی - به نژادی

#### کلید واژگان:

- ✓ اولتراسوند
- ✓ بهینه سازی
- ✓ ترکیبات فنولیک
- ✓ روش سطح پاسخ

#### ۱. مقدمه

می باشد. مواد غذایی را در طی فرآوری در کارخانه جات می توان با ترکیبات فعال<sup>۱</sup> از قبیل ترکیبات فنولیک که دارای فواید و

کانون توجهات اخیر به مواد فیتوشیمیایی مشتق شده از گیاهان بوده است که این ناشی از اثرات مثبت آن ها بر سلامتی بشر

1- Bioactive

پژوهش های زیادی توسط محققان صورت گرفته است. به عنوان مثال رودریگز و هم کاران (Rodrigues et al., 2007) موفق به استخراج ترکیبات فنولیک از پوست نارگیل که یکی از ضایعات محصولات کشاورزی است شدند. در این پژوهش نیز به بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک از گیاه پونه گاوی با نام علمی *Flomidoschema parviflora* (Lamiaceae) می باشد با استفاده از اولتراسوند پرداخته شده است و در ادامه به مقایسه دو روش استخراج، یعنی غرقابی و اولتراسوند پرداخته شده است.

## ۲. مواد و روش ها

### ۲-۱. مواد گیاهی

گیاه پونه گاوی *Flomidoschema parviflora* در خرداد ماه سال ۸۹ از ارتفاعات شهرستان گناباد واقع در استان خراسان جمع آوری شد و سپس در دمای اتاق و دور از نور خورشید در مسیر جریان هوا، خشک شده و سپس توسط آسیاب برقی صنعتی، پودر شده و از الک با مش ۱۰۰ عبور داده شد و در محلی تاریک، سرد و خشک نگهداری شد. نمونه گیاهی گونه مذکور با استناد به فلور پاکستان موجود در کتابخانه دانشگاه فردوسی مشهد و متخصصین گیاه شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد مورد تأیید قرار گرفت.

### ۲-۲. استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی

جهت تهیه عصاره از برگ و گل های گیاه از روش غرقابی و روش استخراج با دستگاه اولتراسوند، استفاده شد. حلال مورد استفاده در هر دو روش متانول ۸۰ درصد بود. متانول به عنوان حلال مؤثر به طور گسترده برای استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از منابع گیاهی مورد استفاده قرار می گیرد.

### ۲-۲-۱. روش غرقابی

۵ گرم نمونه پودر شده گیاهی با ۱۷۵ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد (نسبت ۱:۱۰ حجمی/ وزنی) طی مدت ۲۴ ساعت به وسیله دستگاه شیکر و در دمای محیط مخلوط شد. مخلوط عصاره حاصل با کاغذ واتمن شماره یک صاف گردید و در دمای ۵-۲ درجه

خصوصیات فیزیولوژیکی از جمله ضد آلرژی<sup>۲</sup>، ضد التهاب<sup>۳</sup>، ضد میکروبی<sup>۴</sup>، آنتی اکسیدانی<sup>۵</sup> و غیره می باشند، غنی سازی نمود. اثرات سودمند موجود در ترکیبات فنولیک به خصوصیات آنتی اکسیدانی آن ها مربوط می شود (Rodrigues et al., 2007). ترکیبات دارای خاصیت ضد اکسیدان، شامل ترکیبات فنولی هستند که در برخی از گیاهان یافت می شوند. افزودن آنتی اکسیدان های مصنوعی مانند بوتیلاتد هیدروکسی آنیزول<sup>۶</sup>، بوتیلاتد هیدروکسی تولوئن<sup>۷</sup> و ترتیاری بوتیل هیدروکینون<sup>۸</sup> می تواند اکسیداسیون لیپدها را در مواد غذایی کنترل کند. ولیکن استفاده از این آنتی اکسیدان های مصنوعی به دلیل خطراتی که در سلامتی دارند و به دلیل سمیت آن ها محدود شده است (Weisburger, 1999). اثرات سمی و سرطان زایی این آنتی اکسیدان های سیننتیک بر روی انسان شناخته شده است. هم چنین آنتی اکسیدان های سیننتیک ممکن است باعث توروم کبد شوند و بر روی فعالیت های آنزیمی کبد اثر بگذارند (Hayouni et al., 2007). بنابراین در سال های اخیر تلاش برای شناخت آنتی اکسیدان های طبیعی خصوصاً با منشا گیاهی افزایش یافته است (Mahdavi et al., 2009).

نتایج مطالعات نشان می دهد که فعالیت آنتی اکسیدانی بعضی از سبزی جات و میوه جات به طور گسترده به محتوای کل ترکیبات فنولیک آن ها وابسته است. از نقطه نظر استخراج ترکیبات مؤثره از محصولات کشاورزی یا پس مانده های آن، میزان استخراج ترکیبات فعال آن ها از جمله ترکیبات فنولیک بسیار مهم است و میزان حضور ترکیبات فنولیک در محصولات غذایی به صورت طبیعی یا غنی شده نشان دهنده ارزش غذایی آن محصول در حفظ سلامتی بشر است. به همین جهت در فرآیند استخراج عواملی چون نوع حلال، دما و زمان استخراج بسیار مهم هستند. هم چنین نحوه عمل استخراج می تواند به صورت سنتی از طریق روش هایی مثل سوکسله، غرقابی و یا از طریق فن آوری های جدیدی مانند مایکروویو و یا امواج مافوق صوت صورت گیرد. در این زمینه

- 
- 2- Anti-allergic
  - 3- Anti-inflammatory
  - 4- Anti-microbial
  - 5- Anti-oxidant
  - 6- BHA
  - 7- BHT
  - 8- TBHQ

در دمای اتاق ۱/۵ میلی لیتر از کربنات سدیم ۲۰ درصد را اضافه می‌کنیم و تا حد کافی عمل هم‌زدن را انجام می‌دهیم. ترکیب درون لوله آمایش به مدت ۲ ساعت در تاریکی در دمای اتاق نگهداری می‌شود و سپس جذب محلول در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفومتر خوانده شد. آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد. مقدار کل ترکیبات فنولیک از روی معادله خط رسم شده بر مبنای اسید گالیک به صورت میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره خشک شده بیان گردید. آزمون فولین، با سه تکرار انجام شد.

#### ۴-۲. رسم منحنی استاندارد

محلول‌های استاندارد در غلظت‌های مختلف اسید گالیک (۰، ۳۰، ۷۰، ۱۱۰، ۱۵۰، ۱۹۰ و ۲۲۰ قسمت در میلیون در متانول ۸۰ درصد) تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از محلول‌ها را در لوله آزمایش وارد کرده و سایر مراحل را بر اساس قسمت قبلی انجام دادیم. آزمون جذب برای هر یک از محلول‌های استاندارد در سه تکرار انجام شد. بر اساس نتایج جذب خوانده شده منحنی جذب اسید گالیک با توجه به غلظت‌های ساخته شده رسم شد و سپس مقدار کل ترکیبات فنولیک برای هر یک از عصاره‌ها، بر اساس معادله خط منحنی جذب اسید گالیک محاسبه شد.

#### ۴-۵. روش آماری

برای بررسی اثر مدت زمان فرآیند، دما و pH بر روی بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولیک آزمون بر اساس طرح RSM در ۳ عامل و ۳ سطح طراحی و بر اساس طرح Box- Behnken آزمون انجام شد (جدول ۱). نرم افزار مورد استفاده Design Expert و نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel رسم شد.

#### ۳. نتایج و بحث

##### ۳-۱. انتخاب بهترین مدل

پس از تجزیه داده‌ها جهت تعیین بهترین مدل پیشنهادی از میان پنج مدل موجود Linear, 2FI, Quadratic, cubic, Mean با توجه به جدول ۲، تجزیه واریانس، مدلی که مقدار مجموع

سانتی‌گراد برای حفظ ترکیبات فنولیک در یخچال نگهداری شد. در مرحله بعدی پودر گل پونه گاوی عصاره گیری شده در مرحله اول وزن گردید و به نسبت ۱:۱۰ حجمی/ وزنی با حلال تازه (متانول ۸۰ درصد) توسط دستگاه شیکر در دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت مخلوط گردید. مخلوط به دست آمده از مرحله دوم نیز همانند مرحله اول با کاغذ واتمن شماره یک صاف گردید و عصاره حاصل از مرحله دوم به عصاره حاصل از مرحله اول اضافه شد و در ادامه در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد با دستگاه روتاری تغلیظ و سپس در آن تحت خلاء و در همان دما تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد (هاربون، ۱۳۸۵).

##### ۲-۲-۲. استخراج با اولتراسوند

در فرآیند استخراج با اولتراسوند مدل Dr. Hilscher، میزان نمونه به حلال، با توجه به استفاده از Sonotrode، مدل S2 قطر یک میلی‌متر و حداکثر دامنه نوسان<sup>۹</sup> برابر با ۲۶۰ میکرومتر، محدودیت استفاده حجمی بین ۲-۵۰ میلی‌متر وجود دارد، به همین خاطر حلال در یک نسبت ثابت ۳۵ میلی لیتر به یک گرم پودر گیاه اضافه می‌شود.

##### ۲-۳. اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولیک

مقدار کل ترکیبات فنولیک در عصاره حاصل از دو روش استخراج غرقابی و التراسوند، بر اساس روش فولین سیوکالتیو مورد بررسی قرار گرفت (Hayouni et al., 2007). برای تهیه محلولی از پودر عصاره خشک شده با غلظت ۱۰۰۰ قسمت در میلیون در بالن ۱۰۰ میلی لیتر، و به ۱۰۰ میلی گرم از پودر عصاره خشک شده متانول ۸۰ درصد اضافه می‌کنیم تا به حجم ۱۰۰ میلی لیتر برسد و بالن را در روی Heater Magnetic قرار می‌دهیم تا پودر عصاره به طور کامل در متانول حل شود.

برای آزمون فولین، عصاره‌های تهیه شده، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره ۱۰۰۰ قسمت در میلیون را در لوله آزمایش ریخته و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده، معرف فولین سیوکالتیو را به نسبت (۱/۱۰) را اضافه می‌کنیم. بعد از فاصله زمانی ۱ دقیقه،

<sup>9</sup> Amplitude

$$Y = -33.283 + 0.588t - 0.0542T + 11.552\text{ph} - 5.868t^2 - 5.322T^2 - 0.97\text{ph}^2 + 4.853t * T - 0.03t * \text{ph} + 0.04166T * \text{ph}$$

T=temp and t=time

با توجه به معادله ۱ و جدول ۳ پارامتر زمان (t) دارای بیشترین تأثیر بر روی استخراج ترکیبات فنولی عصاره گیاه پونه گاوی بود. در روش RSM مرحله‌ای به نام Verification وجود دارد، در این مرحله می‌بایست مقدار استخراج ترکیبات فنولی کل را در مرحله آزمایش با مقدار پیش‌گویی شده توسط مدل به طریق آماری مقایسه نمود در این بررسی پس از انجام این مرحله، مقادیر مشاهده شده با مقادیر پیش‌بینی شده مقایسه گردید و محاسبات در نمودار ۲، قابل مشاهده است؛ نتایج، بیانگر همبستگی بسیار خوب بین نتایج به دست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش‌بینی شده با روش آماری است.

### ۳-۳. اثر عوامل مختلف بر روی استخراج ترکیبات فنولیک

با توجه به نمودار Surface (نمودار ۳) با افزایش دما و زمان مقدار استخراج ترکیبات فنولیک افزایش می‌یابد در دما و زمان‌های بالاتر از ۴۵ دقیقه روند استخراج کاهش یافته است.

در ارتباط با اثر متقابل زمان و pH در نمودار Surface (نمودار ۴) با افزایش زمان تا ۳۵ دقیقه مقدار استخراج افزایش یافته و پس از آن همزمان با افزایش pH تا زمان ۴۷ دقیقه روند کندی مشاهده شد و پس از آن استخراج کاهش می‌یابد. اما با افزایش pH ابتدا مقدار استخراج تا pH=7 روند افزایشی کندی داشته اما در زمان‌های بالاتر روند کاهشی محسوسی در مقدار استخراج ترکیبات فنولیک با افزایش pH بیشتر از pH=7 مشاهده شد.

در نمودار Counter (نمودار ۵) ضمن تأیید همین موضوع بیان می‌دارد که پس از pH=7 روند استخراج ترکیبات فنولیک کاهش محسوسی نشان داد. روند استخراج ترکیبات فنولیک در ارتباط با اثر متقابل دما و pH در نمودار Surface (نمودار ۵) نشان داده شده است همان طور که مشاهده می‌شود با افزایش دما تا حدود ۳۰ درجه سانتی‌گراد روند افزایشی در مقدار ترکیبات

مربعات<sup>۱۰</sup> آن دارای اختلاف معنی‌دار بوده و مقدار Lack of fit آن معنی‌دار نشود به عنوان بهترین مدل انتخاب می‌شود. با توجه به این موضوع و پس از بررسی نتایج به دست آمده و مقایسه میان مدل‌های رگرسیونی نتایج حاکی از آن بود که مدل Quadratic برای تمامی آزمون‌های اندازه‌گیری شده در این مطالعه، دارای اختلاف معنی‌دار با سایر مدل‌ها بود (جدول ۲) و این مدل تنها مدلی بود که Lack of fit برای آن معنی‌دار نشده بود (جدول ۳). در نتیجه مدل Quadratic برای بررسی روند تغییرات پارامترهای اندازه‌گیری شده در این مطالعه انتخاب شد. پس از انتخاب بهترین مدل در سطح آماری مورد نظر (۱ یا ۵ درصد)، جهت بررسی پارامترهای اثرگذار در مطالعه با توجه به جدول تجزیه واریانس، پارامتری که آزمون F برای آن معنی‌دار نباشد ( $p > 0.01$ ) از مدل حذف می‌شود و سایر پارامترها که دارای اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد بودند در مدل نگهداری شد.

لازم به ذکر است در صورتی که پارامتر خطی یک متغیر در یک مدل، اثر معنی‌داری نداشته باشد ولی اثر متقابل آن، با یکی از متغیرهای دیگر، که آن متغیر دارای اثر معنی‌داری در مدل بوده، دارای اثر معنی‌دار باشد آن پارامتر در مدل نگه داشته می‌شود و در سپس معادله کلی با استفاده از ضرایب داده شده برای هر پارامتری حاصل می‌گردد. در نهایت در میان پارامترهای مختلف، پارامتری که بیشترین مجموع مربعات را داشته باشد به عنوان اثرگذارترین پارامتر و بر عکس انتخاب می‌شود.

### ۳-۴. تعیین محتوای کل ترکیبات فنولیک

مقدار محتوای کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره پونه گاوی با استفاده از نمودار استاندارد ترسیم شده بر حسب اسید گالیک محاسبه گردید (نمودار ۱). با توجه به جدول ۳، نتایج کلیه پارامترها دارای اثر معنی‌داری در مدل بودند ( $p < 0.001$ ) بنابراین می‌توان با توجه به پارامترهای معنی‌دار شده معادلی کلی مدل Quadratic را به صورت زیر گزارش کرد:

معادله ۱.

<sup>10</sup> Sum of square

شده اشباع می‌شود شیب غلظت صفر شده و اثر حلال متوقف می‌شود. یاکین و هم‌کاران (Ya-Qin and Chen, 2009) بیان کردند که با افزایش دما و زمان استخراج (تا حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد) افزایش در میزان استخراج ترکیبات از پوست نوعی از مرکبات فنولیک مشاهده شد اما یک روند کاهشی در مقدار استخراج ترکیبات فنولیک در زمان‌ها و دماهای بالاتر (دمای بالای ۴۰ درجه سانتی‌گراد) مشاهده شد. این محققان دلیل این امر را تجزیه حرارتی یا واکنش‌های پلی‌مریزاسیون ترکیبات فنولیک با خودشان بیان نمودند (Ya-Qin and Chen, 2009). محققانی دیگر (Pinelo et al., 2005; Manthey and Grohmann, 2004; Yalmiz and Toledo, 1995) در کارهای تحقیقاتی خود که روند استخراج ترکیبات فنولیک را بررسی می‌کردند بیان داشتند که در دماهای بالا، کاهش در میزان استخراج ترکیبات فنولیک مشاهده شده است. همه این محققان دلیل این امر را واکنش‌های پلی‌مریزاسیون ترکیبات فنولیک با خودشان بیان نمودند.

با توجه به این‌که pH حلال مورد نظر، (متانول ۸۰ درصد) برابر با ۵.۳ در شرایط آزمایشگاه (۲۱ درجه سانتی‌گراد) می‌باشد و با اضافه کردن یک گرم از پودر نمونه گیاهی، بعد از هم‌زدن مخلوط حاصل، در حدود ۶ ثابت می‌شود، بنابراین pH طبیعی نمونه گیاهی ۶ می‌باشد و روند کاهشی مقدار استخراج ترکیبات فنولی بعد از pH=7 در نمودارهای Surface مربوط به اثر متقابل زمان - pH و دما-pH در ارتباط با دور شدن pH از pH طبیعی گیاه می‌باشد. سالارباشی (۱۳۸۸) ضمن تأیید همین موضوع بیان کردند که هر چه روند تغییر pH به حالت طبیعی گیاه بومادران (pH=۶.۳) نزدیک می‌شود مقدار استخراج ترکیبات فنولیک افزایش می‌یابد.

با توجه به نتایج جدول ۳، زمان و pH به ترتیب به عنوان موثرترین و کم اثر گذارترین عامل شناسایی شدند. پس از بررسی داده‌ها برای استحصال حداکثر ترکیبات فنولی از عصاره پونه گاوی در شرایط مطالعه مشاهده شد که مناسبترین شرایط برای استخراج ترکیبات فنولیک دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد، pH=6.61 و زمان ۴۷ دقیقه بدون در نظر گرفتن سایر پارامترهای اندازه‌گیری شده برای عصاره‌های استحصال می‌باشد (جدول ۴). تحت این شرایط

فنولیک مشاهده می‌شود و پس از آن در pH های کمتر از ۷ با افزایش دما مقدار استخراج تقریباً ثابت است اما در pH بالای ۷ با افزایش دما بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد کاهش در میزان ترکیبات فنولیک مشاهده شد. با افزایش pH تا حدود pH=7 مقدار بسیار کمی در میزان استخراج مشاهده شده است، اما بعد از pH=7 یک روند کاملاً نزولی در میزان استخراج مشاهده شد.

با توجه به نمودارهای رسم شده می‌توان بیان کرد که دما و زمان به طور معنی داری بر میزان استخراج ترکیبات فنولیک موثر است؛ به طوری که با افزایش دما و زمان، روند افزایشی در میزان استخراج ترکیبات فنولیک مشاهده شده است. افزایش دما سبب افزایش ضریب نفوذ حلال و افزایش زمان نیز مدت زمان انتقال جرم را افزایش می‌دهد با توجه به این‌که مقدار نسبت نمونه به حلال در این طرح (نسبت ۱:۳۵) ثابت در نظر گرفته شد، دلیل کاهش مقدار استخراج ترکیبات فنولی با توجه به نمودار Surface، به دلیل اشباعیت حلال در دما و زمان‌های بالاتر و همچنین به دلیل از هم پاشیدگی دمایی ترکیبات فنولی، در دماهای بالا می‌باشد.

هررا و لوک (Herrera and Luque, 2005) و همچنین پینلو و هم‌کاران (Pinelo et al., 2005) بیان داشتند که افزایش دما و زمان استخراج به طور معنی‌داری بر روی میزان استخراج ترکیبات فنولیک به ترتیب بر روی توت آسیاب شده و تفاله انگور موثر است. کاکاکه و هم‌کاران (Cacace and Maza, 2003) گزارش کردند که افزایش دما سبب افزایش استخراج آنتوسیانین از انگور سیاه شده است. این محققان دلیل این امر را اثر دما روی افزایش حلالیت و افزایش ضریب نفوذ می‌دانستند. این محققان در ادامه اعلام کردند در دماهای بالاتر از ۴۵ درجه سانتی‌گراد شیب تندی در کاهش میزان آنتوسیانین مشاهده شده است و این به دلیل حساسیت آنتوسیانین به دماهای بالا می‌باشد (Cacace and Maza, 2003). نتایج حاصل در مورد زمان استخراج با نتایج سوئلی و هم‌کاران مطابقت دارد. ایشان بر اساس نمودارهایی که در آن اثر متقابل زمان را با سایر عوامل (pH، دما و نسبت نمونه به حلال) بررسی کرد، مشخص نمود که با افزایش مدت زمان استخراج (۲۰ تا ۶۰ دقیقه) تفاوت معنی‌داری در استخراج ترکیبات فنولیک دیده نمی‌شود. همچنین آنها بیان کردند که وقتی که حلال با ترکیبات استخراج

#### ۴. نتیجه گیری

نتایج آزمون‌ها نشان داد که با افزایش دما و زمان مقدار استخراج ترکیبات فنولیک افزایش یافته اما در ارتباط با pH فقط تا pH خنثی افزایش در مقدار استخراج مشاهده شد. همچنین روش استخراج با اولتراسوند نسبت به روش غرقابی دارای بازده بیشتری از نظر استخراج ترکیبات فنولیک می‌باشد. همچنین در طرح نمودار سطح پاسخ عامل زمان به عنوان تأثیرگذارترین عامل در استخراج ترکیبات فنولیک انتخاب شد.

#### ۵. منابع

دزاشیبی، ز. ۱۳۸۵. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ حنا. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار. سالارباشی، داود. ۱۳۸۸. بررسی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی گیاه بومادران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار.

هاربون، ج. ب. (ترجمه دکتر ی. آینه‌چی) ۱۳۸۵. روش‌های تجزیه شیمیایی گیاهان. تهران: انتشارات دانشگاه تهران.

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorime, J. P. and Manson, T. J. 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidant from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(3-4): 261-265.

Cacace, J.E. and Maza, G. 2003. Optimization of extraction of anthocyanins from black currant with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*, 68: 240-248.

Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M. and 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: 1126-1134.

Herrera, M. and Luque, M.D. 2005. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds

میزان استخراج ترکیبات فنولیک از عصاره به بیش از ۱۵ میلی‌گرم گالیک اسید (استاندارد ترکیبات فنولیک) به ازای ۱ گرم از پودر اولیه پیش‌بینی شد.

رودریگوس و هم‌کاران (Rodrigues et al., 2007) با استفاده از آزمون سطح پاسخ، شرایط بهینه را (pH=6.5، مدت زمان ۱۵ دقیقه، نسبت نمونه به حلال ۱:۵۰ و دمای استخراج ۳۰ درجه سانتی‌گراد) تعیین کرد و در شرایط بهینه، بازده استخراج را ۲۲.۴ میلی‌گرم ترکیبات فنولیک به ازای ۱ گرم عصاره خشک گزارش نمود.

#### ۳-۴. اثر روش استخراج بر مقدار کل ترکیبات فنولیک

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولیک عصاره‌های استخراجی با روش‌های غرقابی و اولتراسوند حاکی از آن بود که روش استخراج تأثیر به‌سزایی بر میزان کل ترکیبات فنولیک بر حسب اسید گالیک دارد. همان‌طور که در نمودار ۶ مشاهده می‌شود روش اولتراسوند، ترکیبات فنولیک بیشتری را نسبت به روش غرقابی استخراج کرده است (مقدار ترکیبات فنولیک بر حسب اسید گالیک در روش اولتراسوند ۱۵/۲ میلی‌گرم و در روش غرقابی ۱۰/۵ میلی‌گرم اسید گالیک به ازای ۱ گرم از پودر اولیه به دست آمد). می‌توان گفت تنش برشی حاصل از امواج مافوق صوت باعث شکسته شدن مولکول‌های پلیمری بزرگ و در نتیجه باعث استخراج بهتر ترکیبات فنولیک نسبت به روش غرقابی می‌شود. این نتایج با گزارش آلبو و هم‌کاران (Albu et al., 2004) مطابقت دارد، این محققان گزارش کردند که استفاده از روش اولتراسوند باعث افزایش کارنوسیک اسید استخراج شده از رزماری می‌شود.

یاکین و هم‌کاران (Ya-Qin and Chen, 2009) ضمن بررسی روند استخراج ترکیبات فنولیک از نوعی از مرکبات بیان داشتند که استفاده از اولتراسوند باعث افزایش معنی‌داری در استخراج ترکیبات فنولیک نسبت به روش غرقابی شده است. همچنین دزاشیبی (۱۳۸۸) گزارش کردند که روش اولتراسوند ترکیبات فنولیک بیشتری را بر حسب اسید تانیک نسبت به روش اولتراسوند استخراج کرده است.

- from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*. 1100: 1-7.
- Mahdavi, D.I., Deshpande, S.S. and Salunkhe, D.K. 1995. Food antioxidant. Marcel Dekker, inc., New York.
- Manthey, J.A. and Grohmann, K. 2001. Phenols in citrus peel byproducts concentrations of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in citrus peel molasses. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*., 49: 3268-3273.
- Pinelo, M., Rubilar, M. and Jerez. M. 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 Agriculture and Food Chemistry*., 53: 2111-2117.
- Rodrigues, S., Gustavo, A. S. Pinto. 2007. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compound from coconut shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*., 15: 95-100.
- Weisburger, J.H. 1999. Mechanisms of action antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes, and tea. *Food and Chemical Toxicology*., 37: 943-948.
- Yalmiz, Y. and Toledo, R.T. 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 255-260.
- 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.

