بهینه سازی استخراج عصاره گیاه متکا با روش های فراصوت و سیال فوق بحرانی و بررسی فعالیت ضد اکسایشی عصاره آن

بهناز مهدی نیا لیچایی [۱]، رضا اسماعیل زاده کناری [۲*]، غلامرضا دین پناه [۳]

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.
۲- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
۳- گروه ترویج و آموزش کشاورزی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹٤/۰٤/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۲)

چکیده

بیش ترین عامل محرک که در پشت این تحقیقات وجود دارد، تلاش برای محدود ساختن استفاده از ضد اکسایش های مصنوعی در مواد غذایی است که خطرات زیادی را برای سلامتی انسان دارند. تحقیق حاضر با هدف بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولی و توکوفرولی گیاه متکا به کمک فناوری نوین فراصوت (اولتراسوند) و سیال فوق بحرانی، و بررسی خواص ضد اکسایشی عصاره های حاصل انجام گرفت. به همین منظور مقدار ترکیبات فنولی، توکوفرولی و قدرت ضد اکسایشی عصاره ها به ترتیب به روش فولین – سیوکالتو، آلفا – توکوفرول، ۲ و ۲ دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) و بتاکاروتن- لینولئیک اسید بررسی شده و با ضد اکسایش مصنوعی تری بوتیل هیدروکینون (TBHQ) مقایسه گردید. نتایج نشان داد که مقادیر فنول (۱٤۹۵/۸۱ ppm) و توکوفرول (۵۸/٦ ppm) استخراجی با روش فوق بحرانی نسبت به مقدار فنول (۱٤۲۲/۵۲ ppm) و توکوفرول (۵٦/٦٦ ppm) استخراجی با روش فراصوت از لحاظ آماری اختلاف معنی دار نداشتند. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH (۷۲/۹۷ ٪) و بی رنگ شدن در سامانه بتاکاروتن (٦۳/٤ ٪) در غلظت ۲۵۰۰ ppm عصاره استخراجی با روش سیال فوق بحرانی بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد و با ضد اکسایش مصنوعی TBHQ اختلاف معنی داری نداشت اما نسبت به روش فراصوت در همان غلظت عصاره ها دارای اختلاف معنی داری بودند. نتایج بدست آمده بیانگر این است که عصاره گیاه متکا دارای خاصیت ضد اکسایشی خوبی بوده و همچنین روش عصاره گیری و غلظت عصاره بر روی قدرت ضد اکسایشی تاثیرگذار می باشد.

کلید واژگان: عصاره متکا، فراصوت، سیال فوق بحرانی، ضد اکسایش

* مسئول مکاتبات: Reza_kenari@yahoo.com

۱- مقدمه

اکسایش لیپید یکی از عمده ترین دلایل فساد موادغذایی است که باعث تشکیل ترکیبات سمی بالقوه می شود. این امر منجربه استفاده از ضد اکسایش های مصنوعی از قبیل BHA [1]، [2] BHT، TBHQ [3] و PG [4] برای نگهداری مواد غذایی در برابر فساد می شود [۱]. شواهد بسیار زیادی وجود دارد که سمی بودن و اثرات سوءتغذیه ای ضد اکسایش های مصنوعی اضافه شده به موادغذایی را تایید می کند. علاوه براین خطر آسیب کبدی و ایجاد سرطان درحیوانات آزمایشگاهی از معایب استفاده از ضد اکسایش های مصنوعی است [۲]. باتوجه به این شرایط، برای جلوگیری از عوارض جانبی استفاده از ضد اکسایش های مصنوعی باید اقدام هایی انجام شود. یکی از این راه ها استخراج ضد اکسایش ها ی طبیعی از گیاهان و میوه های تازه ای است که حاوی مقادیر زیادی ضد اکسایش می باشند [۳].

عصاره گیری از گیاهان دارویی به روش های مختلف و با استفاده از حلال های مختلف صورت می گیرد. بدیهی است که با توجه به روش و حلال مورد استفاده، عصاره های تولید شده خواص متفاوتی را از خود نشان می دهند. حلال هایی که غالبا برای استخراج عصاره مورد استفاده قرار می گیرند شامل آب و حلال های آلی هستند [٤]. متابولیت های ثانویه مانند فنول و فلاونوئید کل مشتق از گیاهان دارای پتانسیل قوی برای حذف رادیکال های آزاد می باشند که در تمام قسمت های مختلف گیاهی مانند برگ، میوه، دانه، ریشه و پوست وجود دارند. بنابراین با توجه به شیوع بالای بیماری های مزمن، منطقی است که برای تامین ضد اکسایش های مورد نیاز بدن از گیاهان استفاده شود به خصوص گیاهانی که فنول و فلاونوئید بالایی داشته باشند [٥].

روش فراصوت به دلیل هزینه پایین تجهیزات، آسان بودن فرآیند، بهره وری بالاتر نسبت به مدت زمان استخراج و حلال مصرفی مورد نیاز، افزایش بازده استخراج و بهبود کیفیت عصاره پیشنهاد شده است. این روش استخراج براساس استفاده از انرژی حاصل از امواج فراصوت (فرکانس بالاتر از ۲۰ کیلوهرتز) به منظور بهبود انتقال حرارت و جرم از ماتریکس جامد گیاهی به حلال می باشد. پدیده حفرگی[5] ناشی از فرآیند فراصوت باعث تورم سلول های گیاهی و یا تجزیه دیواره سلولی در حین فرآیند فراصوت شده و باعث شستن املاح از دیواره های سلولی تخریب شده می شود [٦]. روش فراصوت برای استخراج مواد موثره ای همچون اسانس ها، روغن ها و پلی فنل ها از گیاهان استفاده شده است [۷].

استخراج با سیال فوق بحرانی به عنوان روشی جدید جهت استخراج ترکیبات از ماتریکس گیاهان معرفی شده است. در این روش از حلال در دما و فشار نزدیک و بالاتر از نقطه بحرانی آن استفاده می کند [۸]. استفاده از سیال فوق بحرانی، عدم تولید مواد سمی، عدم تخریب حرارتی ترکیبات عصاره و کاهش هزینه های حاصل از مصرف انرژی را به همراه دارد [۹]. دی اکسید کربن فوق بحرانی مطلوب ترین حلال برای استخراج ترکیبات طبیعی غیر قطبی و چربی دوست حاصل از ادویه ها و محصولات جانبی کشاورزی است. در نتیجه کاربرد آن برای استخراج محصولات طبیعی رو به افزایش است [۱۰]. فلوچ و همکاران[6](۱۹۹۷) طی مطالعه ای گزارش کردند در استخراج ترکیبات فنولی از برگ زیتون، روش سیال فوق بحرانی منجر به تولید ترکیبات فنولی بیشتر از روش فراصوت در حلال مایع مانند هگزان، در اتیل اتر و اتیل استات گردید.

گیاه متکا با نام علمی ***Ferula persica*** از خانواده چتریان دارای بیش از ۱۵۰ گونه بوده و بومی آسیای مرکزی است که ۵۳ گونه به صورت خودرو در ایران می روید و در ایران به عنوان غذا و نیز در طب سنتی مورد استفاده قرار می گیرد [۱۲]. اکثر گونه های فرولا دارای فعالیت ضد اکسایشی و فعالیت ضد میکروبی بوده [۱۳] و همچنین دارای ترکیباتی از قبیل آلکالویید ها، کارتنوئید ها و فلاونوئید ها [١٤]، می باشند.

هدف از این مطالعه بررسی خاصیت ضد اکسایشی گیاه متکا و مقایسه قدرت ضد اکسایشی عصاره های دو روش فراصوت و سیال فوق بحرانی می باشد.

1 . butylated hydroxyanisol
2. butylated hydroxytoluene
3. tert-butyl hydroquinone
4. Propyl gallate

5. Cavitation process
6. Floch et al

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

در این تحقیق از گیاه متکا که از شهرستان ساری خریداری شد، به عنوان ماده اولیه استفاده گردید. این گیاه را پس از تمیز نمودن، به دور از نور آفتاب خشک کرده و سپس به وسیله آسیاب(Molinex-684-French) کاملا به صورت پودر در آورده و از الک با مش مناسب عبور داده شد و تا زمان انجام آزمایش در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۲-۲- روش ها ی استخراج عصاره

۲-۲-۱- عصاره گیری بوسیله اولتراسوند (امواج فراصوت)

در این روش ۲۰ گرم از پودر متکا با ۱۰۰ میلی لیتر حلال اتانول - آب ترکیب شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد با فرکانس ۳۵ کیلو هرتز در دستگاه اولتراسوند (Transsonic,TI-H-20) قرار داده شده است [۱۵]. پس از پایان عمل استخراج محلول توسط دستگاه سانتریفیوژ مدل (HERMLE z200A – Germany) به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰ rpm و در هر مرحله فاز رویی جمع آوری شد تا دیگر رسوبی در ته لوله دیده نشود سپس فاز رویی جمع آوری شده با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد. در ادامه توسط اواپراتور تحت خلاء (TAM 2times – Iran) در دمای ۵۰ درجه حلال تبخیر شده و عصاره به دست آمده را به منظور جلوگیری از نور، با فویل آلومینیوم پوشانده و تا زمان آزمایش در فریزر دمای ۱۸- نگهداری شد[۱٦].

۲-۲-۲- عصاره گیری بوسیله سیال فوق بحرانی

در این روش ۲۰ گرم پودر متکا با ۱۰۰ میلی لیتر حلال اتانول به عنوان اصلاحگر ترکیب شد، سپس عصاره گیری توسط Co_2 فوق بحرانی (Suprex MPS/225 Multipurpose system) در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و فشار ۱۰۰ بار به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت [۱۷]. پس از پایان عمل استخراج محلول توسط دستگاه سانتریفیوژ مدل (HERMLE z200A – Germany) به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و در هر مرحله فاز رویی جمع آوری شد تا دیگر رسوبی در ته لوله دیده نشود سپس فاز رویی جمع آوری شده با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد. در ادامه توسط اواپراتور تحت خلاء (TAM 2times – Iran) در دمای ۵۰ درجه حلال تبخیر شده و عصاره به دست آمده را به منظور جلوگیری از نور، با فویل آلومینیوم پوشانده و تا زمان آزمایش درفریزر دمای ۱۸- نگهداری شد[۱٦].

۲-۳- اندازه گیری ترکیب های فنولی

میزان ترکیبات فنولی کل عصاره به روش فولین - سیوکالتو[1] اندازه گیری شد. در این روش معرف فولین در حضور ترکیبات فنولی در محلول قلیایی، احیا و رنگ آبی در محلول تولید می شود. ۵۰ میکرولیتر از نمونه با ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو که به نسبت ۱به ۱۰ با آب مقطر رقیق شده بود، مخلوط گردید. سپس ۲ میلی لیتر سدیم کربنات (۷/۵ درصد وزنی/ حجمی) به آن اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد تا فاز آبی گسترش یابد و سپس جذب آن در ۷٦۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتری UV -Vis (UV Visible-2100- UNICO) خوانده شد [۱۸].

۲-٤- اندازه‌گیری ترکیبات توکوفرولی

میزان کل ترکیبات توکوفرولی عصاره بر مبنای α - توکوفرول اندازه‌گیری شد. در این آزمون، ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره به دقت داخل بالن ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری وزن شد. ۵ میلی‌لیتر تولوئن به نمونه اضافه و بخوبی مخلوط شد. سپس ۳/۵ میلی‌لیتری محلول ۲ و ۲′ بی پیریدین[2] (۰/۰۷ درصد وزنی حجمی در اتانول آبی ۹۵ درصد) و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن III شش آبه (۰/۲ درصد وزنی حجمی در اتانول آبی ۹۵ درصد) اضافه ومخلوط گردید. سرانجام، حجم محلول های استاندارد با اتانول آبی ۹۵ درصد به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل به مدت یک دقیقه درحال سکون قرارگرفت وجذب آن در ۵۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتری UV-Vis (UV Visible-2100- UNICO) خوانده شد [۱۹].

۲-۵- ارزیابی فعالیت ضد اکسایشی

۲-۵-۱- آزمون DPPH [3]

در این تحقیق به عنوان ترکیب رادیکالی پایدار از DPPH به عنوان معرف استفاده شد، بدین ترتیب که ۵۰ میکرولیتر از

1. Folin–Ciocalteu
2. 2,2′Bipyridine
3. 2,2-di phenyl-1- picryl hydrazyl

غلظت های مختلف عصاره ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰ و ۹۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به ۵ میلی لیتر محلول ۰/۰۰٤ درصد DPPH در متانول اضافه گردید و به شدت هم زده شد، بعد از ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری در دمای معمولی اتاق، جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر مقابل شاهد خوانده شد [۲۰]. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه می گردد:

$$I\% = (A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}) \times 100$$

در این فرمول A_{blank} جذب نوری شاهد را که فاقد عصاره می باشد نشان می دهد و A_{sample} میزان جذب نوری غلظت های مختلف عصاره را بیان می کند.

۲-۵-۲- آزمون بی رنگ شدن بتاکاروتن – لینولئیک اسید

برای انجام آزمایش ابتدا یک محلول پایه از بتاکاروتن – لینولئیک اسید (سیگما- آلدریچ) به صورت زیر تهیه گردید: نیم میلی گرم بتاکاروتن در ۱میلی لیتر کلروفرم حل شد و سپس ۲۵ میکرولیتر لینولئیک اسید و ۲۰۰ میلی گرم توئین ٤۰ به آن اضافه گردید و کاملاً مخلوط شد. سپس با روش تبخیر در خلاء، کلروفرم جدا گردیده و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اشباع شده از اکسیژن (۳۰ دقیقه تحت فشار ۱۰۰ میلی لیتر در دقیقه) همراه با تکان شدید به آن اضافه شد. ۲/۵ میلی لیتر از محلول تهیه شده فوق به لوله آزمایش منتقل شد و ۳۵۰ میکرولیتر از عصاره (غلظت ۲ گرم در لیتر در اتانول) به لوله آزمایش اضافه گردید. بعد از ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری در دمای اتاق، جذب نوری نمونه ها در ٤۹۰ نانومتر خوانده شد و میزان فعالیت ضد اکسایشی، از مقایسه جذب نوری نمونه ها با زمان صفر و از روی میزان پایداری رنگ زرد بتاکاروتن به درصد مورد سنجش قرار گرفت [۲۱].

$$\text{درصد مهار} = (A_{c(0)} - A_{c(24)}) - (A_{s(0)} - A_{s(24)}) / (A_{c(0)} - A_{c(24)}) * 100$$

که در این فرمول :

$A_{c(0)}$ = جذب خوانده شده برای شاهد در زمان صفر، A_c $_{(24)}$ = جذب خوانده شده برای شاهد بعد از ۲٤ساعت، $A_{s(0)}$ = جذب خوانده شده برای نمونه در زمان صفر، $A_{s(24)}$ = جذب خوانده شده برای نمونه بعد از ۲٤ ساعت می باشد.

۲-٦- تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق از طرح کاملا تصادفی در سه تکرار با نرم افزار MSTAT-C استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون‌های دانکن و T-Test در سطح معنی داری ۵ درصد صورت گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مقدار ترکیبات فنولیک و توکوفرول عصاره گیاه متکا

میزان ترکیب های فنولی و توکوفرولی دو عصاره استخراج شده با روش فوق بحرانی و فراصوت در جدول ۱ نشان داده شده است.نتایج حاصل از بررسی ترکیب های فنولی و توکوفرولی عصاره ها با استفاده از آزمون t نشان داد که دو عصاره از نظر ترکیب های یاد شده با یکدیگر اختلاف معنی دار آماری (P<۰/۰۵) نداشته اند.

Table 1 A comparison of average phenolic compounds and plant extracts, tocopherols Ferula persica

Extraction method - solvent	The amount of tocopherol (alpha-tocopherol 100 g of extract in mg)	Phenolic amount (in mg of gallic acid per 100 g extract)
Supercritical fluid - ethanol	58.6 [a]	1495.81[a]
Ultrusound – ethanol / water	56.66 [a]	1422.52[a]

Values (Mean ± SD) in the same column with different letters (a, b, c, etc.) are significantly different (Duncan, P<0/05).

از بین ترکیب های گیاهی که دارای خواص ضد اکسایشی می باشند، ترکیب های فنولی و توکوفرولی توزیع گسترده ای در بسیاری از گیاهان دارند. ویژگی های ضد اکسایشی ترکیبات فنولی و توکوفرولی عمدتاً ناشی از قدرت احیاء کنندگی و ساختار شیمیایی آن ها است که آنها را قادر به خنثی کردن رادیکال های آزاد، تشکیل کمپلکس با یون های فلزی و خاموش کردن مولکول های اکسیژن یگانه و سه گانه می سازد. ترکیب های فنولی و توکوفرولی از طریق اهداء الکترون به رادیکال های آزاد واکنش های اکسایش چربی را مهار می کنند [۲۲].

ایکسیا و همکاران[1] (۲۰۰٦) نشان دادند که فراصوت اثر بهتری بر استخراج ترکیب های فیتوشیمیایی از چای حتی در پایین ترین دما، در مقایسه با تکنیک های معمولی عصاره گیری دارد. حسن زاده و اسماعیل زاده کناری[2] (۱۳۹۳) در مطالعه ای جهت استخراج عصاره گیاه باریجه از روش سیال فوق بحرانی

1. Xia et al
2. Hasanzadeh et al

به عنوان روشی جدید در زمینه استخراج ترکیب های فعال گیاهی استفاده کردند و عصاره ی حاصل ازآن با عصاره ی به دست آمده از روش همزن را با کمک حلال آلی مقایسه کردند. نتایج آن ها نشان داد که عصاره ی حاصل از استخراج به وسیله سیال فوق بحرانی دارای ترکیب های فنولی و توکوفرولی بالاتر و به طور کلی خاصیت ضد اکسایشی بالایی بود.

۳-۲- بررسی فعالیت ضد اکسایشی

۳-۲-۱- آزمون DPPH

نمودار ۱ نشان می دهد که ضد اکسایش مصنوعی TBHQ (۷٤/۲۷ ٪) و عصاره سیال فوق بحرانی در غلظت ppm ۲۵۰۰ (۷۲/۹۷ ٪) از لحاظ آماری اختلاف معنی داری نداشتند اما هر دو آنها نسبت به عصاره فراصوت در غظت ppm ۲۵۰۰ (٦۸/۷۳ ٪) دارای اختلاف معنی دار (P<۰/۰۵) بودند. همچنین با توجه به نمودار، با افزایش غلظت عصاره میزان مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش یافت و اختلاف معنی دار آماری (P<۰/۰۵) بین غلظت های مختلف عصاره دیده شد. این نتایج در توافق با تحقیق اسماعیل زاده کناری و همکاران (۲۰۱٤) می باشد که غلظت عصاره یک فاکتور موثر در افزایش فعالیت ضد اکسایشی ذکر شده بود.

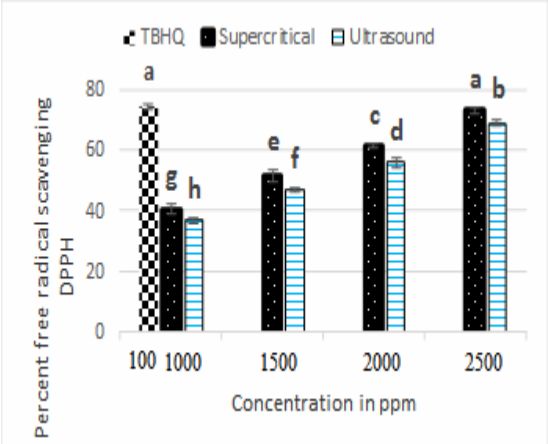

Fig 1 Average Comparison of free radical scavenging DPPH

از آنجا که هریک از مواد گیاهی دارای خواص منحصر به فرد برحسب ساختار و ترکیبات می باشد، وقتی که آنها با حلال ترکیب می شوند رفتار ترکیب حاصل شده یعنی سیستم حلال - ماده غیرقابل پیش بینی است [۲۵]. استخراج ضد اکسایش ها با روش جامد/مایع یک تکنیک خیلی موثراست، اما نتایج به دست آمده به عوامل مختلف از قبیل ترکیب مواد خام، قطبیت حلال، قطبیت ترکیبات فنولی، زمان، درجه حرارت، روش عصاره گیری و نسبت ماده جامد/ حلال در عصاره گیری بستگی دارد [۲٦]. با استفاده از روش اسپکتروفتومتری، میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر که بیانگر مقدار DPPH باقی مانده است، اندازه گیری می شود. هرچه این مقدار بیشتر باشد، فعالیت ضد اکسایش ها در حذف رادیکال آزاد کمتر بوده است. بنابراین، میزان DPPH باقی مانده به طور معکوس با فعالیت حذف کنندگی رادیکال ضد اکسایشی در ارتباط است [۲۷].

وگی و همکاران[1] (۲۰۱۱) گزارش کردند که استفاده از اتانول به عنوان اصلاحگر در روش استخراج با سیال فوق بحرانی می تواند تاثیر مثبتی بر روی بازده استخراج ترکیبات ضد اکسایشی داشته باشد. هرزی و همکاران[2] (۲۰۱۳) برای استخراج عصاره از برگ گیاه از روش های تقطیر آبی، سوکسله، و سیال فوق بحرانی دی اکسید کربن استفاده کردند. نتایج آن ها نشان داد که بهترین فعالیت ضد اکسایشی مربوط به روش استخراج با سیال فوق بحرانی است که دلیل آن زمان کم استخراج است که باعث کاهش تخریب حرارتی ترکیبات ضد اکسایشی می شود ولی در سایر روش ها به دلیل زمان زیاد استخراج، ترکیبات فنولی تجزیه شده و خاصیت ضد اکسایشی خود را از دست می دهند. این روش به دلیل زمان استخراج کمتر، آلودگی محیطی کمتر و عدم تخریب حرارتی بهترین روش پیشنهاد شده است.

۳-۲-۲- بررسی خاصیت ضد اکسایشی با بی رنگ شدن بتاکاروتن

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود درصد فعالیت ضد اکسایشی بر حسب بی رنگ شدن بتاکاروتن، ضد اکسایش مصنوعی TBHQ در ۱۰۰ppmو غلظت ppm ۲۵۰۰ عصاره سیال فوق بحرانی به ترتیب ٦٤/۷ ٪ و٦۳/٤٪ بیشترین مقدار را دارا بوده و با هم اختلاف معنی داری ندارند. سیال فوق بحرانی در غلظت ۲۵۰۰ppm (٦۳/٤ ٪)، نسبت به روش فراصوت و بقیه غلظت های عصاره اختلاف معنی داری (P<۰/۰۵) داشت. نتایج بدست آمده از الگوی خاصی پیروی نمی کند ولی باتوجه به غلظت ها و روش های استخراج با هم تفاوت دارند. با افزایش غلظت درصد بی رنگ شدن بتاکاروتن نیز بیشتر می شود که با نتایج به دست آمده توسط ایگزیا و همکاران[3] (۲۰۱۲) همخوانی دارد. آنها نیز غلظت عصاره را یک فاکتور موثر در افزایش فعالیت ضد اکسایشی ذکر کرده بودند.

1. Veggi et al
2. Herzi et al
3. Xiea et al

Table 2 Average Comparison of antioxidant activity (beta-carotene-linoleic) in terms of percentage of inhibition

Extracts	100 ppm	1000ppm	1500ppm	2000ppm	2500ppm
Supercritical fluid	*	33.8^{gh}	45.1^{e}	53.1^{c}	63.4^{a}
Ultrasound	*	30.7^{h}	41^{f}	48.3^{de}	57.6^{b}
TBHQ	64.7^{a}				

Values (Mean ± SD) in the same column with different letters (a, b, c, etc.) are significantly different (Duncan, P<0/05).

در این روش فعالیت ضد اکسایشی، با آزمون بی رنگ شدن بتاکاروتن مورد سنجش قرار گرفت، به این صورت که مواد ناشی از اکسایش اسید لینولئیک با بتاکاروتن برهم کنش داده و سبب کاهش رنگ شده و در نتیجه میزان جذب در طول موج ٤٩٠ نانومتر کاهش می یابد [٢١]. در سیستم مدل بتاکاروتن لینولئیک اسید، بتاکاروتن درغیاب ضد اکسایش سریعاً بی‌رنگ می‌شود که به دلیل اکسایش بتاکاروتن و لینولئیک اسید و تشکیل رادیکال آزاد می باشد و یکی از آزمون های تعیین فعالیت ضد اکسایشی عصاره‌ها می‌باشد. در این روش فعالیت ضد اکسایشی، با میزان مهار اکسایش لینولئیک اسید و جلوگیری از ایجاد ترکیبات فرار و هیدروپراکسیدهای کنژوگه، مورد سنجش قرار می‌گیرد [١٦]. اساس این روش، بی رنگ شدن بتاکاروتن است که ساز و کار آن، واکنش بتاکاروتن با رادیکال آزاد تولید شده در نتیجه ی تشکیل هیدروپرواکسید از لینولئیک اسید می باشد. سرعت بی رنگ شدن بتاکاروتن در حضور ضد اکسایش ها کاهش می یابد. در این روش فعالیت ضد اکسایشی، با میزان مهار اکسایش لینولئیک اسید و جلوگیری از ایجاد ترکیبات فرار مورد سنجش قرار می گیرد [٢١].

دال پرا و همکاران[1] (٢٠١٣) عصاره کلم را با کربن دی اکسید فوق بحرانی استخراج نمودند و فعالیت ضد اکسایشی آن را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن ها نشان داد که این روش برای استخراج ترکیبات ضد اکسایشی کلم موثر و کارآمد می باشد. هیدروپراکسیدها در این سیستم بوسیله ترکیبات فنولی و کاروتنوئیدی موجود در عصاره تجزیه می شوند. بنابراین هرچه میزان این ترکیبات موثره بیشتر باشد فعالیت ضد اکسایشی عصاره بیشتر است. مهدالی و همکاران[2] (٢٠١١) خاصیت ضد اکسایشی عصاره متکا به خصوصیات اکسایش/ کاهش ترکیبات موجود در عصاره بستگی دارد و نقش مهمی در جذب و خنثی نمودن رادیکال های آزاد و ایفای فعالیت ضد اکسایشی دارد.

٤- نتیجه گیری

نتایج این تحقیق حاکی از آن بود که عصاره گیاه متکا دارای ترکیبات فنولی، توکوفرولی و خاصیت ضد اکسایشی خوبی بوده و لذا می تواند منبع طبیعی غنی از ترکیبات ضد اکسایشی به شمار آید. در تحقیق حاضر عصاره بدست آمده به روش سیال فوق بحرانی در غلظت ٢٥٠٠ پی پی ام به دلیل دارا بودن بیشترین فعالیت ضد اکسایشی، نسبت به روش فراصوت برتر می باشد. همچنین در ارتباط با تاثیر غلظت عصاره، در آزمون DPPH و بی رنگ شدن بتا کاروتن، در بین چهار غلظت استفاده شده (١٠٠٠، ١٥٠٠، ٢٠٠٠ و ٢٥٠٠ پی پی ام) غلظت ٢٥٠٠ppm پی پی ام بیشترین قدرت ضد اکسایشی را داشت و فعالیت ضد اکسایشی این غلظت در روش سیال فوق بحرانی با ضد اکسایش مصنوعی TBHQ از لحاظ آماری اختلاف معنی داری نداشت. این نتایج نشان می دهد، علاوه برروش های عصاره گیری، غلظت های مختلف عصاره نیز بر روی قدرت ضد اکسایشی موثر است. اما برای استفاده عملی از روش سیال فوق بحرانی و عصاره گیاه متکا در صنعت، توصیه می شود تحقیقات بیشتری در زمینه ارزیابی قدرت ضد اکسایشی عصاره و اسانس حاصل از آن در مدل های غذایی، از جمله خالص سازی عصاره به دست آمده، تفکیک اجزاء تشکیل دهنده، ارزیابی فعالیت ضد اکسایشی اجزاء و بهینه سازی شرایط استخراج با فراصوت و سیال فوق بحرانی از نظر متغیرهایی مانند دما، زمان و نسبت ماده اولیه به حلال، انجام شود.

1. Dal pra et al
2. Mohdaly et al

۵- منابع

[1] Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammmad, M. & EL-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. FoodChemistry, 104: 1372-1378.

[2] Gao, J. J., Igalashi, K. & Nukina, M. (1999). Radical scavenging activity of phenylpropanoid glycosides in Caryopteris incana. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 63: 983-988.

[3] Zahida, W. N. (2009). Extraction of antioxidant compounds from red pitaya using Soxhlet extraction method. Thesis of Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering University Malaysia Pahang.

[4] Sonibare, M. A. & Abegunde, R. B. (2012). In vitro antimicrobial and antioxidant analysis of Dioscorea dumetorum Pax and Dioscorea hirtiflora and their bioactive metabolites from Nigeria. Journal of Applied Biosciences, 51: 3583-3590.

[5] Fennema, O. R. (1996). Food Chemistry, New York: Marcel Dekkert U.S.A.

[6] Ivanovic, J., Tadic, V., Dimitrijevic, S., Stamenic, M., Petrovic, S. & Zizovic, I. (2014). Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonicextract from blackberry cultivar "¡Ca¡canska Bestrna". Industrial Crops and Products, 53, pp: 274– 281.

[7] Vilkha, K., Mawson, R., Simons, L. & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry- A review. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9, pp: 161-169.

[8] Takeuchi, T. M., Rubano, M. L. & Meireles, M. A. A. (2010). Characterization and Functional Properties of Macela (Achyrocline satureioides) Extracts Obtained by Supercritical Fluid Extraction Using Mixtures of CO2 Plus Ethanol. Food Bioprocess Technol, 3, 804-812.

[9] Dal Pra, V., Dolwitsch, C. B., da Silveira, G. D., Porte, L., Frizzo, C., Vinicius Tres, M., Mossi, V., Mazutti, M. A., Nascimento, P . C. D., Bohrer, D., Carvalho,L. M. D., Viana, C. & Rosa, M. B. D. (2013). Supercritical CO2 extraction, chemical characterisation and antioxidant potential of brassica oleracea var capitata against HO, O2 and ROO.Food Chemistrry, 141, pp: 3954-3959.

[10] Esmaeilzadeh kenari, R. (1390). Advanced technology in the food industry. Publishing Agricultural Sciences, pp: 220-225.

[11] Floch, F. Le., Tena, M. T., Rios, A. & Valcarcel, M. (1997). Supercritical Fluid Extraction of Phenol Compounds from Olive Leaves. Department Of Analytical Chemistry, Faculty of Science, University Of Cordoba, E-14004 Cordoba, spain.

[12] Iranshahi, M., Mojarab, M., Sadeghian, H., Hanafi-Bojd, M. Y. & Schneider, B. (2008). Polar secondary metabolites of Ferula persica roots. Phytochemistry, 69, pp: 473–478.

[13] Barthomeufa, C., Lima, S., Iranshahib, M. & Chollet, P. (2008). Umbelliprenin from Ferula szowitsiana inhibits the growth of human M4Beu metastatic pigmented malignant melanoma cells through cell-cycle arrest in G1 and induction of caspase-dependent apoptosis. Phytomedicine, 15, pp: 103–111.

[14] Iranshahi, M., Amin, G., Amini, M. & Shafiee, A. (2003). Sulfur containing derivatives from Ferula persica var. latisecta. Phytochemistry, 63, pp: 965–966.

[15] Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, P. & Mason, J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from Rosmarinusofficinalis for the food and pharmaceutical industry. Ultrasonics Sonochemistry, 11, pp: 261−265.

[16] Esmaeilzadeh Kenari, R., Mohsenzadeh, F. & Amiri, Z. (2014). Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods. Food science & nutriation, 2, pp: 426–435.

[17] Delfanian, M., Esmaeilzadeh Kenari, R. & Sahari, M. A. (2014). Antioxidative effect of loquat (Eriobotrya japonica Lindl.) fruit skin extract in soybean oil. Food science & Nutrition.

[18] Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J. & Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology, 5, pp: 1142– 1145.

[19] Wong, M. L. & Timms, R. E. (1998). Colorimetric determination of total tocopherols in palm oil, olein and stearin.

Journal of the American Oil Chemists' Society, 65, pp: 258-261.

[20] Burits, M. & Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. Phytotheraphy Research, 14, pp: 323-328.

[21] Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T. A. & Linssen, P. H. (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. Journal of the Science of Food and Agriculture, 77, pp: 140–146.

[22] Ahmadi, F.; Kadivar, M. & Shahedi, M. (2007). Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Moza, in model and food systems. Food Chemistry, 105, pp: 57-64.

[23] Xia, T.; Shi, S. & Wan, X. (2006). Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion. Journal of Food Engineering, 74, pp: 557-560.

[24] Hasanzadeh, M. & Esmaeilzadeh kenari, R. (2014). The effect of supercritical fluid on Ferula gummosa plant extract antioxidant compared to using traditional methods. The National Conference chain optimization of production, distribution and consumption in the food industry, Sari, Department of Food Science and Technology Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

[25] Rafaela, G. M., Gloria Lobo, M. & Monica, G. (2010). The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. Separation and Purification Technology, 71, pp: 347–355.

[26] Laroze, L., Soto, C. & Zúñiga, M. E. (2010). Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes. Electronic Journal of Biotechnology ISSN, 0717-3458.

[27] Molyneux, P. H. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 26, pp: 211-219.

[28] Veggi, P. C., Cavalcanti, R. N. & Meireles, M. A. (2011). Modifier effects on supercritical Fluid Extraction (SFE) of some Brazilian plants: Antioxidant activity and Economical evaluation". Procedia Food Science, 1717-1724.

[29] Herzi, N., Bouajila, J., Camy, S., Romdhane, M. & Condoret, J. (2013). Comparison of different methods for extraction from Tetraclinis articulata: Yield, chemical composition and antioxidant activity. Food Chemistry, 141(4): 3537–3545.

[30] Xiea, J. H., Shena, M. Y., Xiea, M. Y., Niea, S. P., Chena, Y., Li, C. & et al. (2012). Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of Cyclocarya paliurus (Batal.) Iljinskaja polysaccharides. Carbohydrate Polymers, 89: 177–184.

[31] Mohdaly Adel, A. A., Smetanska, I., Fawzy Ramadan, M., Sarhan Mohamed, A. & Awad, M. (2011). Antioxidant potential of sesame (Sesamum indicum) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils. Industrial Crops and Products 34: 952- 959.

Optimization of extraction of *Ferula persica* plant extract using ultrasound and supercritical fluid methods and investigation antioxidant activity of its extract

Mehdinia lichaei, B. [1] ,Esmaeilzadeh kenari, R.[2*], Dinpanah, GH.[3]

1. Department of Food Science and Technology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran
2. Department of Food Science and Technology, Sari Agriculture and Natural Resources University, Sari, Iran
3. Department of Agricultural Extension and Education, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

(Received: 2015/07/12 Accepted: 2017/01/01)

The most simulating factor introduced in this researches is efforts to limit the use of synthetic antioxidant in food this is dangerous for human health. The present research was carried out aimed to optimize the extraction of phenolic and tocopherols compounds of the *Ferula persica* plant with the help of ultrasound and supercritical fluids new technology and study of anti-oxidative properties of the extracts. Therefore, the amount of phenolic, tocopherol compounds and antioxidant power of the extracts using Folin - Ciocalteu method, α- tocopherol, 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and β-carotene - linoleic acid has been investigated, and compared with a synthetic antioxidant, Tert-butylhydroquinone (TBHQ). The results showed that there was no significant difference between the amounts of phenol (1495.81 ppm) and tocopherols (58.6 ppm) extracted by supercritical method compared to the amount of phenol (1422.52 ppm) and tocopherols (56.66 ppm) extracted by ultrasound statistically. free radical scavenging percentage DPPH (72.97%), and being colorless in β-carotene system (63.4%) at concentration of 2500 ppm of extract extracted using supercritical fluid had the highest value, and there was no significant difference between it and the synthetic antioxidant TBHQ, but there was observed significant differences compared with the ultrasound method at the same concentration. The results indicate that, the *Ferula persica* plant extract has good anti-oxidant property as well as extraction method and concentration of the extract is effective on antioxidant power.

Keywords: *Ferula persica* extract, Ultrasound, Supercritical fluid, Antioxidant.

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