

تأثیر شرایط عصاره‌گیری با امواج فراصوت بر عملکرد و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*)

مرضیه قربانی^۱، محمد ابونجمی^{۲*}، مجید قربانی جاوید^۳، اکبر عرب حسینی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فنی کشاورزی، پردیس ابوریحان-دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه فنی کشاورزی، پردیس ابوریحان-دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان-دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه فنی کشاورزی، پردیس ابوریحان-دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۴/۰۹/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۳۰)

چکیده

در عصاره‌گیری به روش‌های متداول از جمله سوکسله نیاز به صرف زمان طولانی و احتمال آسیب به ترکیبات حساس به حرارت وجود دارد. در این پژوهش روش مدرن فراصوت با روش متداول سوکسله در عملکرد و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره دانه رازیانه مورد مقایسه قرار گرفتند. در روش سوکسله از دمای ۸۵ درجه سلسیوس و زمان ۲۴۰ دقیقه و در روش فراصوت از دو سطح دما (۴۰ و ۶۰ درجه سلسیوس)، سه سطح زمان (۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه) و سه سطح توان (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ وات) استفاده گردید. نتایج نشان دادند که بیشترین میزان عملکرد عصاره در (۴۵ دقیقه، ۶۰ درجه سلسیوس و ۳۰۰ وات) برابر ۸/۷۹ گرم عصاره خشک در ۱۰۰ گرم دانه رازیانه مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با روش سوکسله نداشت. همچنین ۳/۹ درصد عصاره خشک بیشتری در مقایسه با روش سوکسله استخراج گردید. بیشترین میزان ترکیبات فنولی در (۴۵ دقیقه، ۶۰ درجه سلسیوس و ۲۰۰ وات) به میزان ۳/۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره دانه رازیانه حاصل گردید که اختلاف معنی‌داری با روش سوکسله داشت و باعث افزایش ۵۰/۸ درصدی ترکیبات فنولی نسبت به روش سوکسله گردید. بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH در (۱۵ دقیقه، ۶۰ درجه سلسیوس و ۳۰۰ وات) معادل ۹۸/۸۸ درصد مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با روش سوکسله نداشت و روش سوکسله تنها باعث افزایش ۰/۱۸ درصد مهار رادیکال آزاد در مقایسه با روش فراصوت گردید که در مقایسه با زمان و دمای پایین روش فراصوت بسیار ناچیز است و بدین ترتیب برتری روش فراصوت به اثبات رسید.

کلید واژگان: فراصوت، ترکیبات فنولی، رازیانه، سوکسله، DPPH

۱- مقدمه

اسیدهای چربی مانند اولئیک، لینولئیک و پالمیتیک اسیدها در قسمت‌های مختلف گیاه رازیانه می‌توانند در فعالیت آنتی-اکسیدانی آن سهیم باشند [۷]. بررسی عصاره‌های استخراج شده از قسمت‌های مختلف گیاه رازیانه نشان می‌دهد که قادر به خشی کردن رادیکال‌های آزاد حاصل از اکسیداسیون می‌باشند [۸]. ترکیبات فنولی عمده در دانه رازیانه (E)anethole، (Z)anethole و α -thojone می‌باشند [۸]. روش‌های متداول عصاره‌گیری بر پایه قرارگرفتن گیاه در حلال مناسب می‌باشد که به منظور افزایش سرعت فرآیند از هم زدن یا حرارت دادن استفاده می‌شود. از جمله روش‌های متداول می‌توان سوکسله^۱، تقطیر، خیساندن^۲ و پرکولاسیون^۳ را نام برد. روش سوکسله یک روش استاندارد است که به عنوان مرجع اصلی ارزیابی دیگر روش‌ها به کار می‌رود. این روش، عمومی بوده که به طور عمده برای استخراج ترکیبات با فراریت کم یا متوسط که در مقابل حرارت پایدار باشند به کار می‌رود [۹]. شایان ذکر است که فراصوت^۴ یکی از روش‌های نوین استخراج می‌باشد که امواج با فرکانس بالاتر از ۲۰ کیلوهرتز به داخل ماده نفوذ کرده، موجب ایجاد انبساط و انقباض‌های متوالی در مولکول‌های داخل محیط شده که در نتیجه آن حفراتی داخل ماده گیاهی ایجاد می‌شوند. این حفرات به صورت نامتقارن به هم پیوسته و موجب خروج سریع مواد از داخل سلول‌ها به خارج از آن می‌شوند. به علاوه این امواج می‌توانند موجب تخریب دیواره سلول‌های زیستی و تسهیل خروج مواد گردند [۱۰]. سازوکار اصلی استخراج با امواج فراصوت به پدیده حفره‌زایی^۵ مربوط می‌شود که طی آن حباب‌های بسیار ریزی در توده مایع تشکیل شده و به سرعت تا یک اندازه بحرانی رشد می‌کنند و سپس منفجر می‌گردند. انفجار این حباب‌ها اغلب با آزاد شدن مقدار زیادی انرژی همراه است که به شکل تنش برشی به محیط اطراف اعمال می‌شود. استخراج با امواج صوتی در مقایسه با شیوه‌های مرسوم ارزان، ساده و کارآمد است. مزیت اصلی استفاده از امواج صوتی در استخراج جامد-مایع شامل افزایش عملکرد و روند سریعتر استخراج است. امواج صوتی می‌توانند دمای فرآیند را کاهش و اجازه استخراج ترکیبات ناپایدار در برابر

رازیانه (*Foeniculum vulgare*) گیاهی علفی، چند ساله و متعلق به خانواده چتریان است. روغن رازیانه دارای ۴ درصد اسید پالمیتیک، ۲۲ درصد اسید اولئیک، ۱۴ درصد اسید لینولئیک، ۶۰ درصد اسید پتروسلنیک و نیز مواد معدنی از قبیل فسفر، پتاسیم، منیزیم، منگنز، مواد قندی، موسیلاژ، صمغ، مواد روغنی و ویتامین‌های A، B، C، آهنک و هیدرات‌کربن می‌باشد [۱]. قسمت‌های مورد استفاده رازیانه، میوه، برگ و ریشه آن است. تمام پیکر گیاه رازیانه حاوی ماده مؤثره اسانس بوده و دانه آن مهم‌ترین اندام تولیدکننده اسانس است. این گیاه بومی جنوب اروپا و منطقه مدیترانه می‌باشد و در فرانسه، اسپانیا، پرتغال و شمال آفریقا به حالت خودرو رشد می‌کند. در حال حاضر نیز در نواحی وسیعی از رومانی، روسیه، آلمان، فرانسه، ایتالیا، هند، آرژانتین، آمریکا و بسیاری از کشورهای آفریقایی کشت می‌گردد [۲]. همچنین کشورهای ترکیه، چین، سوریه، ایران، ویتنام، افغانستان، لبنان و قبرس از عمده کشورهای تولیدکننده این محصول هستند [۳]. رازیانه دارای متابولیت‌های ثانویه با ارزشی است که در صنایع دارویی، بهداشتی و غذایی کاربرد وسیعی دارد. از رازیانه در صنایع داروسازی در معالجه دل درد، نفخ شکم، کاهش آسم، سرفه، تنگی نفس، کمک به هضم غذا و رفع سوء هاضمه، تسکین درد مفاصل و به عنوان ماده‌ای اشتهاآور و محرک تولید شیر در مادران استفاده می‌شود [۴].

ترکیبات فنولی گروه بزرگی از مواد طبیعی گیاهی شامل فلاونوئیدها، تانن‌ها، آنتوسیانین و غیره می‌باشند که معمولاً در میوه‌ها، سبزیجات، برگ‌ها، آجیل‌ها، دانه‌ها، ریشه و در سایر قسمت‌های گیاه دیده می‌شوند. این مواد منابع قابل توجهی در زمینه مواد غذایی، شیمی، داروسازی و پزشکی با توجه به طیف گسترده‌ای از اثرات مطلوب زیستی از جمله خواص آنتی‌اکسیدان دارند [۵]. جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به جای ترکیبات مصنوعی به دلیل سالم‌تر بودن آن‌ها و نیز مسایلی از قبیل انحلال در آب و روغن و ایجاد امولسیون‌های مناسب در صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفته است. هم‌چنین در مطالعات گسترده اثر این‌گونه آنتی‌اکسیدان‌ها علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها به اثبات رسیده است و به عنوان محافظ مواد غذایی تا زمانی که با طعم و بوی فرآورده مغایر نباشد، استفاده شده است [۶]. حضور ترکیبات فنولی و

1. Soxhlet
2. Maceration
3. Percolation
4. Ultrasound
5. Cavitation

آسیاب گردید و از الک با مش ۱۶ عبور داده شد و با مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درجه مخلوط گردید. به منظور ایجاد امواج فراصوت در این پژوهش از یک دستگاه مولد امواج فراصوت مدل (M.P.I, Switzerland) AMMM با توان تولیدی ۱۰۰۰ وات و بسامد 20 ± 0.5 کیلوهرتز و پراب استوانه‌ای شکل از جنس تیتانیوم به قطر ۲۰ میلی‌متر استفاده گردید. دما در طی فرآیند عصاره‌گیری با استفاده از حمام آب (memmert WNB 14, Germany) ثابت نگه داشته شد و به منظور کنترل دما از دماسنج استفاده گردید (شکل ۱).

عصاره استخراج شده با ۷۸۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ (SiGmA 2-16P, Germany) و سپس قسمت شفاف بالای مخلوط جدا گردید. جداسازی حلال و تغلیظ شدن عصاره توسط تبخیر کننده چرخشی تحت خلأ (Beals Hei-VAP Value, Germany) در دمای ۴۰ درجه سلسیوس (با هدف جلوگیری از آسیب ترکیبات فنولی) و ۲۰۰ دور بر دقیقه انجام شد. به منظور حذف باقیمانده حلال، عصاره تغلیظ شده بر روی پلیت^۹ پخش گردید و در داخل آون با دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا زمانی که عصاره به طور کامل خشک گردید. سپس درب پلیت را گذاشته، دور آن را با پارافیلیم بسته و برای جلوگیری از نفوذ نور به طور کامل با فویل آلومینیومی پوشانده شد و تا زمان انجام آزمون در فریزر با دمای 18°C - نگه‌داری گردید [۱۲، ۱۳].

۲-۱-۲-۲- روش سوکسله

در این روش مقدار ۳۰ گرم بذر رازیانه بوسیله ترازو با دقت 0.001 گرم توزین شد و توسط آسیاب برقی تیغه‌ای به مدت یک دقیقه پودر شده و از الک با مش ۱۶ عبور داده شد. پودر رازیانه داخل کاغذهای صافی قرار گرفته و در بخش استخراج کننده سوکسله قرار داده شدند و ۳۰۰ میلی‌لیتر حلال اتانول ۷۰ درجه به آن‌ها اضافه گردید. استخراج تا زمان بی‌رنگ شدن حلال ادامه یافت و مدت زمان استخراج چهار ساعت پس از مشاهده اولین قطره میعان محاسبه گردید. عصاره به دست آمده به داخل بالن تبخیر کننده چرخشی تحت خلأ منتقل و سایر مراحل مشابه روش فراصوت انجام گردید.

حرارت را بدهند [۱۱]. بدین منظور هدف از این پژوهش، مقایسه تأثیر دو روش فراصوت و سوکسله بر عملکرد، میزان ترکیبات فنولی و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره دانه رازیانه بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

به منظور بررسی اثرات روش‌های عصاره‌گیری با استفاده از امواج فراصوت، تحقیقاتی در گروه فنی کشاورزی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۳ انجام شد. برای انجام آزمایشات از بذور گیاه دارویی رازیانه که در سال ۱۳۹۲ از مزرعه پژوهشی گروه زراعت پردیس ابوریحان دانشگاه تهران واقع در شهرستان پاکدشت، جنوب شرقی استان تهران برداشت گردیده بود استفاده شد. مواد شیمیایی مورد استفاده شامل اسیدکلریدریک، کربنات سدیم، معرف فولین سیوکالچو^۶، اسید گالیک، ۱۰۱- دی فنیل ۲- پیکریل هیدرازیل^۷، اتانول و متانول از شرکت مرک^۸ آلمان تهیه شد.

۲-۲- روش‌ها

جهت تهیه عصاره دانه رازیانه از دو روش سوکسله و فراصوت استفاده گردید. حلال مورد استفاده در هر دو روش اتانول ۷۰ درجه بود که از طریق اختلاط الکل ۹۷ درجه و آب با نسبت ۷۳:۲۷ میلی‌لیتر (حجمی-حجمی) تهیه گردید. برای تمام تیمارهای این آزمایش نسبت پودر رازیانه به حلال اتانول ۷۰ درجه به صورت ۱:۱۰ (وزنی-حجمی) در نظر گرفته شد. سطوح تیماری روش فراصوت شامل دو سطح دما (۴۰ و ۶۰ درجه سلسیوس)، سه سطح زمان (۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه) و سه سطح توان (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ وات) بودند که در مقایسه با روش سوکسله با دمای ۸۵ درجه سلسیوس (نقطه جوش حلال) و مدت زمان ۲۴۰ دقیقه به عنوان شاهد مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۲-۲-۱- روش‌های استخراج عصاره

۲-۲-۱-۱- روش فراصوت

در این روش ۱۰ گرم دانه رازیانه به وسیله ترازو با دقت 0.001 گرم توزین شد و توسط آسیاب برقی تیغه‌ای (Moulinex MC 300132, France) به مدت ۱ دقیقه

6. Fulin seo kalchu

7. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH)

8. Merck

9. Plate

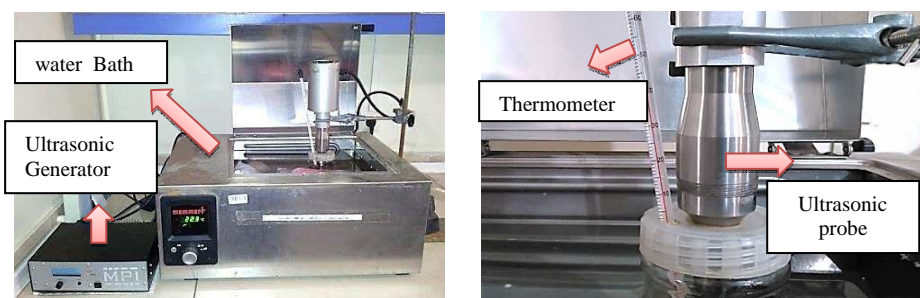


Fig 1 Ultrasound instrument used in water bath

۲-۲-۴- اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد

¹²DPPH

خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره با استفاده از روش Brand-Williams و همکاران (۱۹۹۵) با کمی تغییرات اندازه‌گیری گردید [۱۵].

مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره با ۹/۹ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق گردید، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول حاصل با ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول متانولیک (۲۵ میلی‌گرم بر لیتر) DPPH مخلوط گردید. نمونه کنترل حاوی ۰/۱ میلی‌لیتر متانول با ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول متانولیک DPPH بود. تنظیم صفر دستگاه اسپکتروفوتومتر ابتدا با متانول خالص انجام گرفت و سپس مقدار جذب تمام نمونه‌ها پس از گذشت نیم ساعت در طول موج ۵۱۵ نانومتر در حالت پایدار قرائت گردید. در نهایت درصد مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید که در آن، Ac جذب کنترل و و As جذب نمونه می‌باشند.

$$\text{Inhibition (\%)} = [(Ac-As)/Ac] \times 100$$

۲-۲-۵- روش تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده، با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن^{۱۳} با نرم‌افزار SAS-9 و در سطح احتمال ۹۵ درصد انجام شد. نمودارها به کمک نرم‌افزار اکسل^{۱۴} (۲۰۱۰) رسم گردید.

۳- نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین اثرات متقابل داده‌های مورد بررسی در جدول ۱ نمایش داده شده است.

۲-۲-۲- محاسبه عملکرد عصاره

با محاسبه وزن اولیه پلیت و وزن نهایی آن که حاوی عصاره خشک بر جای مانده است، مقدار کل عصاره خشک استخراج شده محاسبه شد و عصاره خشک در ۱۰۰ گرم پودر دانه رازیانه بر حسب گرم اندازه‌گیری گردید [۱۲].

۲-۲-۳- اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی

ترکیبات فنولی عصاره با استفاده از روش Cam و همکاران (۲۰۰۹) اندازه‌گیری گردید [۱۴].

یک میلی‌لیتر محلول عصاره با یک میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک (۶ مولار) و پنج میلی‌لیتر محلول ۷۵ درجه متانول در آب مخلوط گردید. محلول حاصل در حمام آب گرم با دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت دو ساعت تکان داده شد. محلول از حمام آب گرم خارج گردید و دمای آن تا رسیدن به دمای اتاق کاهش یافت و سپس تا رسیدن به حجم ۱۰ میلی‌لیتر با آب مقطر رقیق گردید. یک میلی‌لیتر از محلول حاصل با پنج میلی‌لیتر محلول فولین^{۱۰} که نه برابر رقیق شده بود و ۱۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم (غلظت هفت گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) مخلوط گردید. محلول حاصل به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و به خوبی تکان داده شد. مقدار جذب محلول پس از پایدار شدن در ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر^{۱۱} (CECIL 2502, UK) در برابر شاهی که تمامی مراحل استخراج را گذراند ولی به جای عصاره از آب مقطر در تهیه آن استفاده شد، قرائت گردید. تمامی مراحل توسط غلظت‌های گوناگون محلول اسید گالیک (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به جای عصاره تکرار و منحنی استاندارد رسم گردید. با استفاده از منحنی استاندارد مقدار ترکیبات فنولی کل موجود در عصاره اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک موجود در یک میلی‌لیتر نمونه عصاره گزارش گردید.

12. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine

13. Duncan

14. Excel

10. Fulin seo kalchu

11. Spectrophotometer

Table 1 Analysis of variance (ANOVA), quantitative traits of fennel under the ultrasound treatment levels in comparison with soxhlet

Source	DF	Mean Square		
		Yield	Total Phenolic Compounds	Scavenging DPPH
Temperature	1	11.90**	6.72**	239.27ns
Power	2	4.85**	3.48**	1540.91**
Time	2	2.58ns	2.10**	276.32*
Temperature × Power	2	0.39ns	1.56**	948.70**
Temperature × Time	2	0.26ns	0.25*	1017.56**
Power × Time	4	0.10ns	0.61**	2428.51**
Temperature × Power × Time	4	0.10ns	0.09ns	275.16*
Error	39	0.89	0.07	84.35
Total	56	-	-	-
Coefficient of variation	-	12.45	15.50	11.34

ns: non significant, *: significant in 5% level, **: significant in 1% level

به روش فراصوت از سه دما (۳۰، ۴۵ و ۶۰ درجه سلسیوس) استفاده کردند و دریافتند افزایش دما تا ۴۵ درجه سلسیوس تأثیر محسوسی بر عملکرد داشت چنانکه با افزایش دما تا ۶۰ درجه سلسیوس عملکرد استخراج افزایش یافت [۱۶]. با افزایش دما می‌توان میزان عملکرد افزایش نیز یافته است. بیشترین میزان عملکرد در روش فراصوت در توان ۳۰۰ وات مشاهده گردید که با روش سوکسله اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۳).

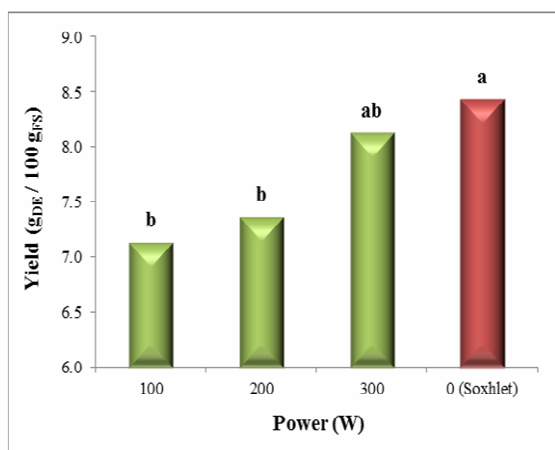


Fig 3 Effect of power on the extraction yield by ultrasound-assisted extraction and soxhlet method

دلیل افزایش عملکرد با افزایش دما در روش فراصوت، تولید انرژی بیشتری است که خروج ترکیبات از بافت گیاهی به حلال را از طریق تخلخل و منافذ در دیواره سلولی و بهبود انتشار و انتقال جرم، تسهیل می‌کند. بنابراین می‌تواند موجب خروج بیشتر مواد مؤثره و در نهایت افزایش درصد عصاره

۳-۱- تأثیر امواج فراصوت بر عملکرد عصاره

بر طبق نتایج در سطوح تیمار دما و توان اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد مشاهده گردید (جدول ۱). با افزایش دمای فراصوت میزان عملکرد افزایش یافته است. بیشترین میزان عملکرد در روش فراصوت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس مشاهده گردید که در مقایسه با روش سوکسله اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۲).

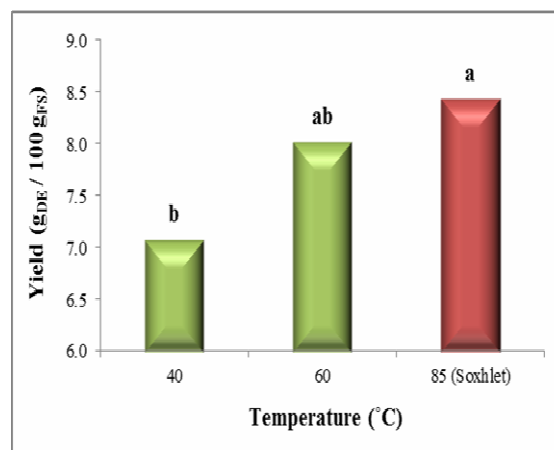


Fig 2 Effect of temperature on the extraction yield by ultrasound-assisted extraction and soxhlet method (The same letters does not indicate a significant difference at 5%)

افزایش عملکرد با افزایش دما در روش فراصوت احتمالاً به دلیل بهبود انتقال جرم در نتیجه افزایش حلالیت است؛ به علاوه افزایش دمای استخراج می‌تواند سبب شتاب‌دهی حلال و تقویت استخراج ناخالصی‌ها و مواد زائد گردد. در مطالعاتی بر روی بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فلاونوئیدی میوه سنجد

سپس کاهش یافت. بیشترین میزان ترکیبات فنولی در روش فراصوت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس و توان ۲۰۰ وات مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با روش سوکسله داشت (شکل ۴).

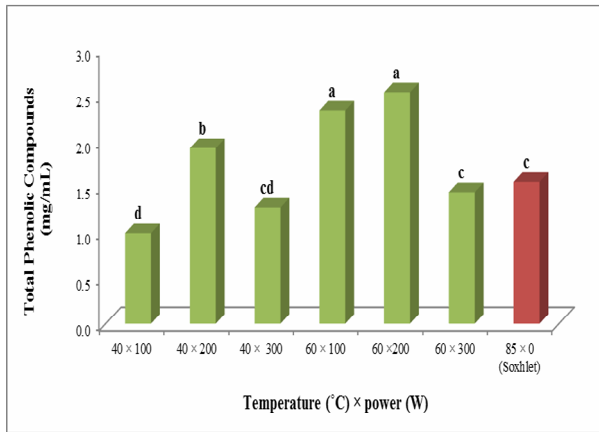


Fig 4 Effect of temperature and power on the changes phenolic compounds by ultrasound-assisted extraction and soxhlet method

در بررسی تأثیر دما و زمان در روش فراصوت، در هر دو دمای ۴۰ و ۶۰ درجه سلسیوس با افزایش زمان میزان ترکیبات فنولی عصاره افزایش یافت. بیشترین میزان ترکیبات فنولی در دمای ۶۰ درجه سلسیوس و زمان ۴۵ دقیقه مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با روش سوکسله داشت (شکل ۵).

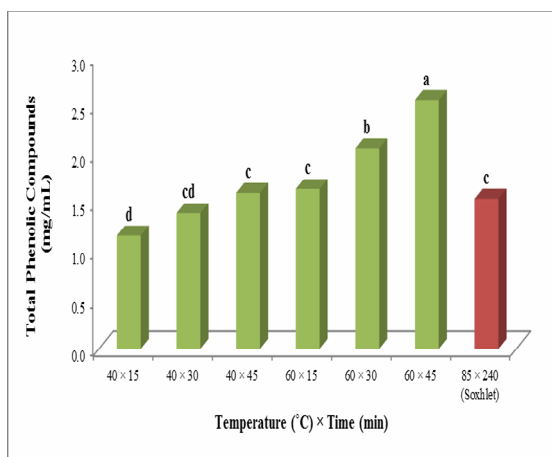


Fig 5 Effect of temperature and time on the changes phenolic compounds by ultrasound-assisted extraction and soxhlet method

در مطالعه‌ای بر استخراج ترکیبات فنولی سیوس گندم به کمک حمام فراصوت از دامنه دمایی (۲۵ الی ۷۵ درجه سلسیوس) و زمان (۱۰ تا ۵۰ دقیقه) استفاده کردند و دریافتند با افزایش زمان و دما میزان استخراج این ترکیبات افزایش یافت و بهترین

خشک گردد. در پژوهشی در استخراج ترکیبات آنتوسیانینی و آنتی‌اکسیدانی پرچم گل زعفران به کمک فن‌آوری فراصوت با سه سطح از شدت صوت (۲۰، ۶۰ و ۱۰۰ درصد) مشاهده گردید که با افزایش شدت صوت عملکرد استخراج افزایش یافت و بیشترین عملکرد در شدت صوت ۱۰۰ درصد حاصل گردید [۱۷].

نتایج این تحقیق نشان داد، به منظور استخراج بیشتر عصاره گیاه رازیانه، مناسب‌ترین شرایط در روش فراصوت، در دمای ۶۰ درجه سلسیوس، زمان ۴۵ دقیقه و توان ۳۰۰ وات حاصل گردید. تحت این شرایط میزان استخراج ۸/۷۹ گرم عصاره خشک در ۱۰۰ گرم دانه رازیانه بود که اختلاف معنی‌داری با روش سوکسله نداشت و مقدار ۳/۹ درصد عصاره خشک بیشتری در مقایسه با روش سوکسله با مدت زمان ۲۴۰ دقیقه و دمای ۸۵ درجه سلسیوس استخراج گردید که دما و توان مؤثرترین فاکتورها در این صفت بودند.

پژوهش‌های متعددی در افزایش میزان عملکرد عصاره با امواج فراصوت نسبت به روش‌های متداول گزارش شده است. افزایش عملکرد عصاره ولیک سیاه با روش فراصوت نسبت به روش استخراج با حلال [۱۸]، افزایش عملکرد عصاره گیاه بومادران در مقایسه با روش خیساندن [۱۹]، و همچنین افزایش عملکرد عصاره گیاه زرشک نسبت به روش بدون اعمال فراصوت مشاهده گردید [۱۲]. اکتای و همکاران (۲۰۰۳) عملکرد استخراج عصاره آبی و اتانولی دانه رازیانه را به ترتیب ۱۶/۲۰ و ۱۰/۹۵ گرم در ۱۰۰ گرم پودر دانه رازیانه [۲۰]، سینگ و همکاران (۲۰۰۶) عملکرد استخراج عصاره استونی رازیانه را ۳/۷ درصد [۷] و ماتا و همکاران (۲۰۰۷)، عملکرد استخراج عصاره آبی و اتانولی پودر خشک دانه رازیانه را به ترتیب ۲۶/۵ و ۶/۹ گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک اعلام کردند [۲۱].

۳-۲- تأثیر امواج فراصوت بر تغییرات مقدار

کل ترکیبات فنولی

بر طبق نتایج در اثرات ساده تیمار دما، توان، زمان و همچنین اثرات متقابل دما در توان و زمان در سطح یک درصد و اثرات متقابل دما در زمان در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید (جدول ۱). در بررسی تأثیر دما و توان در روش فراصوت، در هر دو دمای ۴۰ و ۶۰ درجه سلسیوس با افزایش توان میزان ترکیبات فنولی کل در ابتدا افزایش و

نتایج این پژوهش نشان دادند در روش فراصوت بیشترین میزان ترکیبات فنولی کل در زمان ۴۵ دقیقه، دما ۶۰ درجه سلسیوس و توان ۲۰۰ وات معادل ۳/۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره دانه رازیانه مشاهده گردید که با روش سوکسله اختلاف معنی‌داری داشت و باعث افزایش ۵۰/۸ درصد ترکیبات فنولی کل بیشتری در عصاره نسبت به روش سوکسله با مدت زمان ۲۴۰ دقیقه و دمای ۸۵ درجه سلسیوس گردید. در این صفت هر سه فاکتور دما، زمان و توان نقش مؤثری در میزان استخراج داشتند. می‌توان گفت تنش‌های برشی حاصل از امواج فراصوت باعث شکسته شدن مولکول‌های پلیمری بزرگ و در نتیجه باعث استخراج بهتر ترکیبات فنولی نسبت به روش سوکسله می‌شوند. دلیل افزایش میزان استخراج ترکیبات فنولی در روش فراصوت، تشدید انتقال جرم ناشی از فروپاشی حباب‌های حفره‌زایی در نزدیکی دیواره‌های سلولی است که منجر به تماس بهتر بین حلال و مواد گیاهی می‌شود. به علاوه در زمان فروپاشی حباب‌های حفره‌زایی، یک جریان سریع امواج فراصوت تولید می‌شود که به عنوان یک میکروپمپ عمل کرده و می‌تواند به اجبار حلال را به درون سلول رانده و ترکیبات مورد نظر را حل کند [۲۳].

پژوهش‌های زیادی افزایش میزان ترکیبات فنولی به وسیله امواج فراصوت را در مقایسه با روش‌های متداول بیان کردند. در استخراج ترکیبات فنولی از نارنگی استفاده از فراصوت باعث افزایش ترکیبات فنولی نسبت به روش غرقابی شد [۲۴]. دزاشیبی (۲۰۰۶) گزارش کرد که روش فراصوت ترکیبات فنولی بیشتری را نسبت به روش استخراج غرقابی به همراه داشته است [۲۵]. هم‌چنین حیدری مجد و همکاران (۲۰۱۲) افزایش ترکیبات فنولی از گیاه پونه گاوی نسبت به روش غرقابی را گزارش کردند و دلیل آن را تنش برشی حاصل از امواج فراصوت بر روی ترکیبات فنولی بیان نمودند [۲۶].

۳-۳- تأثیر امواج فراصوت بر مهار رادیکال

آزاد DPPH

بر طبق نتایج در سطوح مختلف تیمار توان در سطح یک درصد و تیمار زمان در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید. اثرات متقابل دوتایی همگی در سطح یک درصد و اثرات متقابل سه‌تایی در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌دار داشتند که توان فراصوت و سپس زمان بیشترین فاکتور معنی‌دار بودند (جدول ۱). در بررسی تأثیر هم‌زمان دما،

شرایط استخراج را دمای ۶۰ درجه سلسیوس و زمان ۲۵ دقیقه گزارش کردند [۲۲].

در بررسی تأثیر توان و زمان در روش فراصوت، در یک زمان مشخص مشاهده گردید با افزایش توان میزان ترکیبات فنولی در ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. دلیل کاهش میزان ترکیبات فنولی در توان ۳۰۰ وات در روش فراصوت را می‌توان تخریب این ترکیبات توسط شدت بالای امواج تولیدی بیان نمود که در زمان ۴۵ دقیقه میزان این تخریب افزایش یافته است. بیشترین میزان ترکیبات فنولی در توان ۲۰۰ وات و زمان ۴۵ دقیقه مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با روش سوکسله داشت (شکل ۶).

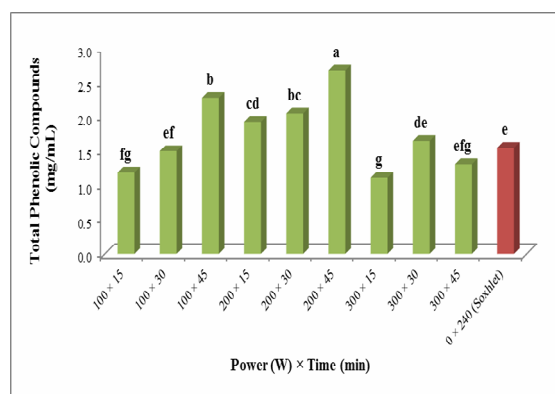


Fig 6 Effect of power and time on the changes of phenolic compounds by ultrasound-assisted extraction and soxhlet method

بهمن آبادی (۲۰۱۱) در عصاره‌گیری میوه زرشک با روش فراصوت دریافت با افزایش زمان و شدت صوت مقدار استخراج ترکیبات فنولی افزایش یافت، اما در زمان‌های بیشتر از ۲۰ دقیقه و شدت صوت بالاتر از ۸۸ درصد روند استخراج ثابت شد و تفاوت معنی‌داری در میزان استخراج مشاهده نشد [۱۲]. در استخراج ترکیبات آنتوسیانینی و آنتی‌اکسیدانی پرچم گل زعفران به کمک امواج فراصوت از سه زمان (۵، ۱۰، ۱۵ دقیقه) و سه شدت صوت (۲۰، ۶۰ و ۱۰۰ درصد) استفاده کردند و دریافتند با افزایش زمان و شدت صوت از ۵ تا ۱۰ دقیقه مقدار پلی‌فنل کل افزایش یافت، اما در زمان ۱۵ دقیقه این روند ثابت شد و در برخی موارد کاهش یافت. شرایط بهینه استخراج زمان ۱۰ دقیقه و شدت صوت ۱۰۰ درصد بیان گردید [۱۷].

رازیانه مربوط باشد که به عنوان یک جزء لازم در جذب رادیکال می‌باشد [۲۸]. در تحقیقی بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از میوه سنجد زیتنی (*Elaeagnus umbellata*) با دو روش حمام و پراب فراصوت، از سه سطح زمان (۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه) برای حمام فراصوت و سه سطح زمان (۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه) برای پراب فراصوت استفاده کردند و دریافتند در هر دو روش با افزایش زمان درصد مهار رادیکال آزاد افزایش یافت و بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH را ۷۷/۶۶ درصد در زمان ۹۰ دقیقه در روش مام فراصوت و ۹۵/۴۳ درصد در زمان ۲۰ دقیقه در روش پراب فراصوت گزارش کردند [۲۹]. در بررسی تأثیر دماهای (۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه سلسیوس) بر روی دانه گیلاس نتایج نشان داد، تا دمای ۶۰ درجه سلسیوس قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH زیاد و بعد از آن به دلیل تجزیه شدن ترکیبات آنتی‌اکسیدان مهار رادیکال آزاد DPPH کاهش یافت و بهترین دما را ۶۰ درجه سلسیوس بیان کردند [۳۰]. هم‌چنین شریفی و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر زمان بر روی قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در روش فراصوت را معنی‌دار اعلام کردند و دریافتند با افزایش مدت زمان استخراج تا حد خاصی قدرت مهارکنندگی افزایش یافته است [۳۱].

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش در روش فراصوت نسبت به روش سوکسله مقدار عصاره خشک و ترکیبات فنولی کل به ترتیب ۳/۹ و ۵۰/۸ درصد افزایش داشت و روش فراصوت باعث کاهش دمای اعمال شده جهت استخراج و کاهش ۵/۳ برابری مدت زمان استخراج گردید. در مهار رادیکال آزاد DPPH روش سوکسله تنها ۰/۱۸ درصد افزایش در مقایسه با روش فراصوت داشت که این افزایش مهار در روش سوکسله در مقایسه با دمای پایین و کاهش ۱۶ برابری زمان در روش فراصوت بسیار ناچیز است و بدین ترتیب برتری روش فراصوت در مقایسه با روش سوکسله و کارآمدی آن بر اساس نتایج حاصل اثبات گردید.

۵- منابع

[1] Yazdani, D., Shahnazi, S. and Seifi, H. 2004. Planting and Harvesting of Medicinal Plants, a Practical Guide 40 Important Medicinal Plant Breeding in Iran. Jahad

توان و زمان در روش فراصوت، در هر دو دمای ۴۰ و ۶۰ درجه سلسیوس روند مشابهی مشاهده گردید. بدین ترتیب که با افزایش توان، در زمان ۱۵ دقیقه درصد مهار رادیکال آزاد DPPH روند افزایشی، در زمان ۳۰ دقیقه ابتدا افزایش و سپس ثابت گردید و در زمان ۴۰ دقیقه ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. در اکثر تیمارها در دمای ۶۰ درجه سلسیوس درصد مهار بالاتری نسبت به دمای ۴۰ درجه سلسیوس مشاهده گردید (شکل ۷).

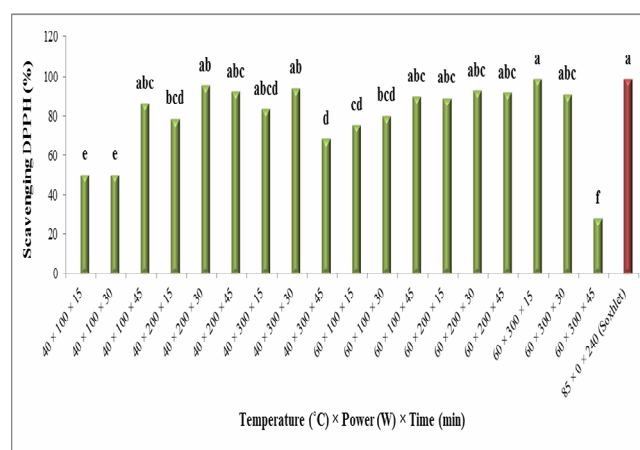


Fig 7 Effect of temperature power and time on the scavenging DPPH by ultrasound-assisted extraction and soxhlet method

نتایج این پژوهش نشان دادند که در روش فراصوت بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH در زمان ۱۵ دقیقه، دمای ۶۰ درجه سلسیوس و توان ۳۰۰ وات معادل ۹۸/۸۸ درصد مشاهده گردید که با روش سوکسله اختلاف معنی‌داری نداشت و روش سوکسله با دمای ۸۵ درجه سلسیوس و زمان ۲۴۰ دقیقه تنها ۰/۱۸ درصد افزایش مهار رادیکال آزاد DPPH نسبت به روش فراصوت را داشت که در مقایسه با زمان ۱۵ دقیقه و دمای ۶۰ درجه سلسیوس روش فراصوت، این افزایش مهار در روش سوکسله بسیار ناچیز است. هم‌چنین یک روند تقریباً مشابه بین ترکیبات فنولی و مهار رادیکال آزاد DPPH مشاهده گردید. دلیل وجود این روند مشابه را می‌توان طبق یافته‌های ال‌آریاچی و همکاران (۲۰۱۴) بیان نمود. آن‌ها دریافتند که در اسانس و عصاره گیاه رازیانه یک همبستگی مثبت بین محتوای پلی‌فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود دارد [۲۷]. این نتایج ممکن است به دلیل گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار شیمیایی ترکیبات فنولی از عصاره گیاه

- Islamic Azad University, Ghuchan Ranch [In Persian].
- [13] Bimakr, M., Abdul Rahman, R., Saleena Taip, F., Mohd Adzahan, N., Islam Sarker, M.d.Z. and Ganjloo, A. 2012. Optimization of ultrasound-assisted extraction of crude oil from winter melon (*Benincasa hispida*) seed using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity, total phenolic content and fatty acid composition. *Molecules*, 17: 11748-11762.
- [14] Cam, M., Hsıl, Y. and Durmaz, G. 2009. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, 112: 721-726.
- [15] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28(1): 25-30.
- [16] Sardoroudian, M. 2013. Optimize the extraction of flavonoid compounds angustifolia to sonication and Evaluation of its antioxidant properties. Master thesis, Islamic Azad University, Ghuchan Ranch [In Persian].
- [17] Rouhani, R., Eyenafshar, S. and Ahmadzadeh, R. 2015. Study of anthocyanin and antionidant compounds derived ethanol extract saffron flag with the help of ultrasound technology. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 11(2): 161-170 [In Persian].
- [18] Sharifi, M.R. and Sharifi, A. 2013. Optimize the extraction efficiency and anthocyanins extracted from (*Crataegus elbursensis*) by ultrasound technology to help response surface methodology. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 68-74 [In Persian].
- [19] Salarbashi, D. 2009. Evaluation of antioxidant properties of plant (*Achillea millefolium*). Master thesis, Islamic Azad University, Sabzevar Ranch [In Persian].
- [20] Oktay, M.I., Gulcin, O. and Kufrevioglu, I. 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 36: 263-271.
- [21] Mata, A.T., Proenc, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F. and Araujo, M.E.M. 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Daneshgahi, Shahid Beheshti University, Tehran*, 178p [In Persian].
- [2] Omidbeigi, R. 2005. Production and Processing of Medicinal Plants. Publications Astan Quds Razavi, Mashhad, 438p [In Persian].
- [3] Shanmugavelu, K.G., Kumar, N. and Peter, K.V. 2002. Production technology of spices and plantation crops. *Agrobios (INDIA)*, 11: 131-136.
- [4] Mirhaidar, H. 2001. Sciences Herbal: Plants Application in the Prevention and Treatment of Diseases. Publications of Islamic culture, Tehran, 546p [In Persian].
- [5] Raghavendra, H., Vijayananda, B., Madhumathi, G. and Hiremath, A. 2010. In vitro antioxidant activity of *vitex negundo* L. Leaf extracts. *Chiang Mai Journal of Science*, 37(3): 489-497.
- [6] Sazegar, M.R., Banakar, A., Bahrami, N., Bahrami, A., Baghbani, M., Nematollahi, P. and Mottaghi, M. 2011. Determination of the Antioxidant Activity and Stability of Chamomile (*Matricaria chamimilla* L.) Extract in Sunflower Oil. *World Applited Sciences journal*, 12(9): 1500-1504.
- [7] Singh, G.S., Maurya, M.P., Lampasona, D.E. and Catalan, C. 2006. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control*, 17: 745-752.
- [8] Barros, L., Heleno, S.A., Carvalho, A.M. and Ferreira, I.C.F.R. 2009. Systematic evaluation of the antioxidant potential of different parts of *Foeniculum vulgare* Mill from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2458-2464.
- [9] Luque de Castro, M.D. and Garcia-Ayuso, L.E. 1998. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytical Chemical Acta*, 369: 1-10.
- [10] Luque-Garcia, J.L. and Luque de Castro, M.D. 2003. Ultrasound: A powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, 22: 41-47.
- [11] Shotipruk, A., Kaufman, B. and Wang, Y. 2001. Feasibility study of repeated harvesting of menthol from biologically viable mentha xpiperata using ultrasonic extraction. *Biotechnol Progress*, 17(5): 924-928.
- [12] Bahman Abadi, J. 2011. Optimization of extraction of barberry using ultrasonic and response surface methods. Master thesis,

- Desjobert, J.M. and Costa, J. 2014. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Foeniculum vulgare* Mill. from Morocco. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(4): 743-748.
- [28] Shimoi, K., Masuda, S., Shen, B., Furugori, M. and Kinae, N. 1996. Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. *Mutation Research*, 350(1): 153-161.
- [29] Kamali, F., sadeghi Mahunak, A.R. and Nasirifar, Z. 2015. Impact of ultrasound-assisted extraction on the extraction of phenolic compounds and flavonoids from fruit (*Elaeagnus umbellata*). *Food Science and Nutrition*, 12(2): 23-32 [In Persian].
- [30] Dong-rui, Y., Lei, G., Shu-jun, W. and Fu-quan, X. 2011. Response surface optimization of extraction process for DPPH free radical scavenging components from cherry seed. *Food Science*, 32(22): 46-50.
- [31] Sharifi, A., Mortazavi, S.A., Maskooki, A., Niakousari, M. and Elhamirad, A.H. 2013. Optimization of subcritical water extraction of bioactive compounds from Fruit (*Berberis vulgaris*) by using response surface methodology. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 6(2): 89-96.
- and *Chemical Toxicology*, 46(12): 3632-3639.
- [22] 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: 804-810.
- [23] 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): 261-265.
- [24] Ma, Y.Q., Chen, J.C., Liu, D.H. and Ye, X.Q. 2009. Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16: 57-62.
- [25] Dezashibi, Z. 2006. Evaluation of antioxidant activity of leaf extract of henna. Master thesis, Islamic Azad University, Sabzevar Ranch [In Persian].
- [26] Haydari Majd, M., Mortazavi, S.A., Asili, J., Bolorian, Sh., Armin, M. and Abdolshahi, A. 2012. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Flomidoschema parviflora*, 3(1): 7-13 [In Persian].
- [27] El Ouariachi, E., Lahhit, N., Bouyanzer1, A., Hammouti1, B., Paolini, J., Majidi, L.,

Effect of ultrasound extraction conditions on yield and antioxidant properties of the fennel seed (*Foeniculum vulgare*) extract

Ghorbani, M.¹, Aboonajmi, M.^{2*}, Ghorbani Javid, M.³, Arabhosseini, A.⁴

1- M.Sc. Student, Department of Agrotechnology, College of Aburaihan, University of Tehran, pakdasht, Tehran, Iran

2- Associate Prof., Department of Agrotechnology, College of Aburaihan, University of Tehran, pakdasht, Tehran, Iran

3- Assistant Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran, pakdasht, Tehran, Iran

4- Associate Prof., Department of Agrotechnology, College of Aburaihan, University of Tehran, pakdasht, Tehran, Iran

(Received: 2015/11/29 Accepted: 2016/01/20)

Conventional extraction methods such as soxhlet, are time consuming and there is a risk of damage for heat-sensitive components. In this study, the new method of ultrasound and the conventional method of soxhlet were compared regarding to the yield and antioxidant properties of fennel seed extract. The soxhlet method conditions were temperature of 85 °C, and duration of 240 minutes, while in ultrasound method the samples were examined at two temperatures (40 and 60 °C), three durations (15, 30 and 45 min) and three powers (100, 200 and 300 W). The results showed that the highest value of the extract yield, equivalent to 8.79 g dry extract/100 g of fennel seeds was obtained at 60 °C, 45 min and 300 W. There was no significant difference between soxhlet and ultrasound methods but ultrasound method caused an increase of 3.9 % than the soxhlet method. The highest amount of phenolic compounds equivalent to 3.15 mg/ml fennel seed extract was obtained at 60 °C, 45 min and 200 W, which was significantly different compared to soxhlet method and the ultrasound method caused an increase of 50.8 % of the phenolic compounds compared to the soxhlet. The percentage of DPPH free radical scavenging was highest at 60 °C, 15 min and 300 W, with 98.88% that there was no significant difference compared to soxhlet method and it only caused an increase of 0.18 % compared to the ultrasound method. Regarding to the time and low temperature, the superiority of the ultrasound method was proved.

Keywords: Ultrasound, Total phenolics, Fennel, Soxhlet, DPPH

* Corresponding Author E-Mail Address: abonajmi@ut.ac.ir