

بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه کاکوتی به کمک امواج فراصوت با روش سطح پاسخ

احمد رجایی^۱، حسین میرزایی مقدم^{۲*}، نوشین برادران^۳

۱- استادیار دانشگاه شاهرود، دانشکده کشاورزی، مهندسی علوم صنایع غذایی

۲- استادیار دانشگاه شاهرود، دانشکده کشاورزی، مکانیک بیوسیستم

۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد، رشته مهندسی شیمی گرایش صنایع غذایی، دانشگاه آزاد شاهرود

(تاریخ دریافت: ۹۴/۰۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۴/۱۴)

چکیده

در این پژوهش آزمایشگاهی، بهینه‌سازی فرآیند استخراج ترکیبات فنولیک از گیاه کاکوتی به کمک امواج فراصوتی از طریق آزمون سطح پاسخ انجام شد. برای تعیین ترکیبات فنولیک کل و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به ترتیب از آزمون فولین و به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH استفاده شد. برای بهینه‌سازی فرآیند استخراج از طرح مرکب مرکزی با سه متغیر مستقل شامل زمان (۲، ۶/۵، ۱۳/۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه)، غلظت حلال (۰، ۲۰، ۵۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد آب در اتانول) و نسبت حلال به مواد جامد (۱۰، ۱۴، ۲۰، ۲۶ و ۳۰ حلال بر ماده خشک)، در پنج سطح که شامل ۱۸ آزمون با ۴ تکرار در نقطه مرکزی است، انجام شد. ضرایب تبیین در استخراج ترکیبات فنولیک ۰/۹۸۲۸ و در سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۰/۹۳۰۴ بود. نتایج مربوط به بهینه‌سازی فرآیند استخراج ترکیبات فنولی نشان داد فرآیند استخراجی که در شرایط زمان ۱۸/۲۹ دقیقه، غلظت حلال ۲۲/۱۵٪ و نسبت حلال به ماده خشک ۲۵/۹۵ صورت گرفت، دارای بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنولیک در حدود ۷/۸۱ میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم ماده خشک بود. شرایط بهینه بر حسب درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی، نسبت حلال به ماده خشک ۱۴/۷۷، زمان ۶/۶۶ دقیقه و غلظت حلال ۲۳/۳۷٪ بود که تحت این شرایط میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۱۴/۲۵ درصد به ازای یک گرم از پودر اولیه بدست آمد.

کلید واژگان: گیاه کاکوتی، امواج فراصوت، ترکیبات فنولیک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، بهینه‌سازی

۱- مقدمه

گیاه کاکوتی کوهی که با نام علمی *Ziziphora Clinopodioides* شناخته می‌شود و در کتب طب سنتی ایران به نام "مشک طرامشک" و "صعتر"، از آن نام برده شده است، متعلق به جنس *Ziziphora* و تیره نعناعیان *Lamiaceae* می‌باشد [۱] و به حالت وحشی در مناطق وسیعی از ایران می‌روید [۲]. این گیاه به دلیل خواص مختلف اسانس آن، از نظر ترکیبات تشکیل دهنده و اثرات دارویی متعدد، مورد توجه محققین قرار گرفته است [۳]. در استخراج ترکیبات موثره محصولات کشاورزی یا ضایعات آن‌ها، میزان استخراج ترکیبات فعال آن‌ها از جمله ترکیبات فنولیک، بسیار اهمیت دارد و حضور این ترکیبات در هر محصول چه به صورت طبیعی یا افزودنی، نشان دهنده ارزش غذایی آن محصول در حفظ سلامتی بشر می‌باشد. تحقیقات متعددی در زمینه استخراج این ترکیبات از گیاهان مختلف، با روش‌های سنتی مانند سوکسله و غرقابی و نیز روش‌های نوین مانند استفاده از ماکروویو و یا امواج فراصوت صورت گرفته است [۴]. از آنجا که در روش‌های سنتی زمان فرآیند، طولانی و مقدار حلال مصرفی زیادی می‌باشد و نیز از لحاظ دمایی ایمن نبوده و باعث تجزیه تعدادی از ترکیبات موجود می‌گردند، بنابراین روش‌های استخراج جدید با زمان استخراج کوتاه‌تر، مصرف حلال آلی کمتر و ایجاد آلودگی کمتر، گسترش یافته است [۴]. امروزه استخراج با روش فراصوت به دلیل کارایی بالاتر و میزان مصرف انرژی و آب پایین‌تر به عنوان روشی موثر در فراوری مواد گیاهی، به ویژه ترکیبات با وزن مولکولی پایین تبدیل شده است [۵]. امواج فراصوت به امواج با فرکانس بیش از ۱۸ کیلوهرتز اطلاق می‌شوند که توسط انسان قابل شناسایی نیستند و در دو محدوده قوی (فرکانس پایین: ۱۸ تا ۱۰۰ کیلوهرتز) و ضعیف (فرکانس بالا: ۱۰۰ کیلوهرتز تا ۱۰ مگاهرتز) طبقه‌بندی می‌شوند. امواج فراصوت با فرکانس پایین در صنایع غذایی دارای کاربردهای متعددی می‌باشند. مهم‌ترین تفاوت امواج فراصوت مورد استفاده در فراوری یا آنالیز ترکیبات غذایی، شدت آن‌ها می‌باشد [۶].

بهینه‌سازی فرآیندهای استخراج از طریق به‌کارگیری روش‌های آماری چند متغیری، صورت می‌پذیرد که رایج‌ترین روش چندمتغیری برای این منظور روش سطح پاسخ^۱ می‌باشد [۷]. روش سطح پاسخ، روشی مفید است که جهت بهینه‌سازی فرآیندهای غذایی به کار گرفته می‌شود. تجزیه و تحلیل سطح پاسخ اثرات مابین متغیرهای مستقل را به تنهایی یا در ترکیب با سایرین تعریف می‌نماید. به علاوه این روش می‌تواند مدلی رگرسیونی که دقیقاً کل فرآیند را توصیف می‌کند ایجاد نماید [۸]. در تحقیقی، بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی دانه انگور به کمک امواج فراصوت تحقیقی صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت اتانول ۵۰ درصد، دمای ۶۰/۶ درجه سلسیوس و زمان ۳۰/۵ دقیقه می‌باشد [۹]. نتایج حاصل از تحقیقی دیگر بر روی بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گندم کامل و سبوس آن نشان داد که بهترین شرایط استخراج غلظت اتانول ۵۳ درصد، دمای ۶۱ درجه سلسیوس و زمان ۶۴ دقیقه برای گندم کامل و برای سبوس گندم غلظت ۴۹ درصد، دمای ۶۴ درجه سلسیوس و زمان ۶۰ دقیقه بود [۱۰]. در پژوهشی، استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی سبوس برنج با کمک امواج فراصوت بهینه‌سازی شد و بهترین شرایط استخراج در این تحقیق غلظت اتانول ۶۷-۶۵ درصد، دمای ۵۴-۵۱ درجه سلسیوس و زمان ۴۵-۴۰ دقیقه حاصل شد [۱۱]. در تحقیقی دیگر، بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولیک پوست سبز پسته را با کمک امواج فراصوت انجام شد. بهترین شرایط استخراج نسبت حلال به مواد جامد ۲۰، دمای ۶۵ درجه سلسیوس و زمان ۲۵ دقیقه بود [۱۲]. حیدری مجد و همکاران (۲۰۱۵) شرایط استخراج به کمک امواج فراصوت ترکیبات فنولیک پونه گاوی را بررسی کردند. نتایج نشان داد که با افزایش دما و زمان و کاهش پ‌هاش میزان استخراج ترکیبات فنولیک بیشتر شد و بهترین راندمان در ۵۵-۳۵ دقیقه، دمای ۴۵-۳۵ درجه سلسیوس راد و پ‌هاش ۶/۵-۶ صورت گرفت [۱۳].

لذا با توجه به مطالب مذکور در تحقیق حاضر، اثر متغیرهای زمان، غلظت حلال و نسبت حلال به مواد جامد بر میزان

۲-۳- اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولیک

در این روش ابتدا ۴۰ میکرولیتر از محلول عصاره را به همراه ۳/۱۶ میلی‌لیتر آب مقطر در لوله آزمایش ریخته سپس ۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین برداشته و به آن اضافه می‌کنیم. بعد لوله آزمایش را برای مدت کمی روی شیکر گذاشته و بعد ۵ دقیقه در جای تاریک قرار می‌دهیم. سپس ۶۰۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات ۲۰ درصد به آن اضافه کرده و دوباره برای مدت کمی روی شیکر گذاشته و بعد ۲ ساعت در تاریکی قرار داده و سپس جذب محلول را توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. مقدار کل ترکیبات فنولی بر اساس معادله به دست آمده از منحنی استاندارد کالیبراسیون اسید گالیک بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان شد. تمامی مراحل را در سه تکرار انجام و میانگین آن‌ها گزارش شد [۱۴].

۲-۴- اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

ارزیابی مهار رادیکال‌های DPPH که در واقع اندازه‌گیری توانایی ترکیبات احیاکننده مانند فنول‌ها جهت انتقال اتم هیدروژن به رادیکال می‌باشد، معمول‌ترین روش برای محاسبه فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. اساس این روش بر پایه بی‌رنگ شدن محلول DPPH است که توسط آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره انجام می‌شود. برای تعیین فعالیت آنتی‌رادیکالی از طریق آزمون DPPH از معرف ۲و۲-دی فنیل پیکریل هیدرازین انجام می‌شود. شرایط کار به این صورت بود که ۳۰ میکرولیتر از عصاره در غلظت‌های مختلف را به ۴ سی سی از ۰,۰۰۰۰۹ مولار رادیکال آزاد DPPH اضافه و ۱۲۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد و سپس جذب آن در ۵۱۷ نانومتر با استفاده از طیف سنج خوانده شد. به همراه آن یک نمونه حاوی ۳۰ میکرولیتر متانول به همراه ۴ میلی‌لیتر محلول DPPH به عنوان نمونه کنترلی استفاده شد. همه نمونه‌ها را در ۳ تکرار انجام شد [۱۴].

در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با رابطه (۱-۲) محاسبه گردید.

استخراج ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل مورد بررسی قرار گرفت و همچنین بهینه‌سازی شرایط استخراج عصاره با حداکثر ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی از گیاه کاکوتی با روش سطح پاسخ انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

این تحقیق در سال ۱۳۹۲ در آزمایشگاه‌های دانشگاه شاهرود و دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود صورت پذیرفته است. بدین منظور، گیاه کاکوتی مورد استفاده در تحقیق حاضر، پس از جمع آوری از کوه‌های شهرستان شاهرود (اوایل خرداد ۱۳۹۲) و جداسازی خار و خاشاک، در دمای اتاق و دور از نور خورشید، به طور کامل خشک و سپس توسط آسیاب برقی (پارس خزر، ایران) پودر شد، سپس از دو الک با مش ۲۵ و ۶۰ میکرون که روی هم قرار گرفته عبور و مقادیری که بین دو الک باقی مانده بود (از الک ۲۵ عبور کرده ولی از ۶۰ عبور نکرده) جمع آوری شد. سپس مقدار ۱ گرم از نمونه الک شده، به دقت توزین شده و در ظروف درب دار در دمای ۱۸- درجه سلسیوس تا زمان آزمایش نگهداری شد. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده با درصد خلوص بالا از شرکت‌های مرک و سیکما-آلدریج تهیه شدند.

۲-۲- استخراج غرقابی به کمک امواج فراصوت

پس از آزمایش‌های مقدماتی، برای تعیین تأثیر نسبت حلال از نسبت‌های ۱۰، ۱۴، ۲۰، ۲۶، ۳۰ (حلال به ماده خشک) در زمان‌های ۲، ۶/۵، ۱۳/۵، ۲۰، ۲۵ (دقیقه) و غلظت‌های ۰، ۲۰، ۵۰، ۸۰، ۱۰۰ (درصد اتانول) که توسط رایانه به صورت کاملاً تصادفی انتخاب شده بود، استفاده و سپس عصاره‌ها در حمام فراصوت قرار داده شد. پس از گذشت زمان مورد نظر عصاره‌ها از یک کاغذ صافی عبور داده شد و آنگاه مقدار دقیق عصاره حاصله با استفاده از مزور اندازه‌گیری شد [۵].

متغیرهای مهم و همچنین دامنه متغیرها با استفاده از آزمایشات مقدماتی تعیین شد و سپس متغیرها مطابق معادله‌ی (۳-۱) کد گذاری شدند:

$$x_i = (X_i - \bar{X}_i) / \Delta X_i \quad (1-3)$$

در اینجا، x_i مقدار بدون بعد متغیر مستقل فرآیند، X_i مقدار واقعی متغیر مستقل فرآیند، \bar{X}_i مقدار واقعی متغیر مستقل در نقطه‌ی مرکزی و ΔX_i تغییر پله‌ای است. اعداد حاصل از معادله فوق برای متغیرهای آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است.

سپس بر اساس تعداد فاکتورها و سطوح آن‌ها جدول طرح آماری (۱۸ استخراج با ۴ تکرار در نقطه مرکزی برای محاسبه تکرارپذیری فرآیند) معین شد. نقاط مرکزی سه فاکتور محاسبه گردید و با در نظر گرفتن کدهای درج شده، ۱۸ استخراج از نظر زمان، نسبت حلال و غلظت معین شد و سپس آزمایش‌ها به صورت تصادفی انجام شد (جدول ۲).

۳-۱-۲- برآزش مدل

پس از بررسی نتایج به دست آمده و مقایسه میان مدل‌های رگرسیونی نتایج حاکی از آن بود که مدل درجه دوم برای تمامی آزمون‌های اندازه‌گیری شده در این مطالعه، دارای اختلاف معنی‌دار با سایر مدل‌ها بود؛ و این مدل تنها مدلی بود که فقدان برآزش^۴ برای آن معنی‌دار نشده بود. در نتیجه مدل درجه دوم برای بررسی روند تغییرات پارامترهای اندازه‌گیری شده در این مطالعه انتخاب شد.

به طور متداول جهت بررسی صحت مدل از ضریب تبیین (R^2) و آزمون عدم برآزش استفاده می‌شود.

معنی‌دار بودن آزمون فقدان برآزش برای یک مدل بیانگر این است که نقاط به خوبی اطراف مدل قرار نگرفته‌اند و نمی‌توان از مدل برای پیش‌گویی مقادیر متغیرهای تابع استفاده نمود؛ بنابراین با عدم معنی‌داری آزمون عدم برآزش، می‌توان دریافت؛ مدل، به خوبی می‌تواند بر داده‌های مورد بررسی برآزش شود. در میان پارامترهای مختلف، پارامتری که بیشترین مجموع مربعات را داشته باشد به عنوان اثرگذارترین پارامتر و برعکس انتخاب می‌شود. جدول ۳ ضرایب همبستگی مربوط به متغیرهای وابسته ترکیبات فنولیک کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان می‌دهد.

(۱) $\times 100$ (جذب کنترل / جذب نمونه - جذب کنترل) = به دام اندازی رادیکال آزاد (%)

۲-۵- طرح آزمایش

به منظور بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولیک از گیاه کاکوتی از روش سطح پاسخ استفاده گردید. به این منظور طرح مرکب مرکزی^۱ با ۵ سطح و ۴ تکرار در نقطه مرکزی مورد استفاده قرار گرفت [۱۵]. متغیرهای مستقل شامل زمان (X_1)، نسبت حلال به ماده خشک (X_2) و غلظت (X_3) بودند. تیمارهای آزمایشی به منظور به حداقل رساندن اثرات تغییرات پیش‌بینی نشده در پاسخ‌های مشاهده شده به صورت تصادفی درآمدند. مدل رگرسیونی چندجمله‌ای درجه دوم به منظور پیش‌بینی پاسخ، در نظر گرفته شد. مدل پیشنهادی برای پاسخ به صورت رابطه (۲-۲) است.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

که Y متغیر وابسته می‌باشد، β_0 ثابت بوده و β_i و β_{ii} و β_{ij} ثابت‌های برآورد شده توسط مدل هستند. X_i و X_j سطح متغیرهای مستقل بوده و آن‌ها به ترتیب نمایانگر اثرات خطی، درجه دوم و متقاطع^۲ متغیرهای X_1 ، X_2 و X_3 روی پاسخ می‌باشند. مدل اثر هر متغیر را روی پاسخ ارزیابی می‌نماید. تجزیه و تحلیل رگرسیونی و واریانس (ANOVA) داده‌های آزمایشی به منظور انطباق مدل رگرسیونی، تعیین ضرایب رگرسیونی و تعیین معنی‌داری آزمون‌های آماری شرایط مدل و نیز ترسیم نمودارها و بهینه‌سازی، توسط نرم افزار Design Expert^۳ صورت پذیرفتند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج بهینه‌سازی شرایط استخراج

۳-۱-۱- انتخاب متغیرهای مهم و محدوده آن‌ها

1. Central Composite Design
2. Cross
3. Design Expert, 7.0.0 trial, Stat-Ease Inc.

4. Lack of fit

Table 1 Independent variables and their coded and actual values used for optimization

Independent variable	Symbol	Coded level				
		-1.68	-1	0	1	1.68
Time (min)	X1	2	6.5	13.5	20	25
Liquid to solid ratio (E/dm)	X2	10	14	20	26	30
Concentration of ethanol (%)	X3	0	20	50	80	100

Table 2 Central composite design for ultrasound assisted extraction (UAE) method

Runs	Independent variable		
	X1 Time (min)	X2 Liquid to solid ratio (E/dm)	X3 Concentration of ethanol (%)
۱	6.5	۱۴	۲۰
۲	۲۰	۱۴	۲۰
۳	6.5	۲۶	۲۰
۴	۲۰	۲۶	۲۰
۵	6.5	۱۴	۸۰
۶	۲۰	۱۴	۸۰
۷	6.5	۲۶	۸۰
۸	۲۰	۲۶	۸۰
۹	۲	۲۰	۵۰
۱۰	۲۵	۲۰	۵۰
۱۱	13.5	۱۰	۵۰
۱۲	13.5	۳۰	۵۰
۱۳	13.5	۲۰	۰
۱۴	13.5	۲۰	۱۰۰
۱۵	13.5	۲۰	۵۰
۱۶	13.5	۲۰	۵۰
۱۷	13.5	۲۰	۵۰
۱۸	13.5	۲۰	۵۰

Table 3 Regression coefficients of predicted quadratic polynomial models for the total phenolics (TP) and antioxidant activity

Coefficient	Total phenolics (TP)	Antioxidant activity
β_0	6.05	11.22
Linear		
β_1	0.59***	-1.32***
β_2	1.05***	-1.24***
β_3	-0.57***	0.47 ^{ns}
Quadratic		
β_{11}	-0.49**	-0.15 ^{ns}
β_{22}	0.086 ^{ns}	-2.12***
β_{33}	-0.47**	-1.27**
Crossproduct		
β_{12}	0.071 ^{ns}	1.61***
β_{13}	-0.025 ^{ns}	1.87***
β_{23}	-0.29 ^{ns}	0.99 ^{ns}
R ^{2a}	۰.۹۸۲۸	۰.۹۳۰۴
Adj R ²	۰.۹۲۱۰	۰.۸۴۱۷

^aCoefficient of multiple determination. **Significant at 1%. ***Significant at 0.1%. ^{ns}Not Significant.

با توجه به نتایج جدول ۳ معادله‌های ۳ و ۴ به ترتیب برای متغیرهای وابسته فنولیک کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت ارائه گردید.

(3)

$$Y = 6.05 + 0.59X_1 + 1.05X_2 - 0.57X_3 - 0.49X_1^2 - 0.47X_2^2$$

(4)

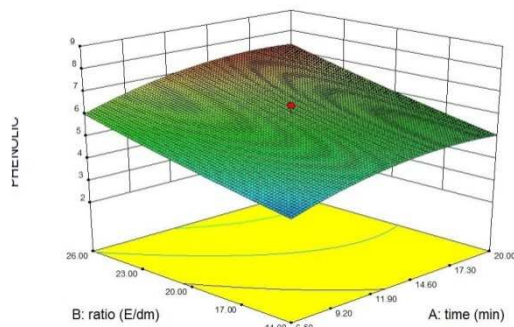
$$Y = 11.22 - 1.32X_1 - 1.24X_2 + 1.61X_1X_2 + 1.87X_1X_3 - 2.12X_2^2 - 1.27X_3^2$$

۳-۱-۳- تجزیه سطوح پاسخ و اثر فاکتورهای مختلف

بر میزان فنولیک کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۳-۱-۳- اثر همزمان زمان و نسبت حلال

در شکل (۱) اثر همزمان دو متغیر زمان و نسبت حلال بر راندمان استخراج ترکیبات فنولی از گیاه کاکوتی نشان داده شده است.



ضریب تبیین مدل (R^2) مربوط به فنولیک کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب ۰/۹۸۲۸ و ۰/۹۳ بود که نشان می‌دهد مدل ارائه شده از نظر آماری مناسب داده‌ها می‌باشد و نسبت بالایی از تغییرپذیری به وسیله مدل سطح پاسخ به دست آمده با پاسخ‌ها را نیز نشان می‌دهد. بنابراین هرچه مقدار R^2 به یک نزدیک‌تر شود، قدرت مدل برازش یافته در توصیف تغییرات پاسخ به عنوان تابعی از متغیرهای مستقل بیشتر می‌باشد. عبارت‌های معنی‌دار مدل مربوط به فنولیک کل شامل زمان، نسبت حلال و غلظت بود. عبارت‌های مربوط به برهم‌کنش معنی‌دار نبودند. در مدل فعالیت آنتی‌اکسیدانی کلیه پارامترهای درجه دوم، دارای اثر معنی‌داری بودند ($p < 0.01$). مقدار بالای R^2 و $R^2_{adjusted}$ نیز بیانگر قدرت بالای مدل درجه دوم در پیش‌بینی پاسخ‌ها بود (جدول ۳).

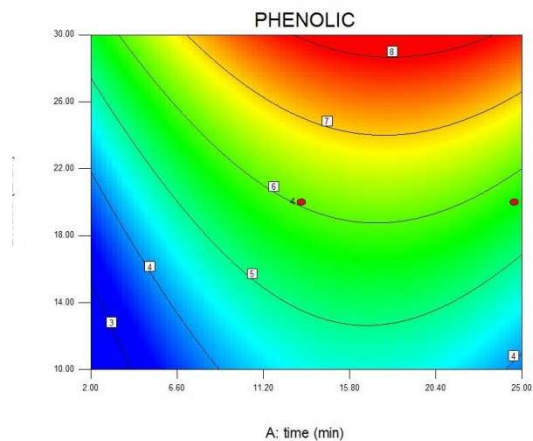


Fig 1 Response surface and contour plot for the effects of liquid to solid ratio and time on the extraction yield of phenolic compounds. The value of the missing independent variable in each plot kept at the center point

با توجه به شکل ۲ با کاهش نسبت حلال درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش پیدا کرده و هرچه به سمت نسبت حلال پایین‌تر (۲۱ V/dm) و زمان پایین‌تر (۹ دقیقه) توأمان پیش می‌رویم به این شدت افزایش اضافه می‌گردد.

با توجه به شکل ۱ از دقیقه ۷ استخراج ترکیبات فنولی آغاز و در زمان ۱۶ دقیقه بیشترین استخراج را شاهد هستیم. با افزایش نسبت حلال تا ۲۳ (حجم به ماده خشک) بیشترین استخراج ترکیبات فنولی را شاهد هستیم.

در شکل (۲) اثر همزمان دو متغیر زمان و نسبت حلال بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داده شده است.

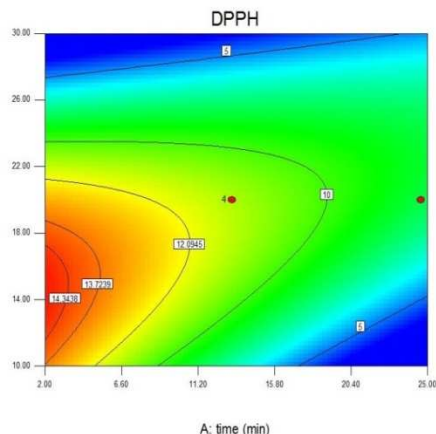
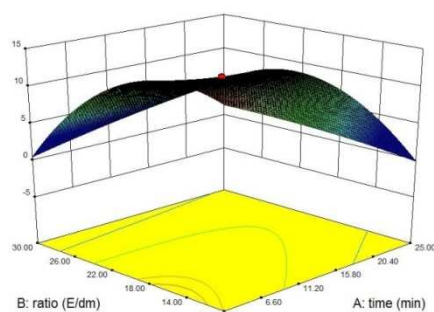


Fig 2 Response surface and contour plot for the effects of liquid to solid ratio and time on the antioxidant activity of extract. The value of the missing independent variable in each plot kept at the center point

دمای ۶۰/۶ درجه سلسیوس و زمان ۳۰/۵ دقیقه می‌باشد [۹]. این در حالی است که نتایج حاصل از تحقیقی دیگر نشان داد که بهترین شرایط استخراج غلظت اتانول ۵۳ درصد، دمای ۶۱ درجه سلسیوس و زمان ۶۴ دقیقه برای گندم کامل و برای سبوس گندم غلظت ۴۹ درصد، دمای ۶۴ درجه سلسیوس و زمان ۶۰ دقیقه بود [۱۰]. در پژوهشی دیگر، بهترین شرایط استخراج، غلظت اتانول ۶۷-۶۵ درصد، دمای ۵۴-۵۱ درجه سلسیوس و زمان ۴۵-۴۰ دقیقه حاصل شد [۱۱].

۳-۱-۲- اثر همزمان غلظت و زمان

شکل (۳) منحنی سطح پاسخ و کانتور اثر متقابل غلظت و زمان روی میزان استخراج ترکیبات فنولیک گیاه کاکوتی نشان داده شده است.

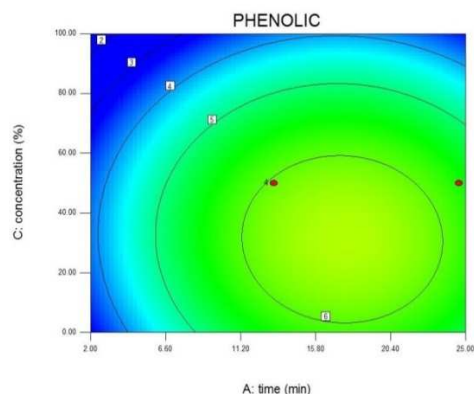
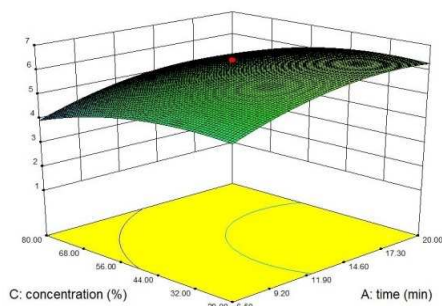


Fig 3 Response surface and contour plot for the effects of concentration and time on the extraction yield of phenolic compounds. The value of the missing independent variable in each plot kept at the center point

آنتی‌اکسیدانی افزایش پیدا می‌کند. بطوریکه در زمان کمتر از ۸ دقیقه و غلظت کمتر از ۵۵٪ درصد بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد.

پینلو و همکاران (۲۰۰۵) بیان داشتند که افزایش زمان استخراج به طور معنی‌داری بر روی میزان استخراج ترکیبات فنولیک به ترتیب بر روی توت آسیاب شده و تفاله انگور موثر است [۱۶]. یاکین و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که با افزایش دما و زمان استخراج (تا حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد) افزایش در میزان استخراج ترکیبات از پوست نوعی از مرکبات (citrus) 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 [۱۷]. در تحقیقی نتایج نشان داد که حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت اتانول ۵۰ درصد،

با توجه به شکل ۳ افزایش همزمان زمان و غلظت حلال تأثیر ناچیزی بر خروج ترکیبات فنولی داشت. مطابق شکل ۴ با کاهش غلظت حلال و زمان مقدار فعالیت

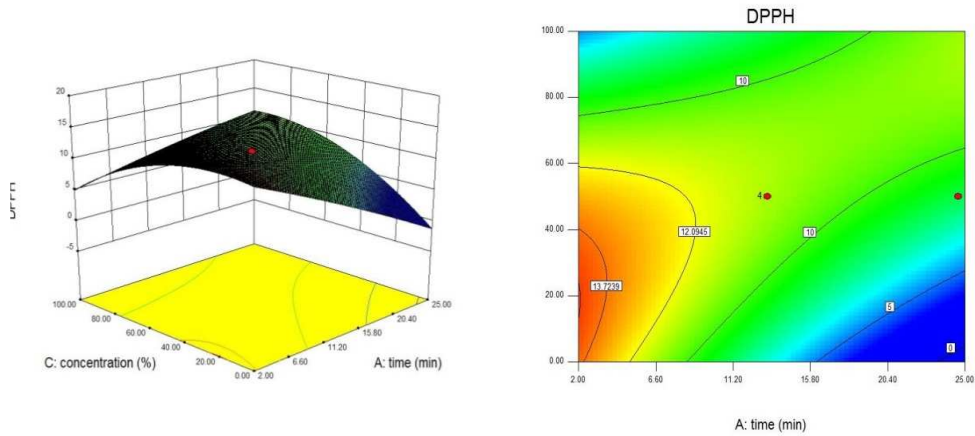


Fig 4 Response surface and contour plot for the effects of concentration and time on the antioxidant activity of extract. The value of the missing independent variable in each plot kept at the center point

در تحقیقی که توسط سیلوا به منظور بهینه‌سازی اثر متقابل سه فاکتور غلظت حلال، دما و زمان استخراج به منظور استخراج ترکیبات فنولیک از برگ گیاه *inga edulis* (گیاهی در شمال آمریکا) به وسیله طرح سطح پاسخ داشتند مشخص شد که با افزایش غلظت و دمای استخراج مقدار استخراج ترکیبات فنولیک افزایش می‌یابد [۱۸]. در تحقیقی، بهترین شرایط استخراج نسبت حلال به مواد جامد ۲۰، دمای ۶۵ درجه سلسیوس و زمان ۲۵ دقیقه بود [۱۲]. حیدری مجد و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که با افزایش دما و زمان و کاهش پ-هاش میزان استخراج ترکیبات فنولیک بیشتر می‌شود و بهترین راندمان در ۳۵-۵۵ دقیقه، دمای ۳۵-۴۵ درجه سلسیوس و پ-هاش ۶/۵-۶ صورت می‌گیرد [۱۳]. نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که هرچه قدر بافت نمونه سخت تر و خشبی تر باشد زمان بیشتری برای خروج ترکیبات فنولیک مورد نیاز است [۹، ۱۰]. در تحقیق حاضر به دلیل اینکه

نمونه، برگ گیاه کاکوتی بوده و بافت برگ نیز ظریف می‌باشد [۱]، بنابراین بیشتر ترکیبات در زمان‌های اولیه استخراج شده و زمان‌های بیشتر تاثیر چندانی بر روند استخراج نداشته است. علاوه بر این در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی که در زمان‌های کمتر فعالیت بیشتر بوده است. این می‌تواند به خاطر این باشد که در زمان‌های اولیه ابتدا فنولیک‌های ساده که دارای گروه‌های هیدروکسیل بیشتر و به تبع آن فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارند استخراج شده باشد. در مورد اثر غلظت نیز احتمالاً غلظت‌های حلال زیر ۵۵ درصد قطبیت مشابه‌تری با فنولیک‌های با قدرت آنتی‌اکسیدانی بالا دارند و بنابراین توانسته‌اند این ترکیبات را بیشتر استخراج کنند.

۳-۱-۳- اثر همزمان نسبت حلال و غلظت

شکل (۵) منحنی سطح پاسخ و کانتور اثر متقابل نسبت حلال و غلظت روی میزان استخراج ترکیبات فنولیک گیاه کاکوتی نشان داده شده است.

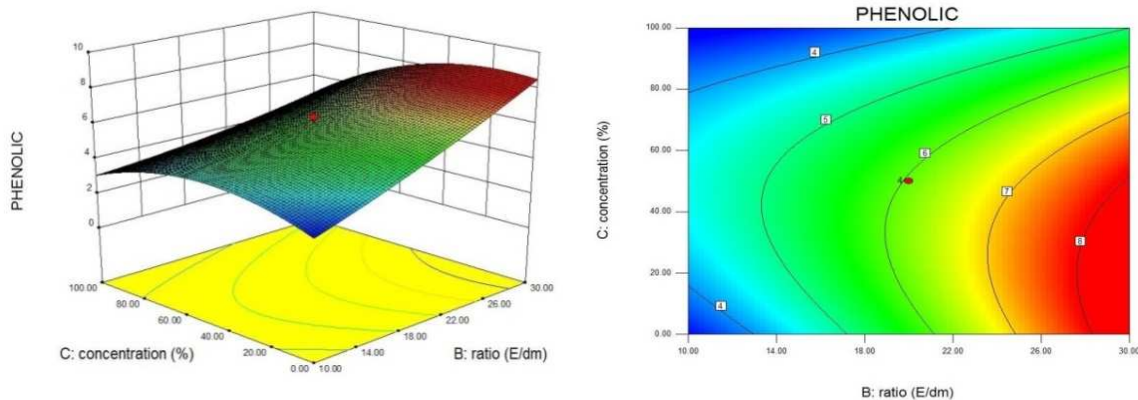
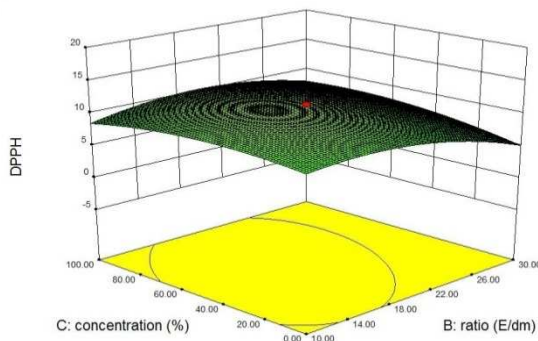


Fig 5 Response surface and contour plot for the effects of concentration and liquid to solid ratio on the extraction yield of phenolic compounds. The value of the missing independent variable in each plot kept at the center point

با توجه به شکل ۶ با کاهش نسبت حلال و غلظت مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر حسب درصد افزایش پیدا کرده است.



با توجه به شکل ۵ در نسبت‌های حلال بیشتر از ۲۳ حجم حلال به ماده خشک و غلظت‌های کمتر از ۶۶٪ بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنولی را شاهد هستیم.

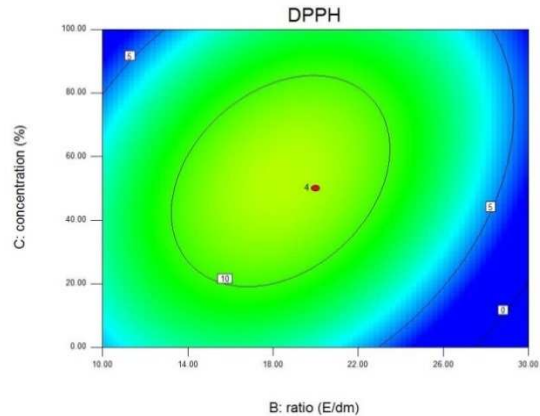


Fig 6 Response surface and contour plot for the effects of concentration and liquid to solid ratio on the antioxidant activity of extract. The value of the missing independent variable in each plot kept at the center point

مقدار زیاد حلال یا مشکل تخریب ترکیبات فنولیک در دماهای بالا وجود دارد، حائز اهمیت است که در این شرایط می‌توان از شرایطی که نزدیک به شرایط بهینه است استفاده کرد.

۳-۱-۲- اعتبارسنجی آزمایش

در روش سطح پاسخ مرحله‌ای به نام اعتبارسنجی وجود دارد، در این مرحله می‌بایست مقدار استخراج ترکیبات فنولی کل و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در مرحله آزمایش با مقدار پیشگویی شده توسط مدل به طریق آماری مقایسه نمود.

مقایسه مقادیر مشاهده شده (Y_0) با مقادیر پیش‌بینی شده (Y) در شکل ۷ و ۸ آمده است؛ مشاهدات، بیانگر همبستگی بسیار خوب بین نتایج به دست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش‌بینی شده با روش آماری است.

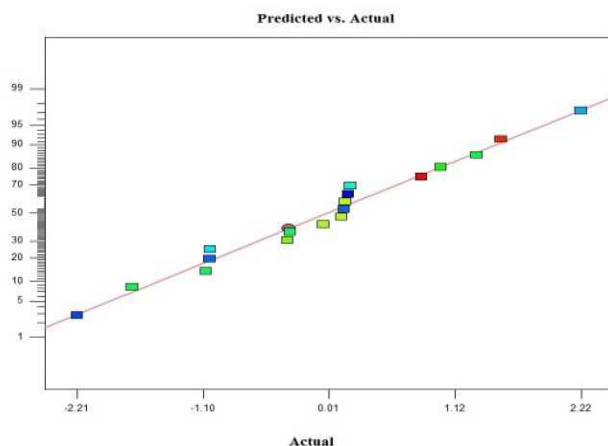


Figure 7 Comparison of the observed and predicted values of antioxidant activity

نتایج حاصل از تحقیقات رحیمی پناه و همکاران در ارزیابی برخی عوامل مؤثر بر میزان عصاره و ترکیب‌های فنولی پوست سبز گردو نشان داد که افزایش زمان استخراج منجر به افزایش میزان استخراج ترکیب‌های فنولی و در بررسی اثر غلظت حلال، مشخص شد که با کاهش غلظت متانول از ۱۰۰٪ به ۶۰٪ میزان ترکیب‌های فنولی استخراجی افزایش می‌یابد [۱۹].

۳-۱-۱- تعیین شرایط بهینه فنولیک کل و فعالیت آنتی

اکسیدانی

به منظور تأیید ظرفیت پیش‌بینی مدل، میزان فنولیک در شرایط بهینه‌ی ارائه شده توسط مدل اندازه‌گیری شد. در طی آزمون‌های مربوط به بهینه‌سازی فرآیند استخراج ترکیبات فنولی، فرآیند استخراجی که در شرایط زمان، ۱۸/۲۹ دقیقه، غلظت حلال، ۲۲/۱۵٪ و نسبت حلال، ۲۵/۹۵ حجم به ماده خشک، صورت گرفت، دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولیک از عصاره ۷/۸۱ میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم ماده خشک بود. شرایط بهینه برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، نسبت حلال ۱۴/۷۷ حجم حلال به ماده خشک، زمان ۶۶/۶ دقیقه و غلظت حلال ۲۳/۳۷٪ بود که تحت این شرایط میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۱۴/۲۵ درصد به ازای میلی‌گرم فنولیک اسید به دست آمد. از نظر فن‌آوری، شرایط دیگری که نتایج نزدیک به شرایط بهینه را ارائه می‌کند، می‌تواند مطلوب باشند. این مسئله وقتی که برخی اشکالات مربوط به فرآیند همانند استفاده از

۵- منابع

- [1] Mozafarian, V. (1997). Culture of plant names. Tehran Contemporary Culture Press. 22 pp.
- [2] Zargari, A. (1995). Iranian medicinal plants. Tehran university press. Tehran. Iran. 4: 103- 105.
- [3] Naghibi, F. Mosaddegh, M. Mohammadi Motamed, S. Ghorbani, A. (2005). Labiatae family in folk medicine in Iran from ethnobotany to pharmacology. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2: 63-79.
- [4] Wang, L. and Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends Food Science & Technology, 17: 300-312.
- [5] Rodrigues, S. P. and Gustavo, A. S. (2007). Ultrasound extraction of compounds from coconut (Cocos nucifera) shell powder. Journal of Food Engineering, 80: 869-872.
- [6] Fellows, p. (2000). Food processing technology. 2 edn. CRC press. Boca Raton Boston new York Washington, DC.
- [7] Bezerra, M. A. Santelli, R. E. Oliveira, E. P. Villar, L. S. Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta, 76: 965-977.
- [8] Sumaya-Martinezl, T. Castillo-Morales, A. Favela-Torres, E. Huerta-Ochoa1, S. and Prado-Barragan, L.A. (2005). Fish protein hydrolysates from gold carp (Carassius auratus). A study of hysolysis parameters using response surface methodology. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85: 98-104.
- [9] Ghafoor, K, Choi, Y. H. Jeon, J. Y. and Jo, I. H. (2009). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57: 4988-4994
- [10] Liyana-Pathirana, C. and Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. Food Chemistry 93: 47-56.
- [11] Tabaraki, R, Nateghi, A. (2011). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. Ultrasonics Sonochemistry 18: 1279-1286.

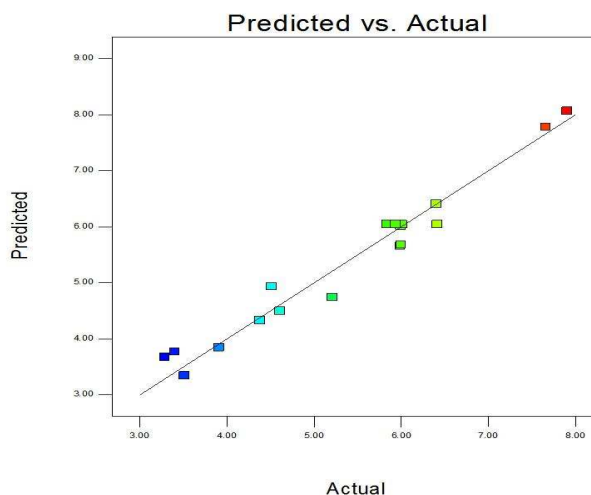


Fig 8 Comparison of the observed and predicted values of total phenolic

۴- نتیجه گیری

بهترین مدل تجزیه و تحلیل آماری در روش سطح پاسخ برای متغیرهای وابسته فنولیک کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مدل درجه دوم بود که با ضریب تبیین بالایی داده‌ها را برازش داد. در طی آزمون‌های مربوط به بهینه‌سازی فرآیند استخراج ترکیبات فنولی، فرآیند استخراجی که در شرایط زمان ۱۸/۲۹ دقیقه، غلظت حلال ۲۲/۱۵٪ و نسبت حلال به ماده خشک ۲۵/۹۵ صورت گرفت، میزان ۷/۸۱ میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم ماده خشک ترکیبات فنولیک به دست آمد. شرایط بهینه بر حسب درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی، نسبت حلال ۱۴/۷۷ حجم به ماده خشک، زمان ۶۶/۶ دقیقه و غلظت حلال ۲۳/۳۷٪ بود که تحت این شرایط میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۱۴/۲۵ درصد به ازای یک گرم از پودر اولیه به دست آمد. نمودارها نشان دادند که روند رو به افزایش استخراج ترکیبات فنولیک در شرایطی است که نسبت حلال رو به افزایش و زمان و درصد غلظت تا مقادیر معلوم افزایش یابد. روند افزایش درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شرایطی بود که درصد غلظت، نسبت حلال و زمان رو به کاهش باشد. در بررسی نتایج آزمون‌های انجام‌شده فاکتور نسبت حلال به مواد جامد در مدل مربوط به فنولیک کل و زمان در مدل مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدانی به عنوان تأثیرگذارترین فاکتورها شناسایی شدند.

- [16] Pinelo, M. Rubilar, M. Jerez, sinero, J. Núñez, M. J. (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*, 53:6 2111-2117.
- [17] Ya-Qin, M. Jian-Chu, C. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compound of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Journal of Ultrasonics Sonochemistry*. 16: 57-62.
- [18] Silva, E. M. Roges, H. and Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *ingá edulis* leaves using response surface methodology. *Journal of Separation and Purification Technology*. 55: 381-387.
- [19] Rahimi-Panah, M. Hamed, M. Mirzapour, M. (2013). Evaluation of factors affecting the extraction of phenolic compounds from skin. *Quarterly Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 27:3. 419-430.
- [12] Rajaei A, Barzegar M, Hamidi Z, Sahari MA. Optimization of extraction conditions of phenolic compounds from pistachio (*Pistachia vera*) green hull through response surface method. *J. Agric. Sci. Technol.* 12: 605-615 (2010)
- [13] Heydari Majd, M, Rajaei, A, Salar Bashi, D, Mortazavi, S. A. and Bolourian, S. (2014). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine pennyroyal (*Phlomischema parviflorum*) leaves using response surface methodology. *Industrial Crops and Products* 57: 195–202.
- [14] Lin, J. Y. and Tang, C. Y. (2007). Determination of total phenolic & flavonoid contents in selected fruits & vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101: 140-147.
- [15] Myers, R. H. and Montgomery, D. C. (2002). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Design Experiment s*. 2nd Edition. John Wiley & Sons, New York. 235-377.

Optimization of Phenolic Compounds and antioxidant activity of the extract of *Ziziphora clinopodioides* using Ultrasound-assisted Extraction with Response Surface Methodology

Rajaei, A. ¹. Mirzaei Moghaddam, H. ^{1*}. Baradaran, N. ²

1. Assistant professor of faculty of agriculture, Shahrood University.

2. M.S graduated of Azad university of Shahrood.

(Received: 2015/04/14 Accepted: 2015/07/05)

In this laboratory study, the optimization process of ultrasound-assisted extraction (UAE) of phenolic compounds of *Ziziphora clinopodioides* was done using response surface methodology (RSM). For the determination of total phenolic compounds and antioxidant activity of the extracts, Folin test and DPPH assay were used, respectively. A central composite design for optimization of process parameters with three independent variables included time (2, 6.5, 13.5, 20 and 25 min), the solvent concentrations (0, 20, 50, 80 and 100% of water in ethanol) and the ratio of solvent to solids (10, 14, 20, 26 and 30 solvents on the dry matter), which includes 18 test at five levels with four replicates at the central point was done. Correlation coefficients (R^2) of the models for total phenolics and antioxidant activity were 0.98 and 0.93, respectively. The results of the optimization for the extraction of phenolic compounds showed that the extraction in terms of time 18.29 min, the solvent concentration of 22.15% and the ratio of solvent to solids 25.95 were the highest amount of phenolic compounds about 7.81 mg of gallic acid equivalents per gram of dry matter. Optimal conditions in terms of antioxidant activity were the ratio of solvent to solids 14.77, time 6.66 min, solvent concentration 23.37%, respectively, under these conditions, the amount of the antioxidant activity of 14.25% per gram of dry matter was obtained.

Key words: *Ziziphora clinopodioides*, Phenolic Compounds, Antioxidant Activity, Ultrasound, Optimization.

*Corresponding Author E-Mail Address: hosseinsg@yahoo.com