

بهینه سازی شرایط استخراج آنتی اکسیدانهای طبیعی گیاه چای کوهی به کمک امواج فراصوت

سروش رحیمی خویگانی^۱، احمد رجایی^{۲*}، سید امیر حسین گلی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

۲- استادیار گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

۳- دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۵/۱۲/۹۴ تاریخ پذیرش: ۱۹/۰۲/۹۵)

چکیده

در این تحقیق، شرایط استخراج به کمک امواج فراصوت آنتی اکسیدان های طبیعی چای کوهی با بیشینه سازی مجزا و همزمان راندمان فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی با روش سطح پاسخ بهینه سازی شد. یک طرح مرکب مرکزی شامل چهار متغیر مستقل قدرت امواج فراصوت، نسبت حلال به ماده خشک، زمان و ترکیب حلال در پنج سطح، شامل ۳۰ آزمون با ۶ تکرار در نقطه مرکزی استفاده شد. نتایج نشان داد که معادله درجه دوم چند جمله ای به طور موفقیت آمیزی می تواند برای بهینه سازی شرایط استخراج استفاده شود. ضرایب تبیین مدل ها برای فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی به ترتیب ۰/۸۳، ۰/۹۰ و ۰/۹۲ بود. همچنین نتایج حاصل از بهینه سازی فرآیند استخراج فنول کل نشان داد که بیشترین میزان ترکیبات فنولیک ۱۹/۸ (میلی گرم معادل گالیک اسید/گرم ماده خشک) در شرایط قدرت امواج فراصوت ۲۹۷/۸ وات، نسبت حلال به ماده خشک ۵۶/۳، زمان ۱۴ دقیقه و ترکیب حلال ۴۳/۲٪ متانول؛ بیشترین میزان فلاونوئید کل ۵/۵۴ (میلی گرم معادل کوئرستین/گرم ماده خشک) تحت شرایط قدرت امواج فراصوت ۳۰۰ وات، نسبت حلال به ماده خشک ۶۰، زمان ۱۴ دقیقه و ترکیب حلال ۶۹/۴٪ متانول و شرایط بهینه بر حسب درصد فعالیت آنتی اکسیدانی ۷۸/۴٪ در شرایط قدرت امواج فراصوت ۳۰۰ وات، نسبت حلال به ماده خشک ۴۰، زمان ۱۴ دقیقه و ترکیب حلال ۶۱/۷٪ متانول بدست آمد.

کلید واژگان: چای کوهی، آنتی اکسیدان های طبیعی، روش سطح پاسخ، استخراج به کمک امواج فراصوت

* مسئول مکاتبات: ahmadrajaei@gmail.com

۱- مقدمه

امروزه به دلیل افزایش اطلاعات مصرف کنندگان مواد غذایی در مورد تأثیرات مضر افزودنی‌های سنتزی مانند بوتیلید هیدروکسی آنیزول (BHA)^۱، بوتیلید هیدروکسی تولوئن (BHT)^۲، پروپیل گالات (PG)^۳ و ترشیاری بوتیل هیدروکینون (TBHQ)^۴ در مواد غذایی، استفاده از ترکیبات زیست فعال طبیعی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی علاقه مندان زیادی پیدا کرده است. از جمله این ترکیبات می‌توان به ترکیبات فنولیک اشاره کرد که مانع اکسیداسیون و فساد میکروبی مواد غذایی می‌شوند [۱]. این ترکیبات همچنین دارای خواص ضد حساسیتی، ضد جهش، ضد اسهال و درمان کننده زخم هستند [۲].

ترکیبات فنولیک شامل گروه گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی می‌باشند که دارای یک حلقه‌ی آروماتیک و یک یا چند گروه هیدروکسیل متصل به آن هستند. فنول، پایه‌ی اصلی ترکیبات فنولیک است و حلقه‌ی آروماتیک این ترکیبات بنزن است. عامل اصلی در ایجاد ویژگی‌های کاربردی متفاوت ترکیبات فنولیک، تنوع در تعداد گروه‌های هیدروکسیل متصل به حلقه آروماتیک می‌باشد [۳].

اولین و مهم‌ترین مرحله در دستیابی و تعیین مقدار ترکیبات فنولیک، استخراج آنها از منابع گیاهی است. ترکیبات فنولیک بسته به توزیع آنها در گیاهان و ویژگی‌های شیمیایی آنها می‌توانند توسط تکنولوژی‌ها و حلال‌های مختلف استخراج شوند. در سالهای اخیر تحقیقات متعددی در زمینه استخراج این ترکیبات از گیاهان مختلف، با روش‌های سنتی مانند سوکسله و غرقابی [۴] و نیز روش‌های نوین مانند استفاده از ماکروویو [۴] و یا امواج فراصوت [۴] صورت گرفته است. از آنجا که در

روش‌های سنتی زمان فرآیند، طولانی و مقدار حلال مصرفی زیاد 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]. در این میان، استخراج با استفاده از امواج فراصوت به دلیل کارایی بالاتر و میزان مصرف انرژی و حلال کمتر به عنوان روشی موثر در فراوری مواد گیاهی، به ویژه ترکیبات با وزن مولکولی پایین مورد توجه قرار گرفته است [۵]. امواج فراصوت به امواج با فرکانس بیش از ۱۸ کیلوهرتز گفته 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 فراوری محصولات کشاورزی و غذایی دارای کاربردهای متعددی می‌باشند [۶].

تنوع و گستره بیولوژیکی ترکیبات فنولیک باعث شده است تا محققین، استخراج ترکیبات فنولیک را از منابع طبیعی بهینه سازی کنند. علاوه بر این به دلیل تفاوت در قطبیت، غلظت، اسیدیته، تعداد گروه‌های هیدروکسیل و تعداد حلقه‌های آروماتیک ترکیبات فنولیک، باید برای استخراج هر کدام از این ترکیبات، شرایط بهینه طراحی شود [۷]. بسیاری از عوامل مثل دما، زمان و نسبت حلال‌ها می‌توان برای استخراج ترکیبات فنولیک بهینه کرد. در سالهای اخیر روش سطح پاسخ که مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضی است به دلیل مزایای متعدد از جمله نیاز به تعداد آزمایش کمتر نسبت به روشهای متداول مانند طرح فاکتوریل، مورد توجه قرار گرفته است. [۸]. گیاهان منابع غنی از ترکیبات فنولیک هستند و تحقیقات زیادی بر روی استخراج و بهینه سازی ترکیبات فنولیک از منابع گیاهی انجام شده است که از آن جمله می‌توان به استخراج این ترکیبات از گیاه مرزنجوش و برگ بو [۹،۷]، پوست سبز پسته [۱۰]، بومادران [۱۱]، پونه کوهی [۲]

اشاره کرد.

1. Butylated hydroxyanisole
2. Butylated hydroxytoluene
3. Propyl gallate
4. Tert-butylhydroquinone

۲-۲- استخراج ترکیبات فنولیک با امواج

فراصوت

مقدار معینی از نمونه با حجم مشخصی از حلال (با توجه به شرایط هر آزمایش) مخلوط شده و سپس در زیر پروب مولد امواج فراصوت به گونه‌ای قرار داده شد که پروب تا عمق ۲ سانتی متر در نمونه قرار بگیرد. سپس شدت و زمان استخراج با توجه به هر آزمایش تنظیم شد. در پایان هر استخراج، عصاره حاصل با کاغذ صافی صاف گردید.

۲-۳- اندازه‌گیری فنول کل

به منظور اندازه‌گیری فنول کل ۴۰ میکرولیتر از نمونه با سمپلر به لوله آزمایش منتقل شد. سپس به ترتیب ۳/۲ میلی لیتر آب مقطر و ۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین به آن اضافه گردید. بعد از ۸-۱ دقیقه ۶۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات ۲۰ درصد به آن اضافه گردید و جذب نمونه بعد از ۱ ساعت نگه داری آن در دمای محیط و در تاریکی با اسپکتروفوتومتر (مدل Unico UV 2100 ساخت کشور آمریکا) در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. مقدار فنول کل معادل میلی گرم گالیک اسید بر یک گرم نمونه خشک گزارش شد. تمام آزمایش‌ها در سه بار تکرار صورت گرفت [۱۴].

۲-۴- اندازه‌گیری فلاونوئید کل

به منظور اندازه‌گیری فلاونوئید کل ۴۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۶۰۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شد و سپس به آن ۰/۰۵ میلی لیتر سدیم نترات ۵ درصد اضافه گردید و بعد از ۵ دقیقه، ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد اضافه شد. سپس بعد از ۶ دقیقه به ترتیب ۰/۵ میلی لیتر سدیم هیدروکسید ۱ مولار و ۱ میلی لیتر آب مقطر به محلول اضافه شد و جذب در ۵۱۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که همه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و نتایج معادل به صورت

چای کوهی یا سنبله‌ی زیبا، گیاهی معطر با نام علمی *Stachys lavandulifolia* از خانواده‌ی نعنائیان است که به صورت خودرو در ایران می‌روید. ۳۰۰ گونه از این جنس در جهان وجود دارد که ۳۴ گونه‌ی آن در ایران یافت می‌شود که فقط ۱۳ گونه‌ی آن بومی ایران است. چای کوهی خواص زیادی دارد که از آن جمله می‌توان به درمان اسهال، خاصیت ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی اشاره کرد. خواص آنتی‌اکسیدانی این گیاه را می‌توان مربوط به ترکیبات فنولیک موجود در آن دانست [۱۲-۱۳].

با توجه به اینکه تاکنون در زمینه بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک چای کوهی مطالعه ای صورت نگرفته است، هدف از این تحقیق، بررسی ۴ متغیر زمان، ترکیب حلال، نسبت حلال به نمونه و قدرت امواج فراصوت بر روی راندمان استخراج ترکیبات فنولیک، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدانی و همچنین بهینه سازی شرایط استخراج به کمک امواج فراصوت با روش سطح پاسخ می باشد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- جمع آوری مواد گیاهی و شیمیایی

اندام های هوایی چای کوهی، از کوه‌های زاگرس در منطقه‌ی فریدن در ۱۲۰ کیلومتری غرب استان اصفهان، جمع آوری گردید و سپس توسط گروه گیاه شناسی دانشگاه صنعتی اصفهان تأیید شد. سپس نمونه ها در دمای اتاق، در سایه خشک شد و سپس با آسیاب (مولینکس ساخت کشور چین) پودر گردید. در انتها نمونه ها الک شده و در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد تا زمان آزمایش نگهداری شدند. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق با درجه خلوص بالا از شرکت های مرک و سیگما-آلد ریچ تهیه گردید.

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

که در این رابطه، Y : متغیر وابسته، β_0 : ثابت و β_i و β_{ii} و β_{ij} ثابت های برآورد شده توسط مدل می باشند. X_i و X_j سطح متغیرهای مستقل بوده و آنها به ترتیب نمایانگر اثرات خطی، درجه دوم و متقاطع^۶ متغیرهای X_1 ، X_2 و X_3 روی پاسخ می باشند. تجزیه و تحلیل رگرسیونی و واریانس (ANOVA) داده های آزمایشی به منظور انطباق مدل رگرسیونی، تعیین ضرایب رگرسیونی و تعیین معنی داری آزمون های آماری شرایط مدل و نیز ترسیم نمودارها و بهینه سازی، توسط نرم افزار (Design Expert 7)^۷ صورت پذیرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بهینه سازی شرایط استخراج به کمک

امواج فراصوت با استفاده از روش سطح پاسخ

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

متغیرهای مهم و همچنین دامنه متغیرها با استفاده از آزمایش های مقدماتی تعیین شد. با توجه به اینکه علاوه بر متغیرهای انتخاب شده، دما و اندازه ذرات نیز جزء عوامل موثر بر راندا مان استخراج هستند ولی به دلیل زیاد شدن تعداد آزمایشات اثر این دو متغیر بررسی نشد. به همین دلیل دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی گراد و اندازه ذرات بین ۲۰ و ۳۰ انتخاب شد. در ادامه متغیرها مطابق معادله ی (۲) کدگذاری شدند:

$$X_1 = \frac{X_i - \bar{X}_i}{\Delta X_i}$$

در این معادله، X_1 مقدار بدون بعد متغیر مستقل، X_i مقدار واقعی متغیر مستقل، \bar{X}_i مقدار واقعی متغیر مستقل در نقطه ی مرکزی و ΔX_i تغییر پله ای است. اعداد حاصل از معادله فوق برای متغیرهای آزمایش در جدول (۱) نشان داده شده است.

میلی گرم کوئرستین در هر گرم ماده خشک نمونه گزارش شد [۱۵].

۲-۵- اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق آزمون حذف رادیکال ۲و۲- دی فنیل پیکریل هیدرازین (DPPH) انجام شد. شرایط کار به این صورت بود که ۴۰ میکرولیتر از عصاره با ۱/۵ میلی لیتر محلول متانولی ۱ میلی مولار رادیکال آزاد ۲و۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل، مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. سپس جذب آن در ۵۱۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر خوانده شد. از حلال متانول برای صفر کردن دستگاه استفاده شد. به همراه نمونه ها یک نمونه دیگر که حاوی ۴۰ میکرولیتر متانول به همراه ۱/۵ میلی لیتر محلول ۱ میلی مولار ۲و۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل بود به عنوان نمونه شاهد استفاده شد و جذب آن در ۵۱۵ نانومتر اندازه گیری شد. همه آزمایش ها در ۳ تکرار انجام شد. درصد فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از رابطه ی زیر محاسبه شد: [۱۵]

$$X_{100} = \left(\frac{\text{جذب شاهد} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب شاهد}} \right) \times 100$$

۲-۶- طراحی آزمایش

در این تحقیق از روش سطح پاسخ با استفاده از طرح مرکب مرکزی^۵ با ۵ سطح و ۶ تکرار در نقطه مرکزی برای بهینه سازی شرایط استخراج استفاده شد [۱۶]. متغیرهای مستقل شامل قدرت امواج فراصوت (X_1)، نسبت حلال به ماده خشک (X_2)، زمان (X_3) و ترکیب حلال (X_4) بودند. تیمارهای آزمایشی به منظور به حداقل رساندن اثرات تغییرات پیش بینی نشده در پاسخ های مشاهده شده به صورت تصادفی در آمدند. مدل رگرسیونی چند جمله ای درجه دوم به منظور پیش بینی پاسخ، در نظر گرفته شد. مدل پیشنهادی برای پاسخ به صورت رابطه (۱) می باشد.

6. Cross

7. Design Expert, 7.0.0 trial, Stat-Ease Inc.

5. Central Composite Design

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

Independent variables	Coded level				
	-2	-1	0	1	2
X1(Ultrasonic power) (W)	150	200	250	300	350
X2 (Solvent to sample ratio) (v/w)	30	40	50	60	70
X3 (Time) (min)	2	6	10	14	18
X4 (Solvent composition) (% methanol)	10	30	50	70	90

تکرارپذیری فرآیند) معین شد. در ادامه آزمایش‌ها به صورت تصادفی انجام شدند (جدول ۲).

سپس بر اساس تعداد فاکتورها و سطوح آن‌ها جدول طرح آماری (۳۰ استخراج با ۶ تکرار در نقطه مرکزی برای محاسبه

Table 2 Central composite design with the observed responses for ultrasound assisted extraction (UAE) method.

No.	Run order	X1	X2	X3	X4	Total phenolics (mg gallic acid equivalent/g dry matter)	Antioxidant activity (%)	Total flavonoids (mg quercetin equivalent/g dry matter)
1	17	200	40	6	30	13.07	61.51	3.73
2	26	300	40	6	30	14.6	41.94	4.02
3	5	200	60	6	30	14.05	39.54	3.57
4	28	300	60	6	30	17.38	34.52	4.49
5	30	200	40	14	30	14.96	58.37	4.06
6	12	300	40	14	30	15.11	70.30	4.31
7	14	200	60	14	30	17.57	47.38	4.35
8	19	300	60	14	30	19.63	48.12	4.94
9	8	200	40	6	70	14.52	61.30	4.02
10	1	300	40	6	70	15.33	70.08	4.31
11	27	200	60	6	70	17.71	37.97	4.29
12	2	300	60	6	70	18.08	49.48	5.21
13	18	200	40	14	70	15.87	65.17	3.87
14	3	300	40	14	70	17.69	76.15	4.72
15	10	200	60	14	70	17.52	47.70	5.11
16	4	300	60	14	70	18.84	52.72	5.64
17	22	150	50	10	50	15.40	47.70	4.23
18	15	350	50	10	50	19.06	55.75	4.59
19	11	250	30	10	50	15.74	90.48	3.87
20	6	250	70	10	50	18.26	45.61	4.92
21	20	250	50	2	50	16.51	50.00	4.34
22	13	250	50	18	50	19.76	71.23	4.97
23	16	250	50	10	10	14.00	33.47	3.65
24	7	250	50	10	90	10.29	34.31	3.93
25	23	250	50	10	50	17.49	49.37	4.45
26	21	250	50	10	50	16.65	47.39	4.37
27	24	250	50	10	50	17.67	55.02	4.37
28	25	250	50	10	50	17.95	54.08	4.48
29	9	250	50	10	50	16.22	60.46	4.42
30	29	250	50	10	50	17.51	51.15	4.48

۳-۱-۲- برآزش مدل

در واقع مدل سازی شامل برقراری روابط کمی بین متغیرهای فرایند و پاسخ‌های مورد نظر بر اساس داده‌های آزمایش است. ضرایب تبیین برای مدل های درجه دوم مربوط به فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی به ترتیب ۰/۸۳، ۰/۹۰ و ۰/۹۲ به دست آمد (جدول ۳). در نتیجه مدل درجه دوم برای

بررسی روند تغییرات پارامترهای اندازه‌گیری شده در این مطالعه انتخاب شد. همچنین آزمون عدم برآزش روی مدل های مختلف توسط نرم افزار انجام شد که نتایج عدم برآزش برای مدل های مربوط به فنول کل و فعالیت آنتی اکسیدانی غیر معنی دار و برای مدل مربوط به فلاونوئید کل در سطح ۵ درصد معنی دار بود (جدول ۳).

Table 3 Analysis of variance of the quadratic model of different responses.

Responses	Sum of squares	Mean square	F value	P value	Correlation coefficient (R ²)	Lack of fit
Total phenolics	105.41	7.53	5.13	0.0016	0.83	0.056
Antioxidant activity	6.07	0.43	8.81	0.0001	0.90	0.0008
Total flavonoids	4669.84	333.56	12.29	0.0001	0.92	0.38

فراصوت دارای اثر خطی مثبت بودند. اما اثر درجه دوم ترکیب حلال بر روی استخراج ترکیبات فنولیک منفی بود.

برای پاسخ فلاونوئید کل با توجه به پارامترهای معنی دار شده، معادله کلی مدل درجه دوم، به صورت رابطه (۴) بدست آمد.

$$Y=4.43+0.23X_1+0.29X_2+0.18X_3+0.17X_4-0.14X_4^2 \quad (4)$$

با توجه به معادله (۴) می‌توان این گونه بیان کرد که اثر خطی قدرت امواج فراصوت و نسبت حلال به ماده خشک و همچنین زمان و ترکیب حلال بر روی استخراج ترکیبات فلاونوئیدی معنی دار و مثبت است اما اثر درجه دوم ترکیب حلال بر روی این پاسخ معنی دار و منفی است.

برای پاسخ فعالیت آنتی اکسیدانی با توجه به پارامترهای معنی دار شده، معادله کلی مدل درجه دوم، به صورت رابطه (۵) بدست آمد.

$$-Y=52.91+1.69X_1-3.84X_2^2+3.1X_1X_4+2.52X_4+9.88X_2+4.67X_3+4.7X_4^2$$

با توجه به معادله (۵) اثر خطی نسبت حلال به ماده خشک و اثر درجه دوم ترکیب حلال بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی معنی دار و منفی است و اثر خطی زمان و ترکیب حلال و اثر درجه دوم نسبت حلال به ماده خشک معنی دار و مثبت است. همچنین اثر متقابل قدرت امواج فراصوت و ترکیب حلال معنی دار و مثبت است.

پس از انتخاب بهترین مدل در سطح آماری مورد نظر (۹۹٪ یا ۹۵٪)، جهت بررسی پارامترهای اثرگذار در این تحقیق با توجه به جدول آنالیز واریانس (ANOVA)، پارامتری که آزمون F برای آن معنی دار نبود ($P>0.01$) از مدل حذف شد و سایر پارامترها که دارای اختلاف معنی دار در سطح (۹۵٪) بودند در مدل نگهداری شدند. لازم به ذکر است که اگر پارامتر خطی یک متغیر در یک مدل، اثر معنی داری نداشته باشد ولی اثر متقابل آن، با یکی از متغیرهای دیگر که آن متغیر دارای اثر معنی داری در مدل بوده، دارای اثر معنی دار باشد، آن پارامتر در مدل نگه داشته شده و سپس معادله کلی با استفاده از ضرایب داده شده برای هر پارامتر حاصل می‌گردد [۲]. در نهایت در بین پارامترهای مختلف، پارامتری که بیشترین مجموع مربعات را داشته باشد به عنوان اثرگذارترین پارامتر انتخاب می‌شود.

بنابراین با توجه به پارامترهای معنی دار شده، معادله کلی مدل درجه دوم برای پاسخ فنولیک کل، به صورت رابطه (۳) گزارش شد.

$$Y=17.25+0.78X_1+1.03X_2+0.79X_3-1.23X_4^2$$

با توجه به رابطه (۳)، پارامتر نسبت حلال به ماده خشک به عنوان موثرترین فاکتور در استخراج ترکیبات فنولیک انتخاب شد. همچنین نسبت حلال به ماده خشک، زمان و قدرت امواج

مطابق شکل های ۱ و ۲ بیشترین فنول کل و فلاونوئید کل به ترتیب با قدرت امواج فراصوت بیشتر از ۲۷۰ وات، نسبت حلال به مواد جامد ۵۵ و زمان استخراج ۱۲ دقیقه قابل دست یابی است.

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

میزان فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی

در شکل های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب اثر متغیر های مهم بر میزان فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی نشان داده شده است.

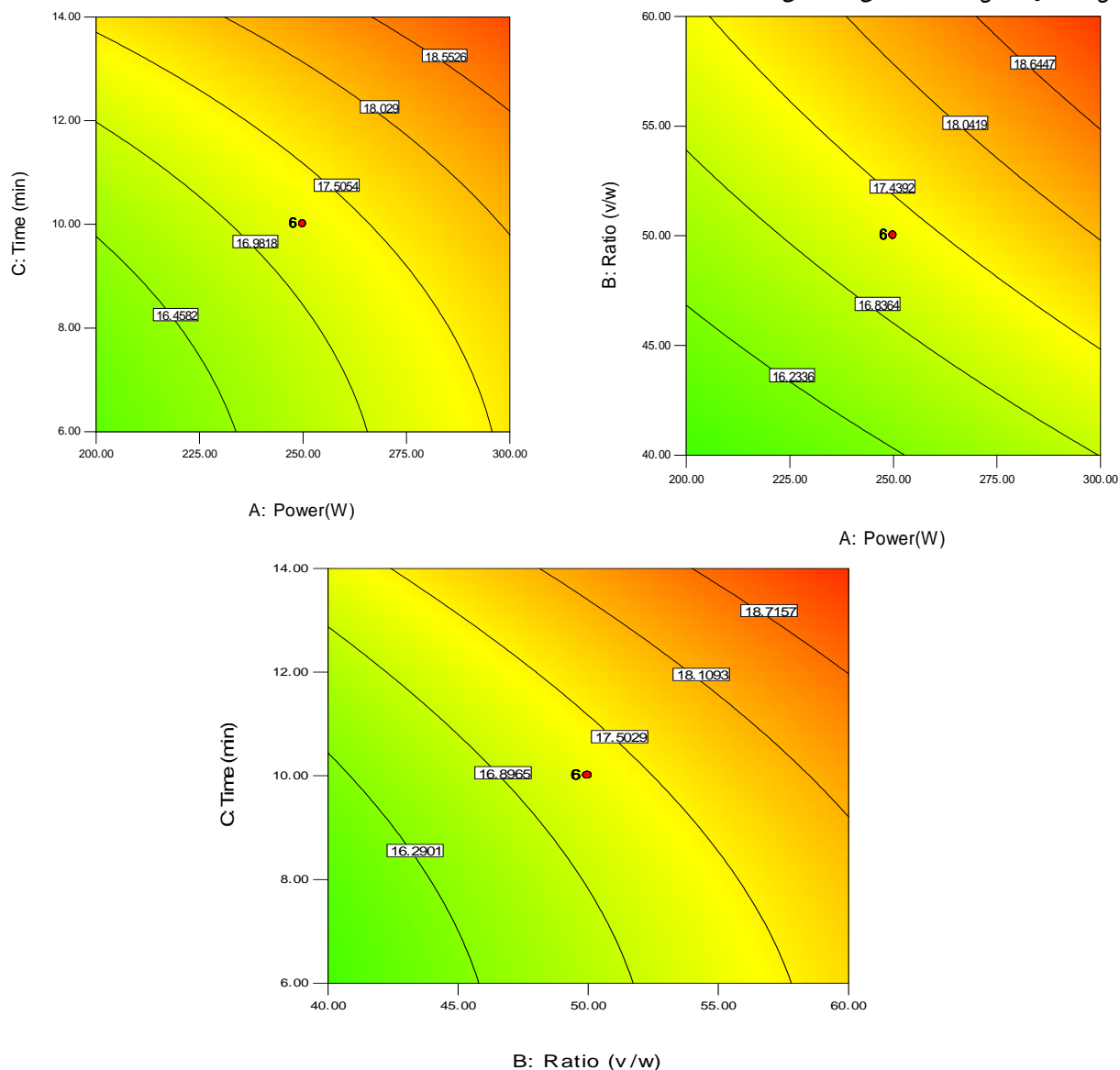


Fig 1 Contour plot of total phenolics during different combinations of time, ratio and ultrasonic power.

نسبت حلال های بیشتر از ۴۵، زمان بیشتر از ۱۳ دقیقه، و ترکیب حلال ۴۰ تا ۷۰ درصد متانول به دست آمد.

مطابق با شکل ۲ بیشترین میزان راندمان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی در محدوده ۵۰ تا ۷۰ درصد متانول به دست آمد. همچنین مطابق شکل ۳ حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی برای

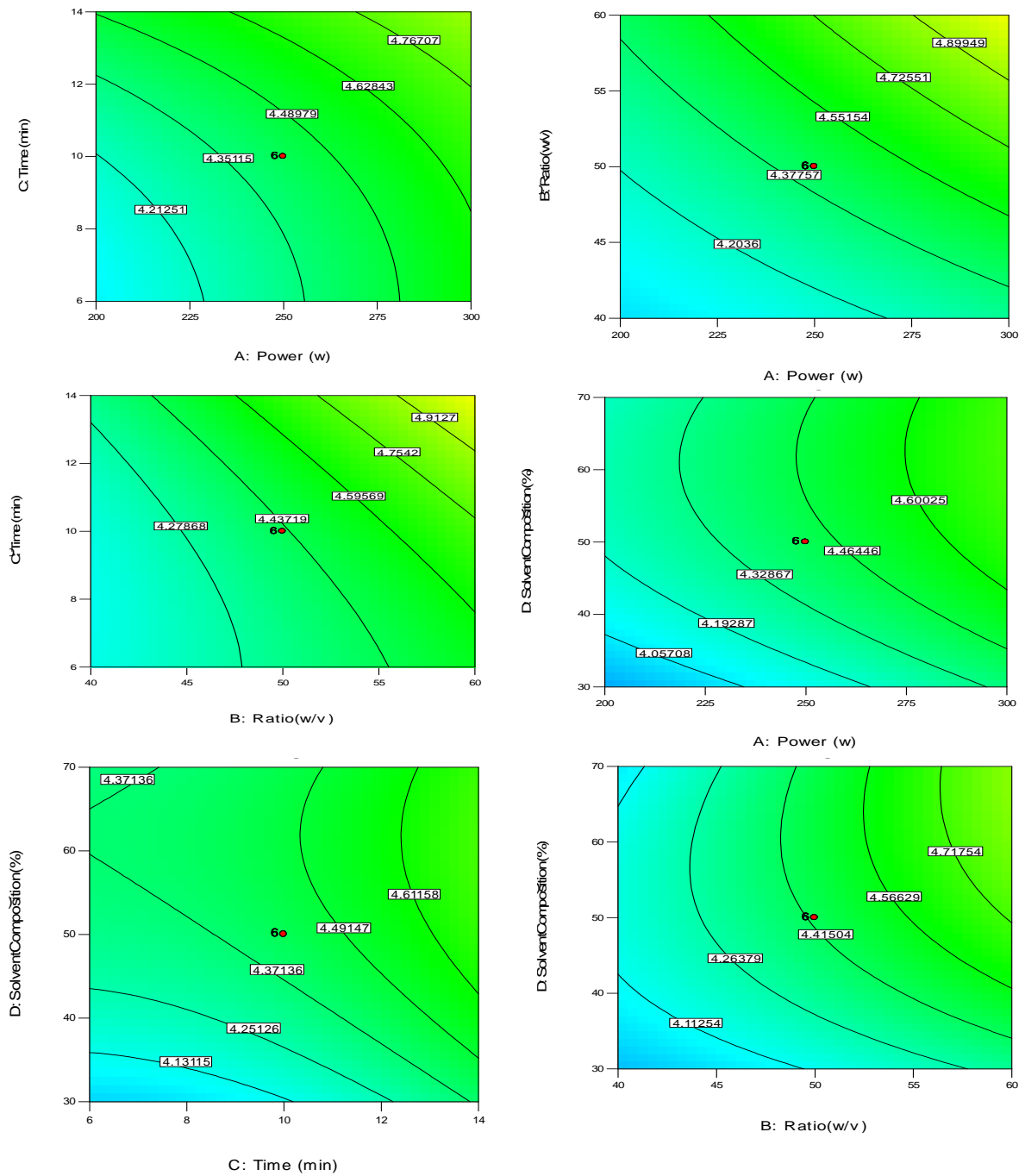


Fig 2 Contour plot of total flavonoids during different combinations of time, ratio, ultrasonic power and solvent composition.

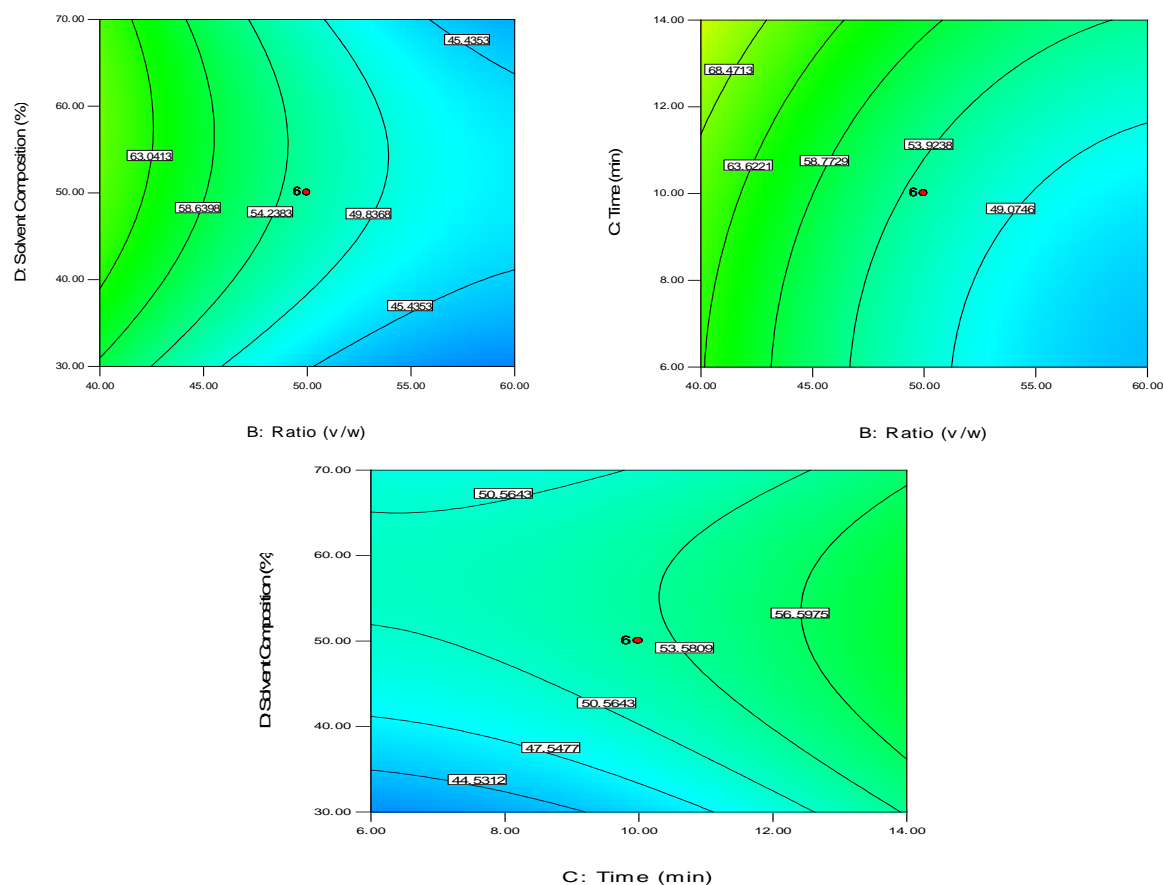


Fig 3 Contour plot of antioxidant activity during different combinations of time, ratio and solvent composition.

ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. نسبت حلال به نمونه در حدود مقدار متوسط (۱:۱۷/۵) نسبت مناسبی برای استخراج ترکیبات فنولیک از ریشه شیرین بیان گزارش شد. همچنین نتایج آن‌ها نشان داد که در مقادیر پایین حلال به نمونه جامد، حلالیت ترکیبات فنولیک با افزایش نسبت بهبود یافت. همچنین گزارش شده است که میزان شکستن غشای سلولی مواد جامد با افزایش حلال افزایش می‌یابد و نسبت حلال به جامد به وسیله تأثیر بر شیب غلظت، سرعت استخراج را تغییر می‌دهد. افزایش نسبت حلال به مواد جامد، شیب غلظت و به تبع آن سرعت نفوذ ترکیبات از فاز جامد به مایع را افزایش می‌دهد [۱۸]. نتایج حاصل از تحقیقات رحیمی پناه و همکاران در ارزیابی برخی عوامل مؤثر بر میزان عصاره و ترکیبات فنولی پوست سبز گردو نشان داد که افزایش زمان استخراج، منجر به افزایش میزان استخراج ترکیبات فنولی می‌شود و در بررسی اثر غلظت حلال، مشخص شد که با کاهش غلظت متانول از ۱۰۰٪ به ۶۰٪ میزان

تحقیقات مختلفی در زمینه بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولیک از منابع مختلف با استفاده از روش استخراج به کمک امواج فراصوت انجام شده است. از جمله در تحقیقی شاد دل و همکاران (۱۳۹۲) فرآیند استخراج مواد زیست فعال از پوست بنه را بهینه سازی نمودند. نتایج آن‌ها حاکی از آن بود که مدت زمان استخراج و همچنین نسبت حلال به نمونه اثر معنی داری بر میزان استخراج دارند. همچنین نتایج این محققین نشان داد که با افزایش مدت زمان استخراج، میزان استخراج ترکیبات فنولیک به صورت خطی افزایش یافت و افزایش نسبت حلال به نمونه تا مقدار معینی موجب افزایش میزان استخراج ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی اکسیدانی شد [۱۷]. کرمی و همکاران استخراج ترکیبات فنولیک از ریشه شیرین بیان را به کمک امواج مایکروویو انجام دادند. نتایج آن‌ها حاکی از این بود که با افزایش زمان استخراج، مقدار استخراج ترکیبات فنولیک افزایش یافت و میزان استخراج ترکیبات فنولی با افزایش نسبت حلال به جامد

آنتی اکسیدانی ۷۸/۴ درصد حاصل شد. شرایط بهینه برای استخراج ترکیبات فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی به طور همزمان توسط نرم افزار، مقادیر قدرت امواج فراصوت ۲۹۹/۸ وات، نسبت حلال به ماده خشک ۶۰، زمان ۱۴ دقیقه و ترکیب حلال ۵۹/۴٪ بود که تحت این شرایط میزان استخراج فنول کل ۱۹/۸ (میلی گرم معادل گالیک اسید/گرم ماده خشک)، فلاونوئید کل ۵/۴۹ (میلی گرم معادل کوئرستین/ گرم ماده خشک) و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی ۵۷/۲ درصد به دست آمد.

از نظر فن آوری، شرایط دیگری که نتایج نزدیک به شرایط بهینه را ارائه می کند می تواند، مطلوب باشند. این مسئله وقتی که برخی اشکالات مربوط به فرایند، همانند استفاده از مقدار زیاد حلال یا مشکل تخریب ترکیبات فنولیک در دماهای بالا وجود دارد، حائز اهمیت است که در این شرایط می توان از شرایطی که نزدیک به شرایط بهینه است استفاده کرد.

۳-۲- اعتبار سنجی مدل ها

در روش سطح پاسخ مرحله ای به نام اعتبارسنجی وجود دارد، در این مرحله می بایست شرایط استخراجی خارج از مجموعه آزمایش های انجام شده انتخاب و در شرایط آزمایشگاهی دوباره عمل استخراج انجام شود و نتایج با میزان پاسخ پیش بینی شده توسط مدل به طریق آماری مقایسه شود.

در جدول (۴) مقدار فنول کل، فلاونوئید کل و درصد فعالیت آنتی اکسیدانی در مرحله آزمایش با مقدار پیش بینی شده توسط مدل نشان داده شده است.

با توجه به مقادیر پیش بینی شده و واقعی با سطح اطمینان ۹۵ درصد می توان گفت که مقادیر پیش بینی شده برای پاسخها، با مقدار اندازه گیری شده در شرایط واقعی مطابقت دارد در نتیجه درستی مدل ها تأیید می شود.

ترکیب های فنلی استخراجی افزایش می یابد [۱۹]. در تحقیقی بهینه سازی 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 روش سطح پاسخ انجام شد و مشخص شد که با افزایش غلظت و زمان استخراج، مقدار استخراج ترکیبات فنولیک افزایش یافت [۲۰]. با بررسی یافته های تحقیق حاضر در مقایسه با نتایج کارهای گذشته، در برخی موارد تفاوت مشاهده می شود. این تفاوت ها ممکن است در نتیجه نوع ماده یا اندازه ذرات باشد. اما در برخی موارد نتایج تقریباً مشابه با یافته های این تحقیق می باشد مثلاً زمان مربوط به استخراج ترکیبات فنولیک از هسته *Citrus limon* [۲۱] از جمله این موارد است. علاوه بر این، نقطه بهینه متغیر ترکیب حلال در کارهای ذکر شده در نقطه میانه بود که تقریباً مشابه کار حاضر است.

۳-۱-۴- تعیین شرایط بهینه فنول کل، فلاونوئید کل و

فعالیت آنتی اکسیدانی

به منظور استخراج هر چه بیشتر فنول کل از گیاه چای کوهی شرایط بهینه با توجه به معادله (۳) توسط نرم افزار به صورت، قدرت امواج فراصوت ۲۹۷/۸ وات، نسبت حلال به ماده خشک ۵۶/۳، زمان ۱۴ دقیقه و ترکیب حلال ۴۳/۲٪ انتخاب شد که تحت این شرایط میزان استخراج ۱۹/۸ (میلی گرم معادل گالیک اسید/گرم ماده خشک) بود. شرایط بهینه فلاونوئید کل با توجه به معادله (۴) به صورت، قدرت امواج فراصوت ۳۰۰ وات، نسبت حلال به ماده خشک ۶۰، زمان ۱۴ دقیقه و ترکیب حلال ۶۹/۴٪ انتخاب شد که تحت این شرایط میزان استخراج ۵/۵۴ (میلی گرم معادل کوئرستین/گرم ماده خشک) بود. شرایط فعالیت آنتی اکسیدانی با توجه به معادله (۵) توسط نرم افزار، قدرت امواج فراصوت ۳۰۰ وات، نسبت حلال به ماده خشک ۴۰، زمان ۱۴ دقیقه و ترکیب حلال ۶۱/۷٪ بود. تحت این شرایط میزان فعالیت

Table 4 Comparison of predicted and observed values for the response variables.

Responses	Independent variables				observed values	Predicted values
	Ultrasonic power (W)	Solvent to sample ratio (v/w)	Time (min)	Solvent composition (% methanol)		
Total phenolics (TP)	300	40	14	60	16.59±0.18	17.66
Total flavonoids (TF)	300	40	14	60	4.48±0.32	4.45
Antioxidant activity (AA)	300	40	14	60	80±0.39	78.03

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] Şahin, S., Aybastier, Ö., Işık, E., 2013. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology. Food Chemistr, 141, 1361-1368.
- [8] Mizubuti, I. Y., Junior, O. B. de., Olivia souza, L. W. dos., Santos Ferrera da Silva, R. S., Ida E. I. 2000. Rspnse surface methodology for extraction optimization of pigeon pea protein. Food Chemistry, 70, 259-265.
- [9] Muñiz-Márquez, D. B., Martínez-Ávila, G. C., Wong-Paz, J. E., Belmares-Cerda, R., Rodríguez-Herrera, R., and Aguilar, C. N. 2013. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. Ultrasonics Sonochemistry, 20, 1149-1154.
- [10] Rajaei, A., Barzegar, M., Hamidi, Z., and Sahari, M. 2010. Optimization of extraction conditions of phenolic compounds from pistachio (*Pistachia vera*) green hull through response surface method, Journal of Agriculture and Science Technology, 12, 605-615.
- [11] Bashi, D.S., Mortazavi, S.A., K. Rezaei, K., Rajaei, A., and Karimkhani, M.M. 2012. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from yarrow (*Achillea beibrestinii*) by response surface methodology, Food Science and Biotechnolgy, 21, 1005-1011.
- [12] Khadivi-Khub, A., Aghaei, Y., Mirjalili, M.-H. 2014. Phenotypic and phytochemical diversity among different populations of *Stachys lavandulifolia*. Biochemical Systematics and Ecology, 54, 272-278.
- [13] Tundis, R., Peruzzi, L., Menichini, F. 2014. Phytochemical and biological studies of *Stachys* species in relation to chemotaxonomy: A review. Phytochemistry, 102: 7-39.
- [14] Waterhouse, A. L. 2002. Determination of total phenolics, In: Current Protocols in Food Analytical Chemistry: New York: John Wiley & Sons, 2-3.

۴- نتیجه گیری

بهترین مدل تجزیه و تحلیل آماری در روش سطح پاسخ برای هر سه پاسخ، مدل درجه دوم بود که با ضریب تبیین خوبی داده‌ها را برازش داد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که در بین چهار متغیر بررسی شده متغیر نسبت حلال به ماده خشک بیشترین تاثیر را بر هر سه پاسخ راندمان فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی، داشته است. شرایط بهینه برای دست یابی به حداکثر راندمان استخراج ترکیبات فنولیک و فلاونوئید با بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی به طور همزمان، قدرت امواج فراصوت ۲۹۹/۸ وات، نسبت حلال به ماده خشک ۶۰، زمان ۱۴ دقیقه و ترکیب حلال ۵۹/۴٪ متانول، بود که تحت این شرایط میزان استخراج فنول کل ۱۹/۸ (میلی گرم معادل گالیک اسید / گرم ماده خشک)، فلاونوئید کل ۵/۴۹ (میلی گرم معادل کوئرستین / گرم ماده خشک) و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی ۵۷/۲ درصد به دست آمد. با توجه به نتایج تحقیق حاضر می توان گفت که جای کوهی یک منبع بالقوه از ترکیبات آنتی اکسیدانی است و با توجه به اینکه این گیاه معطر است در کنار استفاده از اسانس آن، عصاره این گیاه نیز به دلیل فعالیت آنتی اکسیدانی و غنی بودن از ترکیبات فنولیک قابلیت استفاده در صنایع غذایی را دارا می باشد.

۵- منابع

- [1] Shah, M. A., Bosco, S. J. D., and Mir S. A. 2014. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. Meat Science, 98, 21-33.
- [2] 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 (*Phlomidioschema parviflorum*) leaves using response surface methodology. Industrial Crops and Products, 57, 195-202.
- [3] Vermerris, W., Nicholson, R. 2006. Phenolic compound biochemistry. Springer, 1-2.
- [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

- compound extraction from licorice root by microwave assisted method. *Food Processing and Preservation*, 2, 33-56.
- [19] Rahimipناه, M., Hamedi, M., and Mirzapour, M. 2011. Analysis of some factors affecting the phenolic compounds extracted from green husk of walnut (*Juglans regia* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 27, 419-430.
- [20] Silva, E. M., Roges, H., and Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction of phenolics from *ginga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55, 381-387.
- [21] Dahmoune, F., Boulekbache, L., Moussi, K., Aoun, A., Spigno, G., and Madani, K. 2013. Valorization of Citrus limon residues for the recovery of antioxidants: Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, 50, 77-87.
- [15] Hatamnia, A.A., Abbaspour, N., and Darvishzadeh, R. 2014. Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*) fruits. *Food Chemistry*, 145, 306-311.
- [16] 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.
- [17] Shaddel, R., Haddad-Khodaparast, M. H., Maskooki, A., Sharif, A., and Azadmard-Damirchi, S. 2013. Optimization of bioactive compounds extraction process from bene hull (*Pistacia atlantica*) using subcritical water by response surface methodology. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*, 23, 69-80.
- [18] Karami, Z., Mirzaee, H. A., Emam-Djomeh, Z., Khomeiri, M., Sadeghi Mahoonak, A. R., and Aydani, E. 2012. Modeling and Optimization of phenolic

Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions of natural antioxidants from *Stachys lavandulifolia*

Rahimi Khoigani, S. ¹, Rajaei, A. ^{2*}, Goli, S. A. H. ³

1. Food Science and Technology Department, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
2. Food Science and Technology Department, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
3. Food Science and Technology Department, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

(Received: 2016/03/05 Accepted:2016/05/08)

In this study, ultrasound-assisted extraction (UAE) conditions of natural antioxidants from *Stachys lavandulifolia*, with the separate and simultaneous maximization of total phenolic (TP), total flavonoid (TF) and antioxidant activity (AA) by response surface methodology, were optimized. A central composite design, with four independent variables including power of ultrasound, (W), time (min), liquid to solid ratio, and solvent composition (%), with 30 runs at five levels with six replicates at the central point, was used. Results exhibited that the second-order polynomial model could be successfully used for optimizing the extraction parameters. Correlation coefficients (R^2) of the models for TP, TF and AA were 0.83, 0.90 and 0.92, respectively. The results of the optimization process of extraction showed that the highest concentration of TP (19.8 mg gallic acid equivalents (GAE)/g of dry matter (DM)) in the conditions were power of ultrasound 297.8 W, liquid to solid ratio 56.3, time 14 min and solvent composition 43.2% methanol; the highest concentration of TF (5.54 mg quercetin equivalents (QE)/g DM) in the conditions were power of ultrasound 300 W, liquid to solid ratio 60, time 14 min and solvent composition 69.4% methanol, and the optimum conditions in terms of AA 78.4% under conditions were obtained at power of ultrasound 300 W, liquid to solid ratio 40, time 14 min and solvent composition 61.7% methanol.

Key words: *Stachys lavandulifolia*, Natural Antioxidant, Response Surface Methodology, Ultrasound Assisted Extraction

* Corresponding Author E-Mail Address: ahmadrajaei@gmail.com