

## تأثیر پیش تیمار امواج فراصوت و نوع حلال بر ظرفیت ضد اکسایشی و ترکیبات فنلی قهوه

هادی یوسفی ماکویی<sup>۱</sup>، عباس جلیل زاده<sup>۲\*</sup>، صدیف آزادمرد دمیرچی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، واحد ماکو، دانشگاه آزاد اسلامی، ماکو، ایران

۲- مربی، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، واحد ماکو، دانشگاه آزاد اسلامی، ماکو، ایران

۳- استاد، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، واحد ماکو، دانشگاه آزاد اسلامی، ماکو، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۵/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۸/۲۳)

### چکیده

قهوه یک منبع غنی از متیل گزانتین‌ها نظیر کافئین، هیدروکسی سینامیک اسیدها مخصوصاً اسیدهای کلروژنیک می‌باشد و به خاطر اثرات سلامتی بخش مورد توجه می‌باشد. امواج فراصوت دارای تأثیر مثبتی بر استخراج از بافت‌های گیاهی می‌باشد. در این پژوهش تأثیر پیش تیمار فراصوت و سپس برشته کردن بر استخراج ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و درصد مهار رادیکال‌های آزاد و همچنین تأثیر ترکیب حلال بر میزان استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی قهوه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که اعمال پیش تیمار فراصوت می‌تواند میزان استخراج ترکیبات فنلی را به میزان ۱۱/۹۹٪ در فرکانس ۲۰، ۱۳/۵۲٪ در فرکانس ۴۰ و ۲۲/۸۹٪ در فرکانس ۶۰ کیلوهرتز افزایش دهد. همچنین نتایج نشان داد که پیش تیمار فراصوت می‌تواند میزان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی را برای فرکانس‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ کیلوهرتز به ترتیب ۱۳/۶۵، ۱۸/۴۷ و ۳۰/۰۴ درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش دهد. بالاترین میزان استخراج ترکیبات فنلی مربوط به فرکانس ۶۰ کیلوهرتز و حلال ایزوپروپانول ۶۰٪ بود که معادل ۳۱/۵۱ میلی‌گرم بر گرم اسید گالیک بود. اعمال پیش تیمار فراصوت تأثیر معنی‌داری بر درصد مهار رادیکال‌های آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل داشت ( $P < 0.05$ ). بیشترین میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد مربوط به نمونه پیش تیمار فراصوت با فرکانس ۶۰ کیلوهرتز با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود که با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ضد اکسنده مصنوعی بوتیل هیدروکسی تولوئن برابری داشت (۸۷٪). در بین ترکیب حلال‌های مورد استفاده، ترکیب ایزوپروپانول با آب به نسبت ۶۰ به ۴۰ بالاترین تأثیر را بر میزان استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی داشت. این ترکیب حلال توانست میزان استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را به ترتیب به میزان ۳۷/۵۱ و ۲۸/۱۴ درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش دهد. با توجه به تأثیر ترکیبی امواج فراصوت و حلال ایزوپروپانول، استفاده از این حلال ایزوپروپانول ۶۰ درصد و فرکانس ۶۰ کیلوهرتز می‌تواند به‌عنوان یک روش برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژگان: قهوه، برشته کردن، ترکیبات فنلی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فراصوت

\*مسئول مکاتبات: a.jalilzadeh@iaumaku.ir

## ۱- مقدمه

درخت قهوه متعلق به جنس *Coffea* خانواده (*Rubiacea*) بومی مناطق گرم و استوایی است و دانه قهوه یکی از نوشیدنی‌های رایج در کل جهان بوده و بعد از آب و چای سومین نوشیدنی پرمصرف در جهان به شمار می‌رود [۱]. میزان تولید جهانی این محصول سالانه حدود ۸ میلیون تن بوده و از لحاظ تجاری یکی از محصولات باارزش غذایی به شمار می‌رود. دو نوع قهوه شناخته شده در جهان، قهوه روبوستا و عربیکا می‌باشد. محبوبیت و جذابیت قهوه در سراسر جهان که از عطر و طعم منحصر به فرد آن نشأت می‌گیرد، آن را در حال حاضر به یکی از نوشیدنی‌های مطلوب و پرمصرف در جهان مبدل کرده است. قهوه نیمی از کل صادرات محصولات گرمسیری جهان را تشکیل می‌دهد [۲]. بو دادن قهوه گام خیلی مهم در فراوری قهوه است. چون ویژگی‌های ارگانولپتیکی ویژه (طعم، آروما و رنگ) که تأثیر به‌سزایی در کیفیت قهوه دارد در این مرحله ایجاد می‌شوند. این فرایند به دما و زمان بستگی دارد و منجر به تغییرات متعدد در ترکیب شیمیایی و فعالیت بیولوژیکی قهوه می‌شود [۳].

برخی از بیماری‌های مزمن مانند سرطان، مشکلات قلبی و عروقی، التهاب و آسیب‌های عصبی با استرس اکسیداتیو در ارتباط است [۴]. علاوه بر میوه‌ها و سبزی‌ها، نوشیدنی‌هایی گیاهی از قبیل قهوه به‌عنوان یک منبع مهم آنتی‌اکسیدان‌ها در رژیم غذایی انسان مطرح شده است [۵]. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قهوه هم به آنتی‌اکسیدان‌های موجود در دانه قهوه سبز همانند ترکیبات فنولیک و هم آنتی‌اکسیدان‌های تولیدشده طی فرایند برشته شدن، مانند ملانوییدینها و محصولات دیگر میلارد واکنش نسبت داده می‌شود [۶]. اسیدهای کلروژنیک فراوان‌ترین ترکیبات فنلی قهوه می‌باشد. اسیدهای کلروژنیک نه تنها عامل اسیدیته نهایی و تلخی قهوه هستند بلکه خواص آنتی‌اکسیدانی قوی نیز دارند [۷]. در طی بودادن قهوه، اسیدهای کلروژنیک تا حدی تخریب شده و از طریق پیوندهای کووالانسی یا غیر کووالانسی به ترکیبات ملانوییدینی متصل می‌شود [۸].

استخراج به کمک امواج فراصوت یکی از تکنیک‌هایی است که در مقیاس‌های آزمایشگاهی و صنعتی جهت استخراج مواد مختلفی از جمله روغن، پروتئین، فلاونوئیدها، پلی‌فنل‌ها بکار

گرفته می‌شود. در مقایسه با سایر روش‌های استخراج استفاده از امواج فراصوت ارزان‌تر و کاربرد آن‌ها ساده‌تر است. امواج فراصوت مراحل فرایند استخراج یعنی تورم بافت به‌منظور جذب حلال و نیز خروج ترکیبات از بافت به حلال را از طریق ایجاد منافذ ریز در دیواره سلول‌ها و بهبود انتشار و انتقال جرم؛ تسهیل و تسریع می‌کند از این‌رو استفاده از این امواج در استخراج ترکیبات مختلف از بافت‌های گیاهی، راندمان عمل و سرعت فرایند استخراج را افزایش داده و مصرف حلال را کاهش می‌دهد. در اکثر موارد به دلیل اثرات مکانیکی امواج فراصوت غالباً از آن به‌عنوان عامل کمکی در فرایند استخراج استفاده می‌شود [۹]. استخراج به کمک امواج فراصوت در مقایسه با تکنیک‌های استخراج معمولی مزایای بسیاری از جمله انتخابی بودن، راندمان و بهره‌وری بالا، افزایش کیفیت، کاهش مصرف انرژی، کاهش زمان استخراج و مصرف حلال، کاهش خطرات شیمیایی و فیزیکی و سازگاری با محیط‌زیست دارد [۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳]. در این تحقیق تأثیر پیش تیمار امواج فراصوت با فرکانس‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ کیلوهرتز بر روی ارزیابی فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ترکیبات پلی فنولی و ترکیبات فلاونوئیدی قهوه مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق از حلال آب و همچنین ترکیب دو حلال ایزوپروپیل الکل و آب به نسبت‌های ۵۰:۵۰، ۶۰:۴۰ و ۷۰:۳۰ برای استخراج استفاده شده و تأثیر حلال نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

## ۲- مواد و روش‌ها

## ۲-۱- مواد اولیه

دانه سبز قهوه واریته روبوستا، از شرکت واریته Rio minas محصول کشور برزیل از شرکت ماگوش کافی تهیه شد. سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک و سیگما آلدریج تهیه گردید.

**روش انجام تحقیق:** ۱۰۰ گرم دانه سبز قهوه در یک بشر توزین و سه برابر آن آب مقطر و یا حلال‌های ایزوپروپانول ۸۰٪، ۷۰٪ و ۶۰ درصد اضافه شده و پس از ثبت دما و pH به مدت ۱۰ دقیقه تحت امواج فراصوت با فرکانس‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ کیلوهرتز و قدرت با استفاده از دستگاه اولتراسوند مدل HD2200 ساخت شرکت بندلین آلمان قرار گرفت. سپس دانه قهوه از فاز مایع

## ۲-۴- ارزیابی فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد

### DPP

محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف ۲۵ تا ۲۰۰ ppm از عصاره و آنتی‌اکسیدان سنتزی بوتیل هیدروکسی تولوئن در حلال متانول تهیه شد. یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت یک میلی‌مولار) به ۳ میلی‌لیتر عصاره افزوده و مخلوط حاصل به شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفت. بعد از این مدت، میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. لازم به ذکر است که در نمونه‌ی کنترل، عصاره با ۳ میلی‌لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت، درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه شد.

$$DPPH = 100 \times (A_c - A_s) / A_c$$

در فرمول فوق  $A_c$  و  $A_s$  به ترتیب جذب شاهد و جذب نمونه می‌باشد [۱۶].

## ۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام و داده‌های حاصل با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی تجزیه و تحلیل شدند. آزمون مقایسه‌ی میانگین‌ها نیز با روش توکی در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین تیمارها توسط نرم‌افزار IBM SPSS Statistics version 22 و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel صورت گرفت.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- تأثیر امواج فراصوت بر ترکیبات فنلی قهوه

نتایج حاصل از تأثیر امواج فراصوت (با قدرت ثابت ۷۰٪ و مدت‌زمان ۱۰ دقیقه برای کلیه تیمارها) بر ترکیبات فنلی قهوه که از حلال آب به‌عنوان استخراج‌کننده استفاده شده است، در جدول ۱ آورده شده است. نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که بین تیمارها در استخراج ترکیب‌های فنولی اختلاف معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) وجود دارد. در مرحله بعد برای تعیین دقیق اختلاف میان حلال‌ها از پس‌آزمون به روش دانکن استفاده شد. بالا بودن مقادیر ترکیبات فنلی در دانه برشته‌شده می‌تواند مؤید این باشد که این ترکیبات در هنگام برشته شدن به دلیل انجام واکنش‌های قهوه‌ای شدن افزایش می‌یابند. این موضوع در تحقیق ویگنولی و همکاران (۲۰۱۱) نیز به اثبات رسیده است [۱۷].

جداشده و دانه‌ها در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت خشک گردید. فاز مایع جهت انجام آزمون‌های مورد (میزان ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی) نیاز در ۱۸ درجه سانتی‌گراد زیر صفر نگهداری شد. دانه‌های قهوه سبز پیش تیمار شده با امواج فراصوت و نمونه شاهد با استفاده از دستگاه برشته‌کن مدل Toper در دمای ۲۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه در حد متوسط برشته شد. پس از برشته شدن اندازه‌گیری ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و ارزیابی فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد دی‌پی‌پی‌اچ (DPPH) انجام گرفت.

### ۲-۲- اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل با استفاده از روش فولین سیوکالتیو در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین گردید و نتایج برحسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان شد. به‌طور خلاصه ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره با آب مقطر دیونیزه تا حجم ۷/۵ میلی‌لیتر رقیق شد و ۳۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد. بعد از گذشت ۵ دقیقه ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۲۰٪ به آن‌ها افزوده شده و حجم نهایی با استفاده از آب دیونیزه تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از گذشت ۶۰ دقیقه جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Visible مدل Jenway 6305 در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. از محلول‌های استاندارد اسید گالیک برای کالیبراسیون استفاده شد [۱۴].

### ۲-۳- اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی

مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی از طریق روش رنگ سنجی ارزیابی شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره درون لوله‌آزمایش در ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪ و ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم استات یک مولار به آن اضافه شدند. در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آن‌ها اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. کوئرتستین به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد و مقدار کل فلاونوئیدهای موجود در اسانس بر اساس اکی‌والانت کوئرتستین و به‌صورت میلی‌گرم در گرم عصاره بیان گردید [۱۵].

**Table 1** Effect of ultrasound waves on phenolic compounds of coffee

Increase compared to control (%)	Total phenolic compounds content (mg GA/gr Extract)	Phenolic compounds content in roasted coffee (mg GA/gr Extract)	Phenolic compounds content in solvent phase (mg GA/gr Extract)	Frequency
11.99	22.81±0.19 <sup>b</sup>	15.03±0.14 <sup>b</sup>	7.78±0.05 <sup>b</sup>	20 kHz
13.52	23.12±0.49 <sup>b</sup>	15.46±0.43 <sup>b</sup>	7.66±0.04 <sup>b</sup>	40 kHz
22.89	25.04±0.32 <sup>c</sup>	16.71±0.27 <sup>c</sup>	8.33±0.06 <sup>c</sup>	60 kHz
-	20.37±0.05 <sup>a</sup>	20.37±0.05 <sup>a</sup>	. <sup>a</sup>	Blank

Dissimilar Latin letters indicate a significant difference between treatments at the level of 5%.

باشند. اهمیت دیگر این ترکیبات در قهوه و چای، شرکت آن‌ها در واکنش قهوه‌ای شدن آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشد. نتایج اعمال پیش تیمار امواج فراصوت بر میزان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی در جدول ۲ آورده شده است. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که بین تیمارها در استخراج ترکیب‌های فلاونوئیدی اختلاف معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) وجود دارد.

### ۳-۲- تأثیر امواج صوت بر ترکیبات فلاونوئیدی

ترکیبات فلاونوئیدی ترکیباتی هستند که هسته ساختمانی آن‌ها را بنزو پیرن تشکیل می‌دهد و شامل صدها ترکیب مختلف می‌باشند. بسته به موقعیت اتصال حلقه آروماتیک به هسته بنزو پیرن ممکن است به سه دسته (۱) فلاونوئیدها، (۲) ایزوفلاونوئیدها و (۳) نشوفلاونوئیدها تقسیم‌بندی شوند. این ترکیبات به دلیل داشتن خصوصیت پلی فنلی می‌توانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته

**Table 2** Effect of ultrasound waves on flavonoid content of coffee

Increase compared to control (%)	Total flavonoids compounds content (mg per gr of extract)	Flavonoid compounds content in roasted coffee (mg per gr of extract)	Flavonoid compounds content at solvent phase (mg per gr of extract)	Frequency (kHz)
13.65	7.98±0.72 <sup>c</sup>	5.26±0.05 <sup>c</sup>	2.72±0.22 <sup>c</sup>	20
18.47	8.30±0.46 <sup>c</sup>	5.57±0.41 <sup>c</sup>	2.76±0.08 <sup>c</sup>	40
30.04	9.14±1.09 <sup>b</sup>	6.10±0.08 <sup>b</sup>	3.04±0.29 <sup>b</sup>	60
-	7.03±0.30 <sup>a</sup>	7.03±0.30 <sup>a</sup>	. <sup>a</sup>	Blank

Dissimilar Latin letters indicate a significant difference between treatments at the level of 5%.

منجر به کاهش ترکیبات فلاونوئیدی در واریته‌های مختلف می‌گردد و نمونه‌های برشته‌شده در حد متوسط ترکیبات فلاونوئیدی بالاتری نسبت به نمونه‌های سبز یا برشته نشده خواهد داشت.

### ۳-۳- تأثیر ترکیب‌های مختلف حلال بر میزان

#### ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی قهوه

در این تحقیق به منظور بررسی تأثیر حلال بر میزان استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی قهوه از ترکیب حلال آب و ایزوپروپانول به نسبت‌های ۲۰: ۸۰، ۳۰: ۷۰ و ۴۰: ۶۰ استفاده شد و میزان ترکیبات فنلی کل و فلاونوئیدی مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌های حاصل در جدول ۳ خلاصه شده است. نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که بین نوع حلال‌ها در

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که اولاً مقدار این ترکیبات عمدتاً در برشته شدن به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. دوماً با افزایش شدت فرکانس مقدار استخراج آن‌ها افزایش می‌یابد. نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که تأثیر تغییر فرکانس بر استخراج ترکیبات فلاونوئیدی معنی‌دار بوده است ( $P < 0.05$ ). این نتایج با نتایج از پژوهش هجیموویچ و همکاران (۲۰۱۱) همخوانی دارد [۲]. این محققین ترکیبات پلی فنلی و مقدار کافئین را در واریته‌های مختلف قهوه با تغییر دمای برشته کردن مورد بررسی قرار دادند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که دمای برشته کردن (عمدتاً در دمای بالای ۱۸۰ تا ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد) منجر به تغییرات شیمیایی و فعالیت بیولوژیکی قهوه می‌گردد که آنهم نتیجه واکنش قهوه‌ای شدن میلارد می‌باشد. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که برشته کردن تا حد تیره

تحقیق نیادو و همکاران (۲۰۰۸) همخوانی دارد [۱۸]. این محققین استخراج ترکیبات فنلی و اسیدهای کلروژنیک دو نوع قهوه روبوستا و عربیکا را با استفاده از ترکیب حلال‌های مختلف مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از حلال ایزوپروپانول ۶۰ درصد راندمان استخراج بهتری برای اسیدهای کلروژنیک و ترکیبات فنلی کل دارد.

استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی اختلاف معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) وجود دارد. نتایج نشان داد که تأثیر ترکیب حلال بر میزان استخراج ترکیبات فنلی معنی‌دار بوده و بیشترین میزان استخراج فنلی مربوط به حلال با ترکیب ۶۰ درصد ایزوپروپانول و ۴۰ درصد آب می‌باشد. استفاده از ترکیب حلال ایزوپروپانول با آب به نسبت ۶۰:۴۰ میزان استخراج نسبت به آب را در حدود ۳۷ درصد افزایش می‌دهد. نتایج این پژوهش با نتایج حاصل از

**Table 3** Effect of solvent on phenolic and flavonoid compounds of coffee

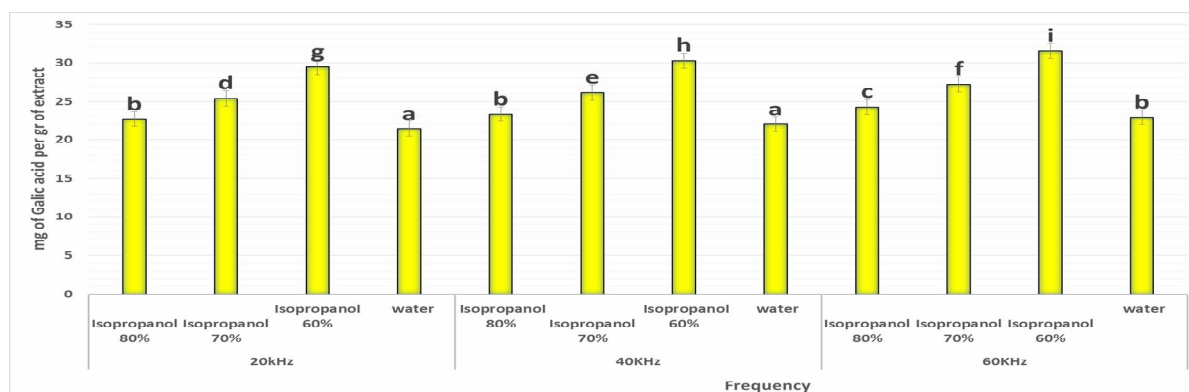
Increase compared to control(%)	Flavonoid compounds (mg per gr of extract)	Increase compared to control(%)	Phenolic compounds (mg GA/gr Extract)	solvent
8.14	7.60±0.66 <sup>a</sup>	6.04	21.6±0.05 <sup>b</sup>	Isopropanol 80%
33.46	9.38±0.60 <sup>b</sup>	18.75	24.19±0.63 <sup>c</sup>	Isopropanol 70%
28.14	9.01±1.24 <sup>c</sup>	37.51	28.01±0.63 <sup>d</sup>	Isopropanol 60%
0	7.03±0.3 <sup>a</sup>	0	20.37±0.05 <sup>a</sup>	water

Dissimilar Latin letters indicate a significant difference between treatments at the level of 5%.

ترکیبات فنلی کمک کند. پژوهشی که توسط اوپاداهایی و همکاران (۲۰۱۲) صورت گرفت [۱۹]، تأثیر پیش تیمار امواج میکروویو با توان ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ وات و حلال‌های آب، متانول و اتانول بر روی ترکیبات مختلف قهوه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد میزان استخراج با حلال آب بالاتر از حلال اتانول و متانول بود و افزایش توان امواج میکروویو در مدت‌زمان ۵ دقیقه می‌تواند میزان استخراج ترکیبات ملانویئیدی، اسیدهای کلروژنیک و کافئین را افزایش دهد. نتایج پژوهش حاضر تا حدودی با نتایج محققین فوق همخوانی دارد.

### ۳-۴- تأثیر امواج فراصوت و ترکیب حلال‌های مختلف بر میزان ترکیبات فنلی

نتایج اعمال فرکانس‌های مختلف با ترکیب‌های مختلف از حلال ایزوپروپانول و حلال بر میزان ترکیبات فنلی در شکل ۱ آورده شده است. نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که بین نوع حلال‌ها و تیمارهای فراصوت در استخراج ترکیب‌های فنولی اختلاف معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) وجود دارد. بالاترین میزان استخراج مربوط به ایزوپروپانول ۶۰٪ و فرکانس ۶۰ کیلوهرتز می‌باشد. همچنین نتایج نشان می‌دهد افزایش شدت اعمال امواج فراصوت می‌تواند با آسیب دیواره سلولی به استخراج بهتر



**Fig 1** Effect of ultrasound and different solvents on phenolic compounds content of coffee

آنتی‌اکسیدانی) در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ (ppm) از طرح بلوک تصادفی کامل استفاده شد. نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فرکانس‌های مختلف اختلاف معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) وجود دارد. این نتایج در شکل ۲ آورده شده است. همچنین تأثیر غلظت‌ها و اثر متقابل بین فرکانس‌ها و غلظت‌ها کاملاً معنی‌دار است. RSA عصاره قهوه پیش تیمار شده با فرکانس ۶۰ کیلوهرتز بالاتر از بقیه پیش تیمارها بود. درصد مهارکنندگی این عصاره در غلظت ppm 200 معادل غلظت مهارکنندگی آنتی‌اکسیدانی سنتزی BHT در غلظت 25 ppm بود. نتایج این پژوهش با نتایج تحقیق اوپاداهیایی و همکاران (۲۰۱۲) و نیادو و همکاران (۲۰۰۸) همخوانی دارد [۱۹ و ۱۸].

### ۳-۵- تأثیر امواج فراصوت بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال عصاره قهوه

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد توسط عصاره قهوه با استفاده از سیستم DPPH اندازه‌گیری شد. اساس این روش بر این اصل استوار است آنتی‌اکسیدان‌های قهوه با رادیکال آزاد پایدار یعنی ۱،۱ دی فنیل ۲- پیکریل هیدرازین که به رنگ بنفش تیره است واکنش داده و سبب بی‌رنگ شدن می‌شود. درجه بی‌رنگ شدن پتانسیل مهارکنندگی رادیکال را نشان می‌دهد. RSA عصاره بر حسب درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH محاسبه شد. غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm از عصاره تهیه و RSA ارزیابی شد. به منظور بررسی آماری تأثیر امواج فراصوت بر درصد مهار رادیکال‌های آزاد (ظرفیت

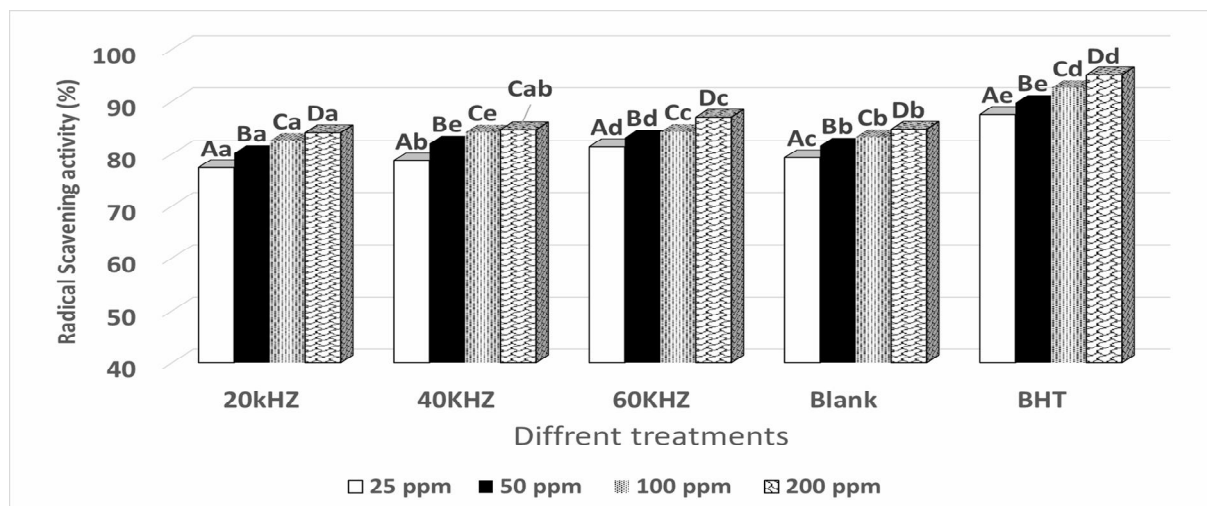


Fig 2 Effect of ultrasound pretreatment on free radical scavenging activity

ایزوپروپانول و ۴۰ درصد آب بود. نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که بین نوع حلال‌ها و تیمارهای فراصوت در استخراج ترکیب‌های فنولی اختلاف معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) وجود دارد. نتایج نشان می‌دهد که بالاترین میزان استخراج مربوط به ایزوپروپانول ۶۰٪ و فرکانس ۶۰ کیلوهرتز می‌باشد. تأثیر امواج فراصوت بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد نیز معنی‌دار بود. RSA عصاره قهوه پیش تیمار شده با فرکانس ۶۰ کیلوهرتز بالاتر از بقیه پیش تیمارها بود. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که استفاده از پیش تیمار فراصوت می‌تواند ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، استخراج

### ۴- نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که تأثیر امواج فراصوت در فرکانس‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ کیلوهرتز بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی معنی‌دار بوده است ( $p < 0.05$ ). نتایج همچنین نشان داد که بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در حین برشته شدن شکل می‌گیرند. تأثیر حلال بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی قهوه نیز معنی‌دار بود و میزان استخراج ترکیبات فنولی کل و فلاونوئیدی را بهبود بخشید. بیشترین میزان استخراج فنولی مربوط به حلال با ترکیب ۶۰ درصد

- [10] Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J. and Wang, Z., 2007. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(6), pp.767-778.
- [11] Chemat, F. and Khan, M.K., 2011. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(4), pp.813-835.
- [12] Zhao, S. and Baik, O.D., 2012. Application of ultrasound as pretreatment for extraction of podophyllotoxin from rhizomes of *Podophyllum peltatum*. *Ultrasonics sonochemistry*, 19(1), pp.22-31.
- [13] Abubakar, E.M.M., 2010. Antibacterial potential of crude leaf extracts of *Eucalyptus camaldulensis* against some pathogenic bacteria. *African Journal of Plant Science*, 4(6), pp.202-209.
- [14] Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, pp.152-178.
- [15] Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
- [16] Singh, R.P., Chidambara Murthy, K.N. and Jayaprakasha, G.K., 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(1), pp.81-86.
- [17] Vignoli, J.A., Bassoli, D.G. and Benassi, M.T., 2011. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124(3), pp.863-868.
- [18] Naidu, M. M., Sulochanamma, G., Sampathu, S.R. and Srinivas, P., 2008. Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Food Chemistry*, 107(1), pp.377-384.
- [19] Upadhyay, R., Ramalakshmi, K. and Rao, L.J.M., 2012. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans. *Food Chemistry*, 130(1), pp.184-188.

ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی قهوه را بهبود بخشد و افزایش فرکانس تأثیر معناداری با پارامترهای مورد ارزیابی شده داشته باشد.

## ۵- منابع

- [1] Freedman, N.D., Park, Y., Abnet, C.C., Hollenbeck, A.R. and Sinha, R., 2012. Association of coffee drinking with total and cause-specific mortality. *New England Journal of Medicine*, 366(20), pp.1891-1904.
- [2] Hečimović, I., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D. and Komes, D., 2011. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food chemistry*, 129(3), pp.991-1000.
- [3] Nunes, F.M. and Coimbra, M.A., 2010. Role of hydroxycinnamates in coffee melanoidin formation. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), pp.171-185.
- [4] Aruoma, O.I., 1999. Antioxidant actions of plant foods: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. *Free Radical Research*, 30(6), pp.419-427.
- [5] Svilaas, A., Sakhi, A.K., Andersen, L.F., Svilaas, T., Ström, E.C., Jacobs, D.R., Ose, L. and Blomhoff, R., 2004. Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *The Journal of nutrition*, 134(3), pp.562-567.
- [6] Crozier, A., Jaganath, I.B. and Clifford, M.N., 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural product reports*, 26(8), pp.1001-1043.
- [7] Moreira, D.P., Monteiro, M.C., Ribeiro-Alves, M., Donangelo, C.M. and Trugo, L.C., 2005. Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(5), pp.1399-1402.
- [8] Ludwig, I.A., Sanchez, L., Caemmerer, B., Kroh, L.W., De Peña, M.P. and Cid, C., 2012. Extraction of coffee antioxidants: impact of brewing time and method. *Food Research International*, 48(1), pp.57-64.
- [9] Rodrigues, S. and Pinto, G.A., 2007. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder. *Journal of food engineering*, 80(3), pp.869-872.

## Effect of ultrasound pretreatment and solvent type on antioxidant capacity and phenolic compounds of coffee

Yousefi Makuii, H. <sup>1</sup>, Jalilzadeh, A. <sup>2\*</sup>, Azadmard Damirchi, S. <sup>3</sup>

1. M.Sc. Student, Department of Food Science, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran.

2. Lecturer Department of Food Science, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran.

3. Professor, Department of Food Science, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran.

(Received: 2016/08/03 Accepted:2016/12/13)

Coffee is a rich source of methylxanthines, especially caffeine, hydroxy-cinnamic acids, especially chlorogenic acids and, for health benefits has been considered. In this research the effect of ultrasound pretreatment and then roasting process on extraction of phenolic compounds, flavonoids and free radicals scavenging capacity as well as the effect of solvent composition on the extraction phenolic and flavonoid contents were evaluated. The results of this research showed that ultrasound pretreatment can increase the extraction of phenolic compounds up to the 11.99% for a frequency of 20 kHz, 22.89% for 40 kHz and 13.52% for frequencies of 60 kHz frequency. The results also showed that ultrasound pretreatment can increase flavonoid extraction for the frequencies 20, 40 and 60 kHz; 13.65, 18.47 and 30.04 percent respectively compared to the control sample. The highest extraction of phenolic compounds related to the frequency of 60 kHz and isopropanol 60%, which was 31.51 mg per gram of Gallic acid. Ultrasound pretreatment had significant effect on the percentage of free radicals scavenging of DPPH ( $p < 0.05$ ). Maximum free radical scavenging activity was due to the sample with ultrasound pretreatment at frequency of 60 kHz with a concentration of ppm 200 ppm which was equivalent BHT at 25 ppm concentration (87%). Among the combination of used solvents, isopropyl alcohol combined with water at a ratio of 60 to 40 had the highest impact on the extraction of phenolic compounds and flavonoids. This composition of the solvent increased extraction of phenolic compounds and flavonoids 37.51 and 28.14 percent respectively compared to the control sample. Since the ultrasound pretreatment at a frequency of 60 kHz and isopropanol 60% had the highest impact on the extraction of phenolic compounds, this combination is proposed to extraction of phenolic compounds of coffee.

**Key words:** Coffee, roasting, Phenolic compounds, Antioxidant capacity, Ultrasound

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: a.jalilzadeh@iaumaku.ir