نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد پنجم، شماره دوم، ۹۲
۱۱۵-۱۳۰
http://ejfpp.gau.ac.ir

تاثیر شرایط عصاره‌گیری به کمک فراصوت بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از میوه داغداغان (Celtis australis)

زهرا نصیری‌فر[۱]، علیرضا صادقی ماهونک*[۲] و فائزه کمالی[۱]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان،
[۲]استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ؛ تاریخ پذیرش:

چکیده

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 داغداغان با استفاده از سه حلال استخراجی آب، متانول ۸۰ درصد و اتانول ۷۰ درصد بود. براساس نتایج، در روش استخراج با پروب فراصوت، حلال اتانول ۷۰ درصد و زمان ۲۰ دقیقه بیشترین میزان ترکیب‌های فنولی (۰/۰۱۷±۸/۹۰۶ میلی‌گرم معادل اسیدگالیک به گرم نمونه خشک)، فلاونوئیدی (۰/۰۵۶±۳/۳٤۵ معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک) و قدرت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH (۱/۱۲۷±۹٤/۷۲۳ درصد) را نشان داد. کمترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی نیز مربوط به آب ۵ دقیقه با ۰/۱۸٤±٤/۳۱۵ میلی‌گرم معادل اسیدگالیک به گرم نمونه خشک بود. در روش استخراج به کمک حمام فراصوت تیمار متانول ۸۰ درصد در زمان ۹۰ دقیقه با ۰/۰۱۵± ۸/۸۱٦ میلی‌گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی را داشت و نیز تیمار اتانول ۷۰-۹۰ دقیقه با ۰/۰۲۰±۲/۵۳٦ معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک، بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فلاونوئیدی را در بین تیمارها داشتند. کمترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی و قدرت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH در هر دو روش فراصوت مربوط به آب ۳۰ دقیقه (برای حمام فراصوت) و آب ۵ دقیقه (برای پروب فراصوت) بود. نتایج این تحقیق نشان داد

*مسئول مکاتبه: sadeghiaz@yahoo.com

که استخراج به کمک پروب و حمام فراصوت تاثیر متفاوتی در میزان استخراج ترکیبات زیست فعال گیاه داغداغان داشت. در هر روش استخراج، میزان استخراج ترکیبات زیست فعال بسته به نوع حلال متفاوت بود.

واژه‌های کلیدی: استخراج، ترکیبات فنولی، داغداغان، فراصوت

مقدمه

ترکیبات فنولی به فنول‌های ساده، اسیدهای فنولی، مشتقات هیدروکسی سینامیک و فلاونوئیدها طبقه بندی می شوند. عملکرد بسیاری از ترکیبات فنولی به‌عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان قوی توسط محققین گزارش شده است (سرانو و همکاران، ۲۰۰٦). در دهه‌های اخیر علاقه محققین به بررسی حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در محصولات کشاورزی به‌ویژه میوه‌ها و سبزیجات به طور چشمگیری افزایش یافته است. ویژگی‌های سلامتی بخش آنتی اکسیدان‌ها و نقش آنها در پیشگیری از بیماری‌ها دلایل عمده این افزایش بوده است. در واقع آنتی‌اکسیدان‌ها از فرآیند اکسیداسیون که از عوامل بروز بیماری‌هایی همچون سرطان است پیشگیری کرده و از این جهت اثرات خود را بر سلامت انسان می‌گذارند. علاوه بر این، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی معمولاً به‌منظور جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها، در برخی محصولات به‌عنوان افزودنی به آنها اضافه شده که باعث افزایش زمان ماندگاری نیز خواهد شد (شی و همکاران، ۲۰۰۵).

نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بعضی از سبزی‌ها و میوه‌ها به‌طور گسترده به محتوای کل ترکیبات فنولی آن‌ها وابسته است. با اینکه فرآیندهای استخراج ترکیبات فنولی، یک فاکتور اصلی در خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره است اما دما، قدرت استخراج کنندگی حلال، زمان و روش اتخاذ شده برای استخراج به‌طور قابل توجهی ترکیب عصاره را تحت تاثیر قرار می‌دهند (بتانکورت، ۲۰۰۸). این تغییرپذیری به تفاوت در پیوندهای درونی این ترکیبات و به خصوص به قطبیت مولکول‌های تشکیل‌دهنده حلال بستگی دارد. به همین جهت در فرآیند استخراج عواملی چون نوع حلال و زمان استخراج بسیار مهم هستند (هایونی و همکاران، ۲۰۰۷). به علاوه، استخراج مولکول‌ها از مواد بیولوژیک توسط روش‌های معمول به‌عنوان 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 (بتانکورت، ۲۰۰۸). 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 (ونگ و همکاران، ۲۰۰٦). 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 (ویناتورو، ۲۰۰۱). سیستم‌های پروب و حمام دو روش رایج استفاده از امواج فراصوت هستند. در پروب فراصوت نمونه به‌طور 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 می‌تواند بر طیف وسیعی از نمونه‌ها به‌طور همزمان عمل کند و قابلیت تکرارپذیری بالایی دارد (لوکو-گارسیا و همکاران، ۲۰۰۳).

داغداغان درختی است برگ ریز از خانواده Ulmaceae که می‌تواند به میزان ۲۰ تا ۲۵ متر ارتفاع پیدا کند. میوه آن به اندازه فندق است که کم کم پوسته و بدنه میوه سفت می‌گردد و خاصیت درمانی و دارویی زیادی دارد. از برگ و میوه این درخت جهت درمان زخم‌های گوارشی، تسکین دل درد و سرفه و تقویت معده استفاده می‌شود (چیج، ۱۹۸۸؛ چوالیر،۱۹۹٦). 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 داغداغان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد: میوه داغداغان مورد استفاده در این تحقیق در آبان‌ماه ۱۳۹۱ از مناطق جنگلی جنوب غربی شهرستان آمل جمع‌آوری گردید. میوه‌ها پس از شستشو و خشک کردن درآون با دمای٤٠ درجه سانتی‌گراد، توسط آسیاب صنعتی (توس شکن، مدل تی ۳۸۰۰)، به‌صورت پودر درآمدند. نمونه‌های پودر شده تا زمان آزمایش در یخچال با دمای ٤ 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، متانول ۸۰ درصد و اتانول ۷۰ درصد به‌طور

جداگانه با نمونه‌های ۳ گرمی پودر خشک شده داغداغان به نسبت ۱:٦مخلوط شدند و بعد مخلوط‌های بدست آمده در یک حمام اولتراسوند (Starsonic35) برای زمان‌های مختلف (۳۰، ٦۰ و ۹۰ دقیقه) در معرض امواج فراصوت (فرکانس ۲۸-۳٤ کیلوهرتز) قرار گرفتند. سپس عصاره‌های استخراج شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک از مواد جامد گیاهی جدا گردید (مارتینو و همکاران، ۲۰۰٦). عصاره به دست آمده به وسیله تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء (IKA-RV05 Basic ساخت آلمان) در دما ٤۰ 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 به‌دست 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 ۱ ۲۰ درصد و نسبت حلال به نمونه ۱:٦ استفاده شد (اینس و همکاران، ۲۰۱۲). ابتدا به پودرهای خشک شده سنجد زینتی حلال مورد نظر اضافه شده و سپس هر کدام از حلال‌های آب، اتانول ۷۰ درصد و متانول ۸۰ درصد به‌طور 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 به‌دست آمده به‌وسیله تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء (IKA-RV05 Basic ساخت آلمان) در دما ٤۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و در نهایت توسط خشک کن انجمادی (Operun-FDB550 ساخت کره‌جنوبی) در دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد، خشک و به پودر تبدیل شدند. پودرهای فنولی به‌دست آمده تا زمان استفاده در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا و رطوبت در فریزر با دما ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه گیری میزان کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی: مقدار کل ترکیبات فنولی با روش فولین سیوکلته اندازه‌گیری شد (اسلینکارد و سینگلتون، ۱۹۷۷). به‌طور خلاصه ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره (قبل از خشک کردن) با ۱/۱٦۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکلته مخلوط شد. بعد از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد به آن‌ها افزوده شد. لوله‌های آزمایش بعد از تکان دادن، درون حمام آب با دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد قرار

1- Amplitude

گرفته و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (S 2000 UV/VIS) در طول موج ۷٦۰ 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 میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره بیان شد.

مقدار کل ترکیب‌های فلاونوئیدی هر عصاره به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید انجام شد (چانگ و همکاران، ۲۰۰۲). ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره (قبل از خشک کردن) درون لوله آزمایش در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار به آن اضافه شد. در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آنها اضافه گردید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج ٤۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. کوئرستین به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. مقدار فلاونوئید براساس میزان میلی گرم معادل کوئرستین در گرم نمونه خشک گزارش شد.

میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH[2]: اندازه‌گیری توانایی عصاره در مهار رادیکال‌های آزاد به این صورت انجام شد که یک میلی لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت ۰/۱ میلی مولار) به ۳ میلی‌لیتر از عصاره (با غلظت۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) 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 وAs به‌ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند (عربشاهی و اروج، ۲۰۰۷). نمونه کنترل حاوی ۳ میلی‌لیتر متانول به همراه ۱ میلی‌لیتر معرف DPPH بود.

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

تجزیه و تحلیل آماری

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

2- 2 2-Diphenyl-1- picrylhydrazhyl

نتایج و بحث

استخراج ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و DPPH به روش استخراج به کمک حمام 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 درصد معنی‌دار بودند (جدول ۱). در بین حلال‌های مصرفی (اثر اصلی) اتانول و آب به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار کل ترکیب‌های فنولی را دارا بودند که حلال اتانول اختلاف معنی‌داری با حلال متانول نداشت (جدول ۲). همچنین در سطوح مختلف زمان (اثر اصلی)، اختلاف معنی‌داری میان سه زمان ۳۰، ٦۰ و ۹۰ دقیقه مشاهده شد و زمان ۳۰ دقیقه کمترین میزان ترکیب‌های فنولی را داشت (جدول ۳). نتایج نشان داد که افزایش زمان تا ۹۰ دقیقه باعث افزایش مقدار ترکیب‌های فنولی گردید.

در بررسی اثر متقابل حلال در زمان (جدول ٤)، تیمار متانول ۸۰ در زمان ۹۰ دقیقه با ۰/۰۱۵±۸/۸۱٦ میلی‌گرم معادل اسیدگالیک به گرم نمونه خشک بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی را داشت و کمترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی نیز مربوط به آب ۳۰ دقیقه با ۰/۰۸۳±٦/۸٦۰ میلی‌گرم معادل اسیدگالیک به گرم نمونه خشک بود. بین زمان‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بنابراین می توان گفت که در صورت استفاده از متانول به عنوان حلال استخراجی در روش استخراج به کمک اولتراسوند، افزایش زمان استخراج از ۳۰ تا ۹۰ دقیقه، تأثیر معنی داری در میزان استخراج ترکیب‌های فنولی داشت. محققین تفاوت‌های مشاهده شده بین عصاره‌های مختلف را به تفاوت در قطبیت حلال‌های مورد استفاده مربوط می دانند. استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از مواد گیاهی به حلالیت این ترکیبات در حلال‌های مختلف بستگی دارد. به‌علاوه قطبیت حلال‌های مورد استفاده نقش کلیدی را در افزایش حلالیت این ترکیبات بازی می‌کند (سیلوا و همکاران، ۲۰۰٦؛ جوانمردی و همکاران، ۲۰۰۳؛ هانگ و همکاران، ۲۰۰۵).

با بررسی نتایج آنالیز واریانس و نیز مقایسه میانگین مقدار فلاونوئید تیمارهای مختلف، مشاهده شد که اثرات اصلی سطوح مختلف پارامترهای حلال و زمان در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بودند ولی اثرات متقابل حلال و زمان اثر معنی‌داری نداشت (جدول ۱). در مورد ترکیب‌های فلاونوئیدی در سه نوع حلال مصرفی (اثر اصلی)، بیشترین مقدار کل ترکیب‌های فلاونوئیدی مربوط به حلال اتانول بود که با حلال‌های آب و متانول ۸۰ درصد تفاوت معنی‌داری از نظر میزان استخراج داشتند (جدول

۲). در بررسی اثر اصلی سطوح مختلف زمان مشاهده شد که میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی تا زمان ۹۰ دقیقه افزایش یافته بود و تا زمان۹۰ دقیقه افزایش معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد (جدول ۲). در بررسی اثر متقابل حلال در زمان (جدول ٤)، تیمارهای آب–۳۰ دقیقه و اتانول ۷۰–۹۰ دقیقه به‌ترتیب با ۱/٤۱۵±۰/۰۱۳ و ۲/۵۳٦±۰/۰۲۰ معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک، کمترین و بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فلاونوئیدی را در بین تیمارها داشتند. همچنین تفاوت معنی‌داری میان تیمارهای آب ۳۰ دقیقه و آب– ٦۰ دقیقه در سطح احتمال پنج درصد مشاهده نشد.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH بر اساس میانگین مربعات.

منبع تغییرات	درجه آزادی	ترکیبات فنولی	ترکیبات فلاونوئیدی	درصد مهار رادیکال DPPH
حلال	٤	۱/۸۳۲ *	۱/۳٤۰*	۲۹۲/۵۸۲*
زمان	٤	۳/۱۳٤ *	۰/٤۰۱*	٦۹٦/۵۳٤*
حلال × زمان	۲۰	۰/۱۲۵ *	۰/۰۰۵ns	۷٤/٤۵۷ *

*اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد، ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار

با بررسی نتایج آنالیز واریانس و نیز مقایسه میانگین درصد 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 درصد معنی‌دار بودند (جدول ۱). اثر اصلی سه نوع حلال مورد استفاده، بیشترین و کمترین مقدار DPPH به ترتیب مربوط به اتانول ۷۰–۹۰ و آب ۳۰دقیقه بود. میان سه حلال اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۲). در بررسی زمان‌های مختلف (اثر اصلی) بیشترین میزان DPPH مربوط به ۹۰ دقیقه و کمترین مربوط به ۳۰ دقیقه بود (جدول ۳). در بررسی اثر متقابل حلال در زمان (جدول ۳)، تیمارهای آب–۳۰ دقیقه و اتانول–۹۰ دقیقه به‌ترتیب با ٦۸/۰۸٤±۱/۳٦۲ و ۸۷/٤۷۸±۱/۸۷۸ درصد، کمترین و بیشترین میزان استخراج DPPH را در بین تیمارها داشتند.

علت افزایش میزان استخراج ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی و DPPH 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 می‌شود 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 سریعاً از فاز جامد به حلال انتشار پیدا می کنند. علاوه بر این، دیگر اثرها مانند امولسیفیکاسیون، انتشار و صدمه به بافت نیز به افزایش استخراج اجزای مورد نظر از مواد خام کمک می‌کند. به‌طوری که در زمان‌های بالاتر ممکن است به‌دلیل وقوع اکسیداسیون (به علت قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت) میزان استخراج کاهش یابد (راستانگو و همکاران، ۲۰۰۳).

ما 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 ٦۰ دقیقه با شیب زیاد ولی از ٦۰ تا ۱٦۰ دقیقه به آرامی افزایش یافت.

جدول ۲- مقایسه میانگین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط حلال‌های مختلف در روش حمام اولتراسوند

حلال مصرفی	ترکیب‌های فنولی (mg/g dry sample)	ترکیب‌های فلاونوئیدی (mg/g dry sample)	درصد مهار رادیکال DPPH
آب	۷/۱۹۳b	۱/٥٦٥C	۷٤/۷۸٥ C
متانول ۸۰٪	۷/۹۲۰ a	۱/۷۱٤ b	۷۰/٤۰۷ b
اتانول ۷۰٪	۸/۰۱۹ a	۲/۲۹٦ a	۸۱/۷۱٥ a

حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

جدول ۳- مقایسه میانگین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در زمان‌های مختلف در روش حمام فراصوت.

تیمار (زمان (دقیقه))	ترکیب‌های فنولی (mg/g dry sample)	ترکیب‌های فلاونوئیدی (mg/g dry sample)	درصد مهار رادیکال DPPH
۳۰	۷/۲۱۳ C	۱/٦٦۷C	٦٦/۰۲۱ C
٦۰	۷/٥٥٦ b	۱/۸۰۸b	۷۷/٦۰٤ b
۹۰	۸/۳٦۲ a	۲/۰۹۰a	۸۳/۲۸۲a

حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

جدول ٤- مقایسه میانگین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط حلال‌های مختلف و زمان‌های مختلف درروش حمام اولتراسوند

حلال مصرفی در زمان‌های مختلف	ترکیب‌های فنولی (mg/g dry sample)	ترکیب‌های فلاونوئیدی (mg/g dry sample)	درصد مهار رادیکال DPPH
آب-۳۰	٦/٨٦٠±٠/٠٧٣f	١/٤١٥±٠/٠١٣h	٦٨/٠٨٤±١/٣٦٢f
آب-٦٠	٧/٠٦٨±٠/٠٣٦e	١/٤٧٨±٠/٠٥٧gh	٧٦/٩٩٠±٠/٦٣٥cd
آب-٩٠	٧/٦٥٠±٠/١٣٨d	١/٨٠٩±٠/٠٢٣e	٧٩/٢٨١±٠/٦٩٩c
متانول ٨٠-٣٠	٧/٢٤٢±٠/٢٢٣e	١/٥٠٩±٠/٠٥٥g	٥٤/٦١٨±٠/٨٥١g
متانول ٨٠-٦٠	٧/٧٠١±٠/١٦٠d	١/٧٠٩±٠/٠٤٨f	٧٣/٥١٨±٢/٣١٤e
متانول ٨٠-٩٠	٨/٨١٦±٠/٠٥١a	١/٩٢٤±٠/٠٥٧d	٨٣/٠٨٥±٠/١٦٤b
اتانول٧٠-٣٠	٧/٥٣٦±٠/٠١٢d	٢/١٠٦±٠/٠٢٩c	٧٥/٣٦٠±١/٩٠٣de
اتانول٧٠-٦٠	٧/٨١٠±٠/٠٤٩c	٢/٢٤٤±٠/٠٢٩b	٨٢/٣٠٦±٣/١٦٩b
اتانول٧٠-٩٠	٨/٦٢١±٠/٠٧٣b	٢/٥٣٦±٠/٠٢٠a	٨٧/٤٧٨±١/٨٧٨a

میانگین‌های اثر متقابل حلال × زمان دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ٥ درصد هستند.

نتایج استخراج ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و DPPH به 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 معنی‌دار بودند ولی اثرات متقابل حلال و زمان در سطح احتمال ٥ درصد معنی‌دار نبود (جدول ٥). در بین حلال‌های مصرفی (اثر اصلی) اتانول و آب به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار کل ترکیب‌های فنولی را دارا بودند (جدول ٦). همچنین در سطوح مختلف زمان (اثر اصلی)، اختلاف معنی‌داری میان سه زمان ٥، ١٠ و ٢٠ دقیقه مشاهده شد و زمان ٥ دقیقه کمترین میزان ترکیب‌های فنولی را داشت (جدول ٧). نتایج نشان داد که افزایش زمان تا ٢٠ دقیقه باعث افزایش مقدار ترکیب‌های فنولی گردید. در بررسی اثر متقابل حلال در زمان (جدول ٨)، تیمار اتانول ٧٠-٢٠ دقیقه با ٨/٩٠٦±٠/٠١٧ میلی‌گرم معادل اسیدگالیک به گرم نمونه خشک بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی را داشت و کمترین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی نیز مربوط به آب ٥ دقیقه با ٤/٣١٥±٠/١٨٤ میلی‌گرم معادل اسیدگالیک به گرم نمونه خشک بود.

اثرات اصلی سطوح مختلف پارامترهای حلال و زمان معنی‌دار بودند ولی اثرات متقابل حلال و زمان در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نبود (جدول ۵). حلال 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 درصد تفاوت معنی‌داری از نظر میزان استخراج داشتند (جدول ٦). در بررسی اثر اصلی سطوح مختلف زمان مشاهده شد که میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی تا زمان ۲۰ دقیقه افزایش یافته بود و تا زمان۲۰ دقیقه افزایش معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد (جدول ۷). تیمارهای آب–۵ دقیقه و اتانول–۲۰ دقیقه به‌ترتیب با ۰/۰٦٦±۱/۱۰۵ و ۰/۰۵٦±۳/۳٤۵ معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک، کمترین و بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فلاونوئیدی را در بین تیمارها داشتند (جدول ۸).

اثرات اصلی سطوح مختلف پارامترهای حلال و زمان و اثرات متقابل حلال و زمان در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بودند (جدول ۵). اثر اصلی سه نوع حلال مورد استفاده، بیشترین و کمترین مقدار DPPH به‌ترتیب مربوط به اتانول و آب بود. میان سه حلال اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ٦). در بررسی زمان‌های مختلف (اثر اصلی) بیشترین میزان DPPH مربوط به ۲۰ دقیقه و کمترین مربوط به ۵ دقیقه بود (جدول ۷). در بررسی اثر متقابل حلال در زمان (جدول ۸)، تیمارهای آب – ۵ دقیقه و اتانول – ۲۰دقیقه به ترتیب با ۱/۱۸۵±٦۳/٤۵۰ و ۱/۱۲۷±۹٤/۷۲۳ درصد، کمترین و بیشترین میزان استخراج DPPH را در بین تیمارها داشتند.

وانگ 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 درصد، استون و اتانول ۸۰ درصد 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.

آلبو و همکاران (۲۰۰٤) 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 می باشد که احتمالاً به‌دلیل آب موجود در دومی است. در پژوهشی دیگر، فاله و همکاران (۲۰۱۲) نیز دریافتند عصاره اتانولی قدرت مهار رادیکال آزاد بیشتری نسبت به عصاره متانولی دارد.

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH براساس میانگین مربعات در روش پروب فراصوت.

منبع تغییرات	درجه آزادی	ترکیبات فنولی	ترکیبات فلاونوئیدی	درصد مهار رادیکال DPPH
حلال	٤	١١/٣٠٨ *	٣/٢٦٧ *	٧٥٦/٩٤٧ *
زمان	٤	١٣/١٤٨ *	٢/٨٦٧ *	٣٣٤/٨٨١ *
حلال × زمان	٢٠	٠/١٤٦ ns	٠/٠٣٤ ns	١٩/٩٨٨ *

*اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار

جدول ٦- مقایسه میانگین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط حلال‌های مختلف در روش پروب فراصوت

حلال مصرفی	ترکیب‌های فنولی (mg/g dry sample)	ترکیب‌های فلاونوئیدی (mg/g dry sample)	درصد مهار رادیکال DPPH
آب	٥/٤٧٨ c	١/٥٧٦ c	٧٢/٣١٦ c
متانول٨٠٪	٦/٤١٦ b	٢/٢٠٤ b	٨٢/٦٧٣ b
اتانول٧٠٪	٧/٧١٠ a	٢/٧٨٠ a	٩٠/٦٠٤ a

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

جدول ۷- مقایسه میانگین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در زمان‌های مختلف درروش پروب اولتراسوند

تیمار (زمان (دقیقه))	ترکیب‌های فنولی (mg/g dry sample)	ترکیب‌های فلاونوئیدی (mg/g dry sample)	درصد مهار رادیکال DPPH
٥	٥/٤١٦ C	١/٦٥٦ C	٧٥/٧٧٥ C
١٠	٦/٣٧٠ b	٢/١٢٥ b	٨١/٨٤٤ b
٢٠	٧/٨١٧ a	٢/٧٧٩ a	٨٧/٩٧٥ a

حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

جدول ۸- مقایسه میانگین میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط حلال‌های مختلف و زمان‌های مختلف در روش پروب اولتراسوند

حلال مصرفی در زمان‌های مختلف	ترکیب‌های فنولی (mg/g dry sample)	ترکیب‌های فلاونوئیدی (mg/g dry sample)	درصد مهار رادیکال DPPH
آب-۵	٤/۳۱۵±۰/۱۸٤g	۱/۱۰۵±۰/۰٦٦e	٦۳/٤۵۰±۱/۱۸۵g
آب-۱۰	۵/۲٤۰±۰/۱۰۹f	۱/۵٤٦±۰/۱۳۸d	۷۳/۰۲۰±۲/٦۳۰f
آب-۲۰	٦/۸۷۸±۰/۰۸۱c	۲/۰۷٦±۰/۰۵٦c	۸۰/٤۷۸±۰/۵۸۵d
متانول ۸۰-۵	۵/۵۰۷±۰/۱۸٤ef	۱/۵۵۹±۰/۳۳۹d	۷٦/۳۵۰±۱/۹۵۷e
متانول ۸۰-۱۰	٦/۰۷٤۷±۰/۰٦۳de	۲/۱۳٦±۰/۱۵٤c	۸۲/۹٤۷±۰/۱۳۳c
متانول ۸۰-۲۰	۷/٦٦۷±۰/۵٦۷b	۲/۹۱۸±۰/۰٤۱B	۸۸/۷۲۳±۱/۵۳۹b
اتانول۷۰-۵	٦/٤۲۷±۰/۱۰٤cd	۲/۳۰۳±۰/۱٦۱c	۸۷/۵۲۵±۰/۵۱۹b
اتانول۷۰-۱۰	۷/۷۹۸±۰/۹۱۲b	۲/٦۹۳±۰/۱۹۲b	۸۹/۵٦۵±۱/۱۸۵b
اتانول۷۰-۲۰	۸/۹۰٦±۰/۰۱۷a	۳/۳٤۵±۰/۰۵٦a	۹٤/۷۲۳±۱,۱۲۷ a

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

نتیجه‌گیری

فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی به میزان قابل توجهی تحت تاثیر ماهیت حلال، زمان استخراج و تعامل 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 میوه داغداغان داشت. در هر روش استخراج، میزان استخراج ترکیبات زیست فعال بسته به نوع حلال متفاوت بود. در روش استخراج با پروب فراصوت، حلال اتانول ۷۰ درصد و زمان ۲۰ دقیقه بیشترین میزان ترکیب‌های فنولی (۸/۹۰٦±۰/۰۱۷ میلی‌گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک)، فلاونوئیدی (۳/۳٤۵±۰/۰۵٦معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک)

و قدرت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH (۱/۱۲۷±۹٤/۷۲۳ درصد) را نشان داد. در روش استخراج به کمک حمام فراصوت تیمار اتانول ۷۰- ۹۰ دقیقه با ۰/۰۲۰±۲/۵۳٦ معادل کوئرستین به گرم نمونه خشک، بیشترین میزان استخراج ترکیب‌های فلاونوئیدی را در بین تیمارها داشتند و بیشترین میزان استخراج DPPH نیز مربوط به تیمار اتانول-۹۰ دقیقه با میزان ۱/۸۷۸±۸۷/٤۷۸ بود. بنابراین در تمامی روش‌های استخراج حلال اتانول ۷۰ درصد بهترین حلال برای استخراج ترکیبات مورد نظر بود.

منابع

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. and 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. and Urooj, A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morusindica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102: 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. and Chern, J. 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Food and Drug Analysis*, 10: 178-182.

Chevallier, A. 1996. The Encyclopedia of Medicinal Plants. NewYork: DK Publishing Inc.; p. 183.

Chiej, R. 1988. The Macdonald Encyclopedia of Medicinal Plants. Macdonald and Co (Publishers) Ltd; London and Sydney: p. 240.

Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, M.E., Abdelly, C.H. and Magné, C.H. 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.

Hayouni, 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 (3):1126–1134.

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

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

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

Martino, E., Ramaiola, I. and 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.

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

Serrano, J., Goñi, I. and Saura-Calixto, F. 2006. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Research International*, 40: 15–21.

Shi, J., Nawaz, H., Pohorly, J. and Mittal, G. 2005. Extraction of Polyphenolics from Plant Material for Functional Foods–Engineering and Technology. *Food Reviews International*, 21:p. 1–12.

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

total phenolic contents of Iranian Ocimum accessions. *Food Chemistry*, 83:547–550.

Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrasonics Sono chemistry*, 8: 303-313.

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

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

EJFPP, Vol. 5 (2): 115-130
http://ejfpp.gau.ac.ir

Effect of extraction condition with two ultrasonic methods on phenolic, flavonoids and DPPH free radical scavenging of Celtis australis extract

Z. Nasirifara[1], A.R. Sadeghi Mahoonakb*[2] and F. Kamalia[1]
[1]M.Sc student of Food Sciences and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Associate Prof., Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

Abstract

Plants are rich source of phenolic compounds (phenolic acids, flavonoids and tannins) that are most important natural antioxidants. In the present study two ultrasonic methods including probe and bath were used for the extraction of phenolic and flavonoid compounds from Celtis australis. The effects of different extraction time including 30, 60 and 90 min (bath method) and 5, 10 and 20 min (probe method) on extraction of phenolic and flavonoid compounds were evaluated and then the ability of extracts to scavenge DPPH free radical were evaluated using three extraction solvent of water, 80% methanol and 70% ethanol. The results showed that in the probe method of ultrasonic, the highest phenolic compound (8.906±0.017 milligrams gallic acid/ g dry sample), the flavonoid (3.35±0.056 mg of quercetin/g of dry sample) and DPPH radical scavenging activity (94.723±1.127 mg of quercetin/g of dry sample) and DPPH radical scavenging activity (94.74%) were obtained using 70% ethanol within 20 minutes extraction. The minimum extraction of phenolic compounds was obtained using water for 5 minutes with 4.315±0.184 milligrams gallic acid/ g dry sample. In the ultrasound bath, the highest extraction rate of phenolic compounds (8.816±0.015 mg gallic acid equivalent/ g dry sample) was extracted using 70% ethanol for 90 minutes. The ethanol 70-90 minutes with 2.536±0.02 mg of quercetin/ g of dry sample showed the highest extraction rate of flavonoid compounds between all treatments. The minimum extraction of phenolic, flavonoid, DPPH radical scavenging activity was obtained using water -30 minutes (for ultrasonic Bath) and water - 5 minutes (for ultrasonic probe). Results showed that two methods of ultrasound had different effect on extraction of bioactive compound from Celtis australis. In each extraction method, the extraction rate of phenolic and flavonoid compounds were solvent-dependent.

Keywords: Celtis australis, Extraction, Phenolic compounds, Ultrasonic

*Corresponding author; sadeghiaz@yahoo.com