

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده : کشاورزی
گروه : باغبانی و صنایع غذایی

پایان نامه کارشناسی ارشد

بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک گیاه سنبله زیبا (چای کوهی) به کمک امواج فراصوت

سروش رحیمی خویگانی

استاد راهنما :
دکتر احمد رجایی

شهریور ۹۴

دانشگاه شاهرود

دانشکده: کشاورزی

گروه: باغبانی علوم و صنایع غذایی

پایان نامه کارشناسی ارشد آقای سروش رحیمی خویگانی به شماره دانشجویی: ۹۲۰۶۷۶۴:

تحت عنوان:

بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک گیاه سنبله زیبا (چای کوهی) به کمک امواج فراصوت

در تاریخ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد
مورد ارزیابی و با درجه مورد پذیرش قرار گرفت.

امضاء	اساتید مشاور	امضاء	اساتید راهنما
	نام و نام خانوادگی :		نام و نام خانوادگی: دکتر احمد رجایی نجف آبادی
	نام و نام خانوادگی :		نام و نام خانوادگی :

امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء	اساتید داور
	نام و نام خانوادگی: دکتر مریم عجم حسنی		نام و نام خانوادگی: دکتر کامبیز جهان بین
			نام و نام خانوادگی: دکتر حمیدرضا صمدلوئی
			نام و نام خانوادگی :
			نام و نام خانوادگی :

تقدیم به

پدر بزرگوارم، مظهر صداقت، مهربانی، صمیمیت و
بردباری

مادر عزیزم، یگانه خورشید تابان عرصه وجودم

خواهر عزیزتر از جانم

برادرم، پشتیبان مهربانم

سرو وجودشان همواره سرسبز و استوار باد

"من لم يشكر المخلوق، لم يشكر الخالق"

سپاس و قدردانی:

حمد و سپاس بیکران خداوند سبحان را که چون همیشه بر بنده خویش منت نهاد و توانایی و توفیق تحقیق در گوشه‌ای از میهن عزیز را بر او عنایت فرمود. در انجام این تحقیق خود را مدیون زحمات و مساعدت‌های عزیزان بسیاری می‌دانم که بی‌تردید، بدون یاری و همکاری ایشان، امکان به نتیجه رسیدن آن وجود نداشت. در اینجا بر خود لازم می‌دانم که زحمات‌شان را ارج نهاده و صمیمانه از همه آنها تشکر نمایم:

اساتید گرانقدر، جناب آقای دکتر احمد رجایی و دکتر سید امیر حسین گلی که راهنمایی این تحقیق را بر عهده داشتند. بزرگوارانی که با پشتکار و تلاش زایدالوصف، دلسوزانه و با خلوص نیت برای این مهم زحمت زیادی کشیدند و در تمام طول تحصیل از راهنمایی‌های ارزنده و بی‌دریغ ایشان بهره‌مند شدم. سپاس‌گذاری از ایشان را بر خود واجب می‌دانم.

آقایان دکتر حمیدرضا صمدلوئی و دکتر کامبیز جهان بین به عنوان هیات داوران، که با قبول زحمت مطالب این تحقیق را کنترل نموده و با ارایه راهنمایی‌های ارزنده اینجانب را یاری نموده‌اند.

دوستان بسیار عزیز و گرامی‌ام، همکلاسی‌های خوبم و تمامی کسانی که امکان تشکر از تک تک ایشان در اینجا مقدور نیست، به خاطر کمک‌ها و همکاری‌های صمیمانه ایشان در طول دوران تحصیل تشکر و قدردانی می‌کنم.

در پایان ولی نه به عنوان کمترین از خانواده محترم، سرمایه وجودم، بویژه اولین آموزگار، مادر دلسوز و پدر بزرگوارم، همچنین خواهر و برادرم که همواره در طول مدت تحصیل پشتیبان و یاری رسانم بوده‌اند، خاضعانه سپاسگزارم.

سخن آخر آنکه، عزت نزد خداوند است، سپاس بیکران، آن یاری‌دهنده متعال را سزااست که ما راره پوی مسیری قرار داده تا بتوانیم سهمی کوچک در راه اعتلای میهن عزیزمان، ایران داشته باشیم.

تعهد نامه

اینجانب سروش رحیمی خویگانی، دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی-علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود نویسنده پایان نامه بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک گیاه سنبله زیبا (چای کوهی) به کمک امواج فراصوت تحت راهنمایی آقای دکتر احمد رجایی نجف آبادی متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه شاهرود » و یا « Shahrood University » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

سنبله زیبا (چای کوهی) با نام علمی *Stachys Lavandulifolia* Vahl بزرگترین گونه جنس سنبله (*stachy.L*) است و به صورت خودرو در ایران می‌روید. این گیاه دارای خواص دارویی و آنتی اکسیدانی زیادی است. در این تحقیق روش سطح پاسخ برای ارزیابی اثر شرایط استخراج (قدرت امواج فراصوت، نسبت نمونه به حلال، زمان استخراج و غلظت حلال) بر روی فنول کل (TPC)، فلاونوئید کل (TFC)، فعالیت آنتی اکسیدانی (AA)، فعالیت آنتی اکسیدانی به ازاء هر میلی گرم فنول کل (AA/mgTPC) و فعالیت آنتی اکسیدانی به ازاء هر میلی گرم فلاونوئید کل (AA/mgTFC) استفاده شد. با توجه به نتایج آنالیز واریانس بهترین مدلی که پاسخ‌ها را توصیف کرد معادله درجه دوم چند جمله‌ای بود. شرایط بهینه برای تمام پاسخ‌ها به طور همزمان عبارت بودند از: امواج فراصوت با قدرت ۳۰۰ وات، نسبت ۱ به ۴۰ نمونه به حلال، زمان ۱۴ دقیقه و حلال با غلظت ۶۰ درصد. تحت شرایط مذکور مقدار فنول کل، فلاونوئید کل، درصد فعالیت آنتی اکسیدانی، (AA/mgTPC) و (AA/mgTFC) به ترتیب برابر با $16/59 \pm 0/18$ (میلی گرم معادل میلی گرم اسید گالیک)، $44/81 \pm 0/79$ (میلی گرم معادل میلی گرم کوئرستین)، $80 \pm 0/39\%$ ، $4/82\%$ و $1/78\%$ بود. خاصیت احیاکنندگی آهن و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و همچنین مقدار IC_{50} عصاره سنبله زیبا در شرایط بهینه به ترتیب برابر با: $0/004 \pm 0/001$ (جذب به ازاء ۰/۱ میلی گرم فنول)، $14/61$ (میلی گرم معادل میلی گرم BHT) و $4/03$ (میکروگرم معادل میکروگرم اسید گالیک) بود. همچنین ترکیبات فنولیک عصاره سنبله زیبا با دستگاه کروماتوگرافی مایع-طیف سنج جرمی مورد آنالیز قرار گرفت که ۴۵ ترکیب فنولی شناسایی گردید.

کلمات کلیدی: سنبله زیبا، ترکیبات فنولیک، روش سطح پاسخ، استخراج به کمک امواج

فراصوت، کروماتوگرافی مایع-طیف سنج جرمی

لیست مقالات مستخرج از پایان نامه:

- (۱) بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولیک با امواج فراصوت از گیاه سنبله‌ی زیبا (*Stachys lavandulifolia*)
- (۲) بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک با حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی به کمک امواج فراصوت از گیاه سنبله زیبا (*Stachys lavandulifolia*)
- (۳) بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی به کمک امواج فراصوت از گیاه سنبله زیبا (*Stachys lavandulifolia*) با روش سطح پاسخ
- (۴) بهینه سازی استخراج ترکیبات فلاونوئیدی با امواج فراصوت از گیاه سنبله زیبا (*Stachys lavandulifolia*)

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه	۱
۱-۱- مقدمه	۲
۲-۱- اهداف تحقیق	۴
فصل دوم: کلیات و مروری بر منابع	۷
۱-۲- گیاه شناسی سنبله زیبا (چای کوهی)	۸
۱-۱-۲- ساقه	۹
۲-۱-۲- برگ	۹
۳-۱-۲- گل	۹
۴-۱-۲- فصل رویش گیاه و مناطق جغرافیایی رویش	۹
۲-۲- ترکیبات شیمیایی سنبله زیبا	۱۰
۳-۲- ترکیبات فنولیک	۱۱
۱-۳-۲- اسیدها فنولیک	۱۱
۲-۳-۲- فلاونوئیدها	۱۲
۳-۳-۲- تانن ها	۱۴
۴-۲- امواج فراصوت	۱۵

- ۱۵ ۲-۴-۱- مکانیسم اثر امواج فراصوت
- ۱۶ ۲-۴-۲- کاربرد امواج فراصوت
- ۱۷ ۲-۴-۳- انواع دستگاه مولد امواج فراصوت
- ۱۸ ۲-۴-۳-۱- حمام فراصوت
- ۱۸ ۲-۴-۳-۲- پروب فراصوت
- ۱۸ ۲-۵- اکسیداسیون
- ۱۹ ۲-۵-۱- اکسیداسیون با اکسیژن دی رادیکالی سه گانه
- ۲۰ ۲-۵-۱-۱- مکانیسم اکسیداسیون اکسیژن سه گانه
- ۲۱ ۲-۵-۲- مکانیسم اکسیداسیون با اکسیژن غیر رادیکالی یگانه
- ۲۳ ۲-۶- آنتی اکسیدان
- ۲۳ ۲-۶-۱- ویژگی‌های لازم برای آنتی اکسیدان‌های مورد استفاده در مواد غذایی
- ۲۴ ۲-۶-۲- طبقه بندی آنتی اکسیدان‌ها
- ۲۴ ۲-۶-۲-۱- آنتی اکسیدان‌های اولیه
- ۲۵ ۲-۶-۲-۲- آنتی اکسیدان‌های ثانویه
- ۲۷ ۲-۷- روش‌های اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی
- ۲۷ ۲-۷-۱- روش حذف رادیکال آزاد ۲و۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)
- ۲۹ ۲-۷-۲- روش احیاء آهن
- ۲۹ ۲-۸- روش سطح پاسخ
- ۳۱ ۲-۹- مروری بر کارهای گذشته
- ۳۱ ۲-۹-۱- بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولیک

۳۳	۲-۹-۲- اندازه‌گیری خواص آنتی اکسیدانی
۳۴	۲-۹-۳- شناسایی ترکیبات فنولیک با کروماتوگرافی مایع
۳۷	فصل سوم: مواد و روش‌ها
۳۸	۱-۳-۱- مواد مورد استفاده
۳۸	۲-۳-۱- وسایل و تجهیزات مورد استفاده
۳۸	۳-۳-۱- روش‌ها
۳۸	۳-۳-۱-۱- آماده سازی نمونه
۳۹	۳-۳-۲- استخراج به کمک امواج فراصوت
۴۰	۳-۳-۳- اندازه‌گیری محتوی فنول کل
۴۰	۳-۳-۳-۱- رسم منحنی استاندارد اسید گالیک
۴۰	۳-۳-۳-۲- تهیه محلول سدیم کربنات
۴۱	۳-۳-۴- اندازه‌گیری فلاونوئید کل
۴۱	۳-۳-۴-۱- رسم منحنی استاندارد کوئرستین
۴۲	۳-۳-۵- تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی
۴۲	۳-۳-۵-۱- روش حذف رادیکال آزاد ۲و۲- دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)
۴۲	۳-۳-۵-۲- روش احیاء آهن
۴۳	۳-۳-۵-۳- روش اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی کل
۴۴	۳-۳-۶- تشخیص ترکیبات فنولیک در عصاره با کروماتوگرافی مایع- طیف سنج جرمی
۴۵	۳-۳-۷- روش آماری و نرم افزارهای مورد استفاده
۴۷	فصل چهارم: نتایج و بحث
۴۸	۴-۱- مقایسه استخراج ترکیبات فنولیک به کمک امواج فراصوت و آزمون شاهد (روش غرقابی)
۴۹	۴-۲- انتخاب بهترین حلال

۵۰	۳-۴- تعیین دامنه متغیرها
۵۰	۴-۳-۱- اثر نسبت نمونه به حلال
۵۱	۴-۳-۲- اثر زمان استخراج
۵۲	۴-۳-۳- اثر قدرت امواج فراصوت
۵۳	۴-۴- بهینه سازی شرایط استخراج به کمک امواج فراصوت با استفاده از روش سطح پاسخ
۵۶	۴-۴-۱- برازش مدل
۵۸	۴-۴-۲- مدل استخراج ترکیبات فنولیک
۵۸	۴-۴-۳- مدل استخراج ترکیبات فلاونوئیدی
۵۹	۴-۴-۴- مدل فعالیت آنتی اکسیدانی (AA)
۵۹	۴-۴-۵- مدل فعالیت آنتی اکسیدانی به ازاء یک میلی گرم فنول (AA/mgTPC)
۵۹	۴-۴-۶- مدل فعالیت آنتی اکسیدانی به ازاء یک میلی گرم فلاونوئید (AA/mgTFC)
۶۰	۴-۴-۷- تجزیه سطوح پاسخ
۶۰	۴-۴-۷-۱- فنول کل
۶۳	۴-۴-۷-۲- فلاونوئید کل
۶۵	۴-۴-۷-۳- فعالیت آنتی اکسیدانی
	۴-۴-۷-۴- فعالیت آنتی اکسیدانی به ازاء یک میلی گرم فنول و فلاونوئید (AA/mgTPC و
۶۸	AA/mgTFC)
۷۰	۴-۴-۸- تعیین شرایط بهینه و آزمون اعتبار سنجی
۷۱	۴-۴-۵- اندازه گیری خواص آنتی اکسیدانی عصاره در شرایط بهینه

۷۱	۴-۵-۱- اندازه گیری خاصیت احیاء کنندگی آهن
۷۲	۴-۵-۲- اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی کل
۷۳	۴-۵-۳- اندازه گیری IC_{50}
۷۴	۴-۶- شناسایی ترکیبات فنولیک با کروماتوگرافی مایع - طیف سنج جرمی
۷۶	۴-۷- نتیجه گیری کلی
۷۷	۴-۸- پیشنهادات
۷۹	فصل پنجم: ضمائم
۸۲	منابع

فهرست جداول

جدول ۱-۲- کاربرد امواج فراصوت.....	۱۶
جدول ۱-۳- غلظت حلال در سیستم گرادیانت.....	۴۴
جدول ۱-۴- سطوح متغیرها.....	۵۳
جدول ۲-۴- شرایط استخراج از گیاه سنبله زیبا با طرح مرکب مرکزی و پاسخ آن‌ها.....	۵۴
جدول ۳-۴- نتایج تجزیه واریانس مدل درجه دوم پاسخ‌های مختلف.....	۵۶
جدول ۴-۴- ضرایب همبستگی مدل‌های درجه دوم پیش بینی شده برای پاسخ‌ها.....	۵۷
جدول ۵-۴- شرایط آزمون بهینه و نتایج آزمون اعتبارسنجی.....	۷۱
جدول ۷-۴- ترکیبات فنولیک شناسایی شده با کروماتوگرافی مایع- طیف سنج جرمی.....	۷۴

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۲- سنبله زیبا (چای کوهی)..... ۸
- شکل ۲-۲- هیدروکسی بنزویک اسید (A)، هیدروکسی فنیل استیک اسید (B) و هیدروکسی سینامیک اسید (C)..... ۱۲
- شکل ۳-۲- ساختار دی فنیل پروپان..... ۱۳
- شکل ۴-۲- تانن‌های کندانسه (A)، تانن‌های قابل هیدرولیز (B) و فلوروتانن‌ها (C)..... ۱۵
- شکل ۵-۲- اوربیتال مولکولی اکسیژن سه گانه..... ۲۰
- شکل ۶-۲- اوربیتال مولکولی اکسیژن یگانه..... ۲۲
- شکل ۷-۲- آنتی اکسیدان‌های سنتزی..... ۲۵
- شکل ۸-۲- ساختار ۲و۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل..... ۲۷
- شکل ۹-۲- احیاء آهن (III) به آهن (II)..... ۲۹
- شکل ۱-۳- دستگاه مولد امواج فراصوت (Topsonic ساخت ایران)..... ۳۹
- شکل ۱-۴- مقایسه استخراج ترکیبات فنولیک به کمک امواج فراصوت و آزمون شاهد..... ۴۹
- شکل ۲-۴- اثر نوع حلال بر روی فنول کل..... ۵۰
- شکل ۳-۴- اثر نسبت نمونه به حلال بر روی فنول کل..... ۵۱
- شکل ۴-۴- اثر زمان استخراج بر روی فنول کل..... ۵۲
- شکل ۵-۴- اثر قدرت امواج فراصوت بر روی فنول کل..... ۵۳
- شکل ۶-۴- منحنی تراز اثر متقابل قدرت امواج فراصوت با زمان (a) نسبت نمونه به حلال (b) و غلظت حلال (c) بر روی فنول کل..... ۶۰
- شکل ۷-۴- منحنی تراز اثر متقابل نسبت نمونه به حلال زمان (a) و غلظت حلال (b) بر روی فنول کل..... ۶۱

- شکل ۴-۸- منحنی تراز اثر متقابل زمان با غلظت حلال بر روی فنول کل..... ۶۲
- شکل ۴-۹- منحنی تراز اثر متقابل قدرت امواج فراصوت با زمان (a) نسبت نمونه به حلال (b) و غلظت حلال (c) بر روی فلاونوئید..... ۶۳
- شکل ۴-۱۰- منحنی تراز اثر متقابل نسبت نمونه به حلال با زمان (a) و غلظت حلال (b) بر روی فلاونوئید..... ۶۴
- شکل ۴-۱۱- منحنی تراز اثر متقابل غلظت حلال با زمان بر روی فلاونوئید..... ۶۴
- شکل ۴-۱۲- منحنی تراز اثر متقابل قدرت امواج با نسبت نمونه به حلال (a)، زمان (b) و غلظت حلال (c) بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی..... ۶۵
- شکل ۴-۱۳- منحنی تراز اثر متقابل نسبت نمونه به حلال با زمان (a) و غلظت حلال (b) بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی..... ۶۶
- شکل ۴-۱۴- منحنی تراز اثر متقابل غلظت حلال با زمان بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی..... ۶۷
- شکل ۴-۱۵- منحنی تراز اثر متقابل قدرت امواج فراصوت با زمان (a) و غلظت حلال (b)، بر روی AA/mgTPC و منحنی تراز اثر متقابل قدرت با زمان (c) بر روی AA/mgTFC..... ۶۸
- شکل ۴-۱۶- منحنی تراز اثر متقابل نسبت نمونه به حلال با زمان بر روی AA/mgTPC..... ۶۹
- شکل ۴-۱۷- منحنی تراز اثر متقابل زمان با غلظت حلال بر روی AA/mgTPC (a) و AA/mgTFC (b)..... ۷۰
- شکل ۴-۱۸- خاصیت احیاء کنندگی آهن..... ۶۴
- شکل ۴-۱۹- مقدار IC_{50} ۷۳

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

امروزه به دلیل افزایش اطلاعات مصرف کنندگان مواد غذایی در مورد تأثیرات مضر افزودنی‌های سنتزی مانند بوتیلید هیدروکسی آنیسول (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 فنولی اشاره کرد که مانع اکسیداسیون و فساد میکروبی مواد غذایی می‌شوند [Shah et al., 2014]. این ترکیبات همچنین دارای خواص ضد حساسیتی، ضد جهش، ضد اسهال و درمان کننده زخم هستند [Heydari Majd et al., 2014].

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 [Vermerris et al., 2006].

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 متفاوت، و حلال‌های مختلف استخراج شوند. پلی فنول‌ها غالباً در حلال‌های آلی با قطبیت کمتر از آب حل می‌شوند با این حال حلالیت ترکیبات فنولیک بستگی به قطبیت آنها دارد که قطبیت آنها از تنوع بسیار گسترده‌ای برخوردار است به گونه‌ای که شامل ترکیبات قطبی مانند کوئرستین-۳-

¹ Butylated hydroxyanisole

² Butylated hydroxytoluene

³ Propyl gallate

⁴ Tert-butylhydroquinone

سولفات^۵ و غیر قطبی مانند تانگرتین^۶ می‌شوند. حلال‌های مختلفی برای استخراج ترکیبات فنولیک مورد استفاده قرار می‌گیرند که برخی از آن‌ها عبارتند از: متانول، اتانول، استون، اتیل استات و غیره. همچنین ترکیب هر یک از این حلال‌ها به یک نسبت مشخص با آب نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. ترکیبی از متانول و آب به دلیل راندمان بالا در استخراج، نقطه‌ی جوش بالا و هزینه‌ی کمتر، برای استخراج ترکیبات فنولیک از میوه‌ها و سبزیجات نسبت به سایر حلال‌ها بیشتر مورد استفاده قرار گرفته است [kim et al., 1990].

امروزه استفاده از روشهای سنتی استخراج مانند روش غرقابی به دلیل مصرف زیاد حلال و همچنین زمان بر بودن کم شده است [Şahin et al., 2013] و از تکنولوژی‌های جدیدی استفاده می‌شود که در بین تکنولوژی‌های جدید مانند استخراج با مایکروویو^۷، استخراج با سیال فوق بحرانی^۸ و غیره [Pan et al., 2012] استفاده از امواج فراصوت به دلیل راندمان بالا، سازگاری با محیط زیست، کم خطر بودن، کاهش در هزینه‌ها و زمان و قابلیت کاربرد برای مواد غذایی مختلف، رواج بیشتری پیدا کرده است [Tao et al., 2014; Carrera et al., 2012].

تنوع و گسترده‌ی 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 [Şahin et al., 2013]. بسیاری از عوامل مثل دما، زمان و نسبت حلال را می‌توان برای استخراج ترکیبات فنولیک بهینه کرد. روش‌های مختلفی برای بهینه سازی وجود

⁵ Quercetin-3-sulfate

⁶ Tangeretin

⁷ Microwave-assisted extraction

⁸ Supercritical fluid extraction

دارد که یکی از این روش‌ها روش سطح پاسخ است که برای نخستین بار توسط باکس و ویلسون^۹ (۱۹۵۱) معرفی شد و مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضی است که در مورد فرآیندهایی کاربرد دارد که چند متغیری هستند یا مکانیسم‌های موثر در آن‌ها به خوبی مشخص نشده‌اند و اطلاعات موجود در مورد سیستم بسیار کم باشد، یا میان متغیرها بر هم کنش وجود داشته و پاسخ غیر خطی است. با وجود اینکه مزایای طرح فاکتوریل برای تخمین زدن تابع پاسخ، مدت‌های مدیدی است که شناخته شده ولی از معایب آن، بکارگیری شمار زیادی واحدهای آزمایشی است که برای متغیرهای زیاد، مورد نیاز می‌باشد و از نظر عملی غیر ممکن است. در صورتیکه در روش سطح پاسخ با تعداد کمی آزمایش به نتایج مطلوب می‌توان دست یافت [Mizubuti et al., 2000].

گیاهان منابع غنی از ترکیبات فنولیک هستند [Heim, & et al., 2002] و تحقیقات زیادی بر روی استخراج ترکیبات فنولیک از منابع گیاهی انجام شده است که می‌توان به استخراج این ترکیبات از گیاه افسنتین^{۱۰} مرزنجوش^{۱۱} برگ بو^{۱۲} اشاره کرد [Hossain, & et al 2012; Muñiz-Márquez et al., 2013; Sahin et al., 2013]. سنبله زیبا را نیز می‌توان به عنوان منبع بالقوه‌ای از ترکیبات فنولیک در نظر گرفت.

۱-۲- اهداف تحقیق

با توجه به اینکه تاکنون در زمینه بهینه سازی استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی سنبله زیبا و همچنین شناسایی ترکیبات فنولیک آن مطالعه ای صورت نگرفته است. در این تحقیق اهداف زیر مد نظر است:

^۹. Box & Wilson, 1951

^{۱۰} *Artemisia absinthium*

^{۱۱} *Origanum majorana* L

^{۱۲} *Laurus nobilis* L

۱- بررسی ۴ متغیر زمان، غلظت حلال، نسبت نمونه به حلال و قدرت امواج فراصوت بر روی راندمان استخراج ترکیبات فنولیک.

۲- بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک به کمک امواج فراصوت با روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی.

۳- مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولیک استخراج شده از گیاه سنبله زیبا با آنتی اکسیدان‌های سنتزی.

۴- تعیین ساختار ترکیبات فنولیک استخراج شده توسط کروماتوگرافی مایع به همراه آشکار ساز جرمی^{۱۳}

فصل دوم

کلیات و مروری بر منابع

۲-۱- گیاه شناسی سنبله زیبا (چای کوهی)



شکل ۲-۱- سنبله زیبا (چای کوهی)

سنبله زیبا (چای کوهی) با نام علمی *Stachys Lavandulifolia* Vahl گیاهی است پایا، کوتاه، کرک دار، با ساقه‌های متعدد و با رنگ سبز مایل به خاکستری که بزرگترین گونه از جنس سنبله (*Stachys*.L) است و به صورت خودرو در ایران می‌روید. این گیاه دارای خواص دارویی زیادی است. ۳۴ گونه از این جنس در ایران وجود دارد که ۱۳ گونه‌ی آن بومی ایران هستند [Khadivi-Khub et al., 2014]. از خواص دارویی سنبله زیبا می‌توان به درمان اسهال^{۱۴}، خواص ضد التهابی^{۱۵} و درمان زخم‌ها^{۱۶} اشاره کرد. سنبله زیبا همچنین دارای خواص ضد میکروبی^{۱۷} و آنتی اکسیدانی^{۱۸} است که دانشمندان خواص آنتی اکسیدانی این گیاه را مرتبط با ترکیبات فنولیک آن می‌دانند [Tundis et al., 2014].

¹⁴ Anti-diarrhoeal

¹⁵ Anti-inflammatory

¹⁶ Wound-healing

¹⁷ Antimicrobial activity

¹⁸ Antioxidant activity

۲-۱-۱-ساقه

ساقه این گیاه کرک پوش، خزی، ایستاده یا خیزان، به ارتفاع ۲۵-۶ سانتی متر، منشعب با شاخه‌های ساده، برخی بارور و گلداری، منتهی به گل آذین، عده‌ای کوتاه و عقیم با برگ‌های دسته‌ای هستند [قهرمان ۱۳۶۷].

۲-۱-۲-برگ

برگ این گیاه به صورت پهن، دراز و کشیده، سرنیزه‌ای، در انتها مدور، در پایین باریک شده و منتهی به دم‌برگ، نسبتاً بلند، دارای رگه‌های برجسته موازی، در بخش گلداری بدون دم‌گل، تخم مرغی و بیضی شکل، برگشته و کمی بلندتر از کاسه گل هستند [قهرمان ۱۳۶۷].

۲-۱-۳-گل

گل‌های سنبله زیبا به صورت مجتمع و به شکل چرخه‌های دارای ۴-۶ گل با رنگ صورتی تا ارغوانی، به ندرت سفید یا متمایل به زرد، فاصله‌دار به صورت گل آذینی از چرخه‌های نزدیک به هم به صورت خوشه‌ای، براکته‌های باریک، نخی و قابل دید، کاسه به طول ۱۴-۱۸ میلی متر، با تقسیمات پرده‌دار (پوشیده از کرک‌های بلند)، در پایین سرنیزه‌ای و باریک اما در بالا باریک درفشی و گسترده هستند [قهرمان ۱۳۶۷].

۲-۱-۴-فصل رویش گیاه و مناطق جغرافیایی رویش

این گیاه در ماه‌های فروردین تا خرداد می‌روید و تقریباً در تمام ایران وجود دارد که می‌توان به مناطقی مانند: اصفهان، اراک، کتول گرگان، تبریز، ارومیه، سنندج، همدان، اشترانکوه، باختران، داران، دامنه، بازوفت، الیگودرز، سفید کوه، دینار و کوه سی سخت در فارس، کوه سفید و غیره اشاره کرد [قهرمان ۱۳۶۷].

۲-۲- ترکیبات شیمیایی سنبله زیبا

گیاهان متعلق به خانواده نعنائیان (Lamiaceae) به خاطر اسانس‌های روغنی و بسیاری از ترکیبات زیست فعال روغنی موجود در آن‌ها به خوبی شناخته شده‌اند و به عنوان طعم دهنده‌های مواد غذایی، سبزیجات و گیاهان دارویی در سراسر جهان کاربرد دارند. گروه گسترده‌ای از ترکیبات، مانند ترپنوئیدها، فنولیک‌ها و فلاونوئیدها در این خانواده وجود دارند. مطابق نتایج آقایی و همکاران (۲۰۱۳) ۴۹ ترکیب در اسانس روغنی سنبله زیبا شناسایی شد که مهمترین این ترکیبات عبارتند از: مایرسن^{۱۹} (۰-۲۶/۳٪)، لیمونن^{۲۰} (۰-۲۴/۵٪)، گرماسرن^{۲۱} D (۴/۲-۱۹/۳٪)، بیسایکلو گرماسرن^{۲۲} (۱/۶-۱۸٪)، کادینن^{۲۳} (۰-۱۶٪)، پولگون^{۲۴} (۰-۱۵/۱٪)، کاریوفیلن^{۲۵} (۰-۱۲/۹٪)، آلفا زینجیبرن^{۲۶} (۰/۲-۱۲/۲٪) و اسپاتولنول^{۲۷} (۱/۶-۱۱/۱٪). در بین اسانس‌های روغنی اصلی مایرسن و لیمونن جزء ترکیبات معطر هستند که به طور گسترده در صنعت عطرسازی کاربرد دارند. گرماسرن D یک بخش مهم از اسانس‌های روغنی است چون این ترکیب دارای خواص ضد میکروبی است و همچنین یک حشره کش نیز محسوب می‌شود [Aghaei et al., 2013].

مطابق یافته‌های دل آزار و همکاران در سنبله زیبا ۴ ترکیب فنیل اتانوئیدی^{۲۸} تشخیص داده شد که عبارتند از: ۴،۳،۴ تری متوکسی-لاواندولی فولیوزید^{۲۹}، ورباسکوزید^{۳۰}، و لئوکوسپتوزید^{۳۱} و ۵-O-بتا-آلپیرانوزیل اکسی آیوکوبین^{۳۲} [Delazar et al., 2013].

¹⁹ Myrcene

²⁰ Limonene

²¹ Germacrene D

²² Bicyclogermacrene

²³ σ -cadinene

²⁴ Pulegone

²⁵ Caryophyllene

²⁶ α -zingiberene

²⁷ Spathulenol

²⁸ Phenylethanoid

²⁹ 4,3,4-trimethoxy-lavandulifolioside

³⁰ Verbascoside

۲-۳- ترکیبات فنولیک

ترکیبات فنولیک در گروه متابولیت‌های ثانویه گیاهان قرار می‌گیرند و به روش‌های مختلفی می‌توانند طبقه بندی شوند. سواين^{۳۳} و اسمیت^{۳۴} در سال ۱۹۶۲ ترکیبات فنولیک را به دو گروه متداول و غیر متداول تقسیم کردند. سپس در سال ۱۹۶۴ هربورن^{۳۵} و سیموند^{۳۶} این ترکیبات را بر اساس تعداد کربن موجود در ساختار آن‌ها تقسیم بندی کردند. در سال ۱۹۷۲ ریبروگایون^{۳۷} ترکیبات فنولیک را به سه گروه دسته بندی کرد که عبارتند از: ۱- فنول‌های با گسترده‌گی فراوان که در تمام گیاهان وجود دارند یا ترکیبی شاخص در یک گونه گیاهی هستند. ۲- فنول‌هایی که گسترده‌گی کمتری نسبت به گروه اول دارند و تعداد فنول‌های شناخته شده در این گروه، محدودتر است. ۳- ترکیبات فنولیکی که در گیاهان به عنوان پلیمر وجود دارند [Vermerris et al., 2006]. در برخی از منابع دیگر ترکیبات فنولیک به سه گروه مهم تقسیم بندی می‌شوند که عبارتند از: ۱- اسید فنولیک^{۳۸} ۲- فلاونوئیدها^{۳۹} ۳- تانن‌ها^{۴۰} [kim et al 1990].

۲-۳-۱- اسیدها فنولیک

اسیدها فنولیک به سه گروه مهم تقسیم می‌شوند که شامل: اسید هیدروکسی بنزوئیک^{۴۱} (C₁-C₆)، اسید هیدروکسی فنیل استیک^{۴۲} (C₂-C₆) و اسید هیدروکسی سینامیک^{۴۳} (C₃-C₆) هستند (شکل ۲-۲). اسیدهای هیدروکسی سینامیک به طور گسترده در بافت‌های گیاهی وجود دارند که از مهم‌ترین اسیدها

³¹ Leucosceptoside

³² 5-O-β-allopyranosyloxy-aucubin

³³ Swain

³⁴ Bate-Smith

³⁵ Harborne

³⁶ Simmonds

³⁷ Ribéreau-Gayon

³⁸ Phenolic acids

³⁹ Flavonoids

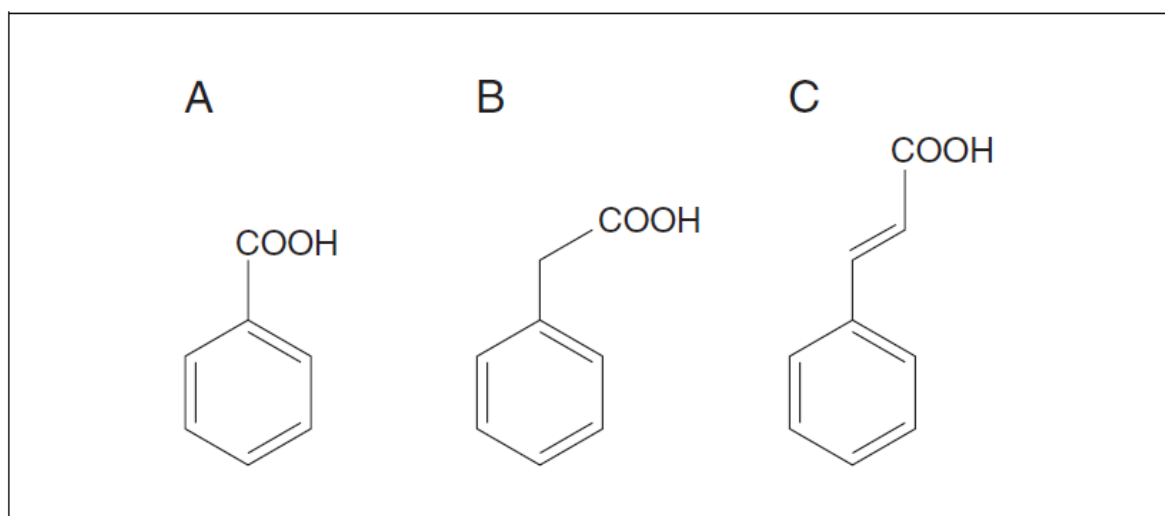
⁴⁰ Tannins

⁴¹ Hydroxybenzoic

⁴² Hydroxyphenylacetic

⁴³ Hydroxycinnamic

هیدروکسی سینامیک می‌توان به اسیدهای کوماریک^{۴۴}، کافئیک^{۴۵}، فرولیک^{۴۶} و سیناپیک^{۴۷} اشاره کرد. اسیدهای هیدروکسی سینامیک به ندرت به صورت آزاد یافت می‌شوند و بیشتر به شکل استرهای اسید کوئینیک^{۴۸} و در برخی موارد به صورت استر گلوکزی وجود دارند. اسید کلروجنیک^{۴۹} که در اغلب میوه‌ها و سبزی‌ها یافت می‌شود، از اسید کوئینیک و اسید کافئیک ساخته شده است [kim et al., 1990].



شکل ۲-۲-۲- اسید هیدروکسی بنزویک (A)، اسید هیدروکسی فنیل استیک (B) و اسید هیدروکسی سینامیک (C)

۲-۳-۲- فلاونوئیدها

فلاونوئیدها دارای ساختار دی فنیل پروپان^{۵۰} (C₆-C₃-C₆) هستند (شکل ۲-۳). این ترکیبات از دو حلقه آروماتیک که با سه کربن به هم متصل شده‌اند ساخته شده است. این سه کربن معمولاً به شکل حلقه هیتروسیکلیک اکسیژنه شده^{۵۱} هستند. حالت اکسیداتیو این زنجیره سه کربنی باعث ایجاد گروه‌های

⁴⁴ *p*-coumaric

⁴⁵ Caffeic

⁴⁶ Ferulic

⁴⁷ Sinapic

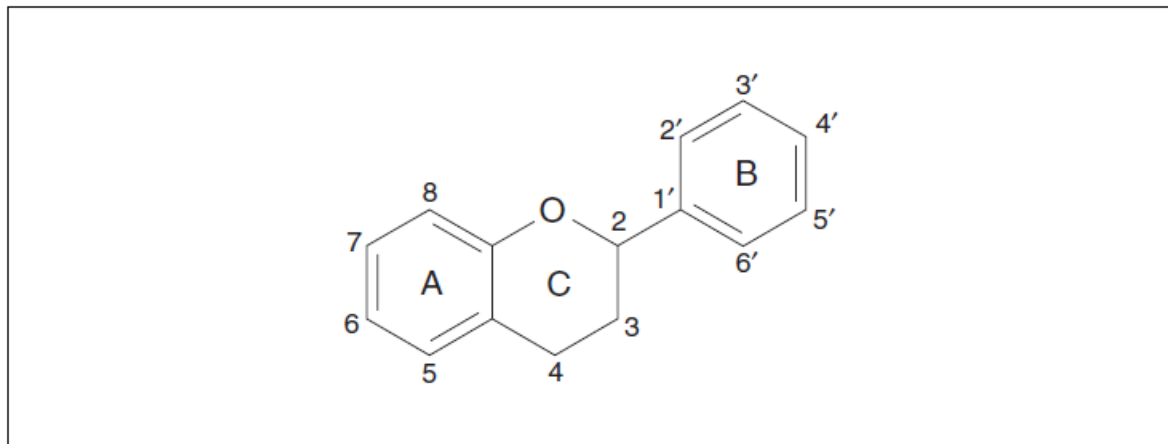
⁴⁸ Quinic acid

⁴⁹ Chlorogenic acid

⁵⁰ Diphenylpropane

⁵¹ Oxygenated heterocyclic ring

مختلف فلاونوئیدها می‌شود. فلاونوئیدها شامل ترکیباتی مانند: آنتوسیانین‌ها، فلاوانول‌ها^{۵۲} (کاتچین‌ها)، فلاونول‌ها^{۵۳}، فلاون‌ها^{۵۴}، ایزوفلاون‌ها^{۵۵}، فلاوانون‌ها^{۵۶} و مشتقات آن‌ها می‌شوند. آنتوسیانین‌ها رنگ دانه‌های محلول در آب هستند که باعث ایجاد رنگ قرمز، بنفش و آبی در میوه‌ها و گل‌ها می‌شوند. آنتوزانتین‌ها^{۵۷} به ترکیبات فلاوانونی، فلاونولی و ایزوفلاونونی می‌گویند که بی‌رنگ یا سفید مایل به زرد هستند. ایزوفلانن‌ها ایزومر ساختاری فلاونوئیدها هستند که بیشتر در سویا و محصولات بر پایه سویا وجود دارند. بیشتر فلاونوئیدها به جز فلاوان ۳-ال‌ها^{۵۸} ترکیبات گلیکوزیدی هستند. ترکیبات فلاونوئیدی به همراه مشتقاتشان با بیش از ۴۰۰۰ ترکیب شناخته شده، بزرگ‌ترین گروه ترکیبات فنولیک می‌باشند [kim et al., 1990].



شکل ۲-۳- ساختار دی فنیل پروپان

-
- ⁵² Flavanols
 - ⁵³ Flavonols
 - ⁵⁴ Flavones
 - ⁵⁵ Isoflavones
 - ⁵⁶ Flavanones
 - ⁵⁷ Anthoxanthins
 - ⁵⁸ Flavan-3-ols

۲-۳-۳- تانن‌ها

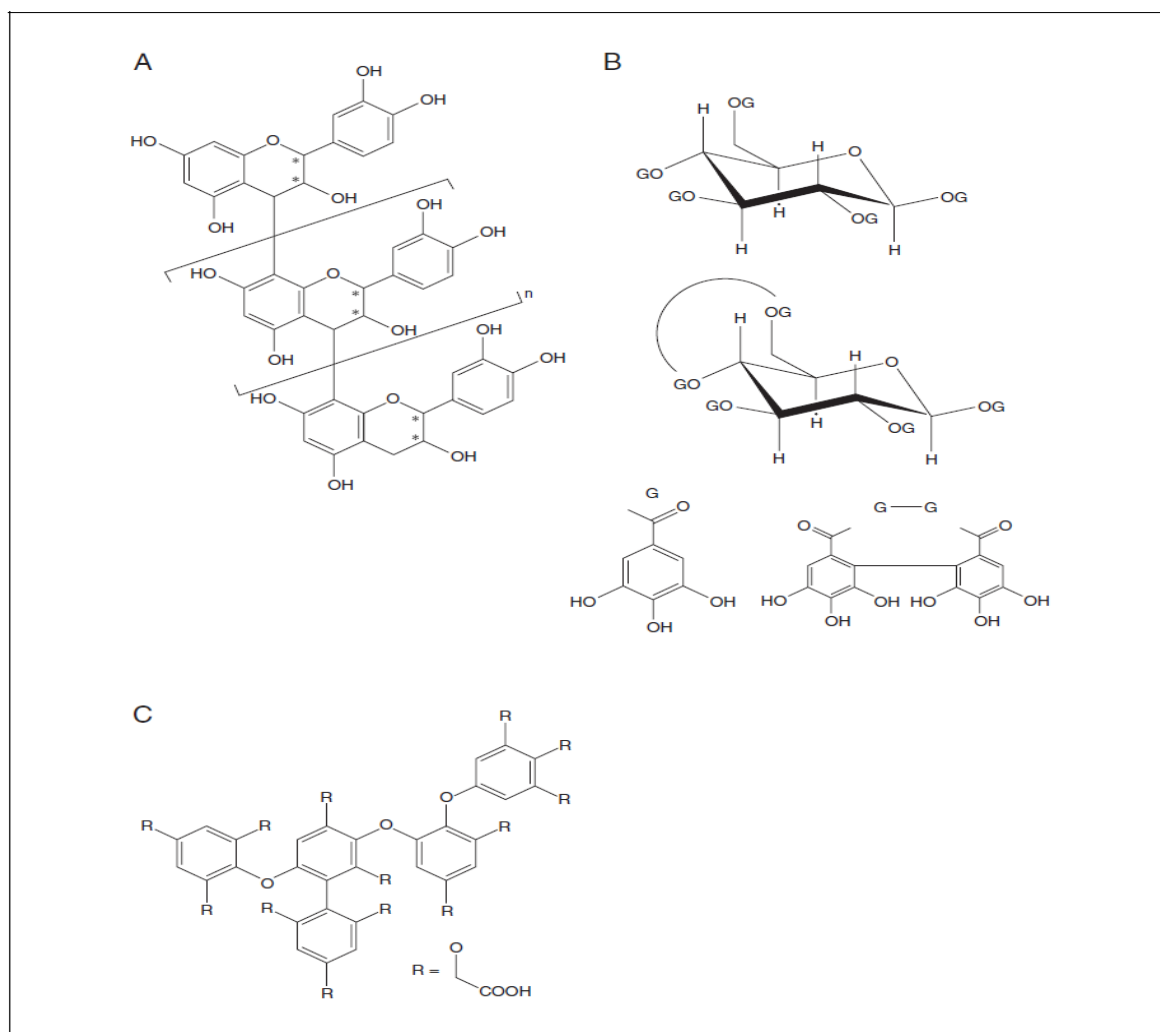
ترکیباتی با وزن مولکولی بالا هستند که با پروتئین‌ها واکنش می‌دهند. تانن‌ها با پروتئین‌ها کمپلکس نامحلول ایجاد می‌کنند که باعث ایجاد طعم غابض در دهان می‌شوند. این ترکیبات به سه گروه تقسیم می‌شوند که عبارتند از: تانن‌های کندانس^{۵۹}، تانن‌های قابل هیدرولیز^{۶۰} و فلوروتانن‌ها^{۶۱} شکل (۲-۴). تانن‌های کندانس شده الیگومر یا پلیمری از دو و یا تعداد بیشتری کاتچین یا اپی کاتچین هستند. تانن‌های قابل هیدرولیز پلیمری از اسید گالیک یا اسید الاغیک هستند که به راحتی توسط آنزیم، اسید و باز قابل هیدرولیز شدن هستند. فلوروتانن‌ها از واحدهای فلوروگلوکوسینول‌ها^{۶۲} ساخته شده‌اند [kim et al 1990].

⁵⁹ Condensed tannins

⁶⁰ Hydrolyzable tannins

⁶¹ Phlorotannins

⁶² Phloroglucinol



شکل ۲-۴ تانن‌های کندانسه (A)، تانن‌های قابل هیدرولیز (B) و فلوروتانن‌ها (C)

۲-۴-امواج فراصوت

۲-۴-۱-مکانیسم اثر امواج فراصوت

فراصوت به امواج صوتی گفته می‌شود که فرکانس آن‌ها بالاتر از محدوده شنوایی انسان است (بیشتر از ۲۰ KHz). با عبور امواج فراصوت از محیط مایع، فشار نوسانی در آن ایجاد خواهد شد که باعث انبساط و انقباض‌های متوالی در محیط می‌شود که اگر در محیط مایع، هسته‌های گازی وجود داشته باشد این هسته‌ها در اثر انقباض و انبساط متوالی مولکول‌های محیط، به ترتیب فشرده و از هم باز می‌شوند که در

هنگام فشردگی حباب‌ها، مولکول‌های محیط از طریق پدیده انتشار وارد حباب‌ها می‌شوند و سپس در طی انقباض از حباب‌ها خارج می‌شوند اما مقدار ورود مولکول‌ها در طی انبساط بیشتر از خروج آن‌ها در طی فشردگی است و در نتیجه در سیکل‌های متوالی حباب‌ها رفته رفته بزرگتر می‌شوند و در نهایت می‌ترکند. که به این پدیده حفره‌زایی امواج فراصوت یا کاویتاسیون صوتی^{۶۳} می‌گویند. حفره زایی امواج فراصوت باعث: ۱- ایجاد گرمای شدید ۲- ایجاد تنش برشی بالا ۳- ایجاد توربولانس ۴- برخورد شدید ذرات به هم و ایجاد آشفستگی در منافذ ریز ذرات ۵- فرسایش و شکسته شدن ذرات می‌شود. لازم به ذکر است که تفاوت در میزان استخراج ترکیبات فنولیک از گیاهان مختلف را می‌توان مربوط به تفاوت در ساختار، خصوصیات رئولوژی (سختی ذرات) و تفاوت در حساسیت به شوک‌های حاصل از حباب‌ها دانست [Chandrapala et al., 2012].

۲-۴-۲- کاربرد امواج فراصوت

امواج فراصوت بر اساس فرکانس به دو دسته تقسیم می‌شوند که عبارتند از: ۱- امواج فراصوت با انرژی یا قدرت کم که فرکانس این امواج بیشتر از ۱۰۰ KHz و شدت آن‌ها کمتر از 1 W.cm^{-2} است که برای آنالیزهای غیر تخریبی به کار می‌روند. ۲- امواج فراصوت با انرژی یا قدرت زیاد که فرکانس آن‌ها بین ۱۰۰-۲۰ KHz می‌باشد و شدت آن‌ها بیشتر از 1 W.cm^{-2} است. این دسته از امواج باعث تغییرات فیزیکی، مکانیکی یا بیوشیمیایی در مواد غذایی می‌شوند. تعدادی از کاربردهای امواج فراصوت در جدول (۱-۲) آورده شده است [Awad et al., 2012].

جدول ۱-۲- کاربرد امواج فراصوت

کاربرد	روش‌های سنتی	مبنای فراصوت	مزایا	محصولات غذایی

⁶³ Acoustic cavitation

پختن	حمام آب، سرخ	انتقال حرارت	زمان کمتر، بهبود در	گوشت، سبزیجات
	کن، فر	یکنواخت	انتقال حرارت و کیفیت	
			مواد غذایی	
انجماد/	فریزر	انتقال حرارت	زمان کمتر، کریستال	گوشت، سبزیجات،
کریستالیزاسیون		یکنواخت	های کوچکتر، بهبود در	میوه‌ها، فراورده‌های
			پدیده انتشار	لبنی
گاز زدایی	تیمارهای مکانیکی	انقباض و	زمان کمتر، افزایش	شکلات، محصولات
	انبساط متوالی		بهداشت	تخمیری
فیلتراسیون	فیلترها	ایجاد لرزش	زمان کمتر، بهبود	آب میوه‌ها
			فیلتراسیون	
کف زدایی	تیمار شیمیایی،	پدیده حفره	زمان کمتر، افزایش	محصولات تخمیری
	دمایی، الکتریکی و	زایی	بهداشت	
	مکانیکی			
برش	چاقو	پدیده حفره	زمان کمتر، کاهش	محصولات حساس
		زایی	ضایعات مواد غذایی،	(کیک، پنیر)
			برش دقیق	

[Chemat et al., 2011]

۲-۴-۳-انواع دستگاه مولد امواج فراصوت

دو نوع از دستگاه‌های مولد امواج فراصوت در آزمایشگاه به منظور استخراج ترکیبات زیست فعال

استفاده می‌شود که عبارتند از:

۲-۴-۳-۱- حمام فراصوت^{۶۴}

این نوع دستگاه دارای یک مخزن آب است که نمونه در یک ظرف در داخل آب قرار می‌گیرد و امواج از داخل آب به نمونه‌ی مورد نظر می‌رسد اما شدت امواج فراصوتی که به نمونه خواهد رسید به دلیل محیط‌های واسطه‌ای مانند آب و جداری ظرف (که نمونه داخل آن قرار گرفته است) کاهش می‌یابد. حمام فراصوت بیشتر برای گاز زدایی از محلول‌ها و پاک کردن مواد از سطوح شیشه‌ای کاربرد دارد [Chemat et al., 2011].

۲-۴-۳-۲- پروب فراصوت^{۶۵}

در این نوع، امواج فراصوت از یک پروب که غالباً از جنس تیتانیوم است منتشر می‌شوند. پروب به طور مستقیم و بدون هیچ محیط واسطه‌ای در داخل نمونه قرار می‌گیرد. پروب فراصوت به دلایل زیر قدرت بیشتری نسبت به حمام فراصوت دارد. ۱- امواج را در سطح کمتری منتشر می‌کند (نوک پروب) ۲- پروب به طور مستقیم در تماس با نمونه، در داخل ظرف قرار می‌گیرد. لازم به ذکر است که موقع استفاده از پروب، باید مراقب افزایش دمای نمونه بود [Cheok et al., 2013].

۲-۵- اکسیداسیون

اکسیداسیون چربی‌ها یکی از مهم‌ترین عوامل فساد مواد غذایی است. واکنش اکسیداسیون باعث کاهش کیفیت مواد غذایی و حتی ایجاد ترکیبات سمی در مواد غذایی می‌شود. اکسیداسیون از نظر اقتصادی یک مشکل بزرگ محسوب می‌شود چون این فرایند باعث ایجاد طعم و بوی نامطبوع در روغن و غذاهای حاوی چربی می‌شود (فرایند تند شدن^{۶۶}) که از بازار پسندی محصولات غذایی می‌کاهد اما گاهی

⁶⁴ Ultrasonic bath

⁶⁵ Ultrasonic prob

⁶⁶ Rancidity

اکسیداسیون چربی‌ها در مقادیر کم در برخی از محصولات مانند پنیر مطلوب است [Fennema 1996].
اکسیداسیون می‌تواند به سه صورت در مواد غذایی اتفاق بیفتد که عبارتند از:

۱- اتواکسیداسیون

۲- فوتواکسیداسیون

۳- اکسیداسیون آنزیمی

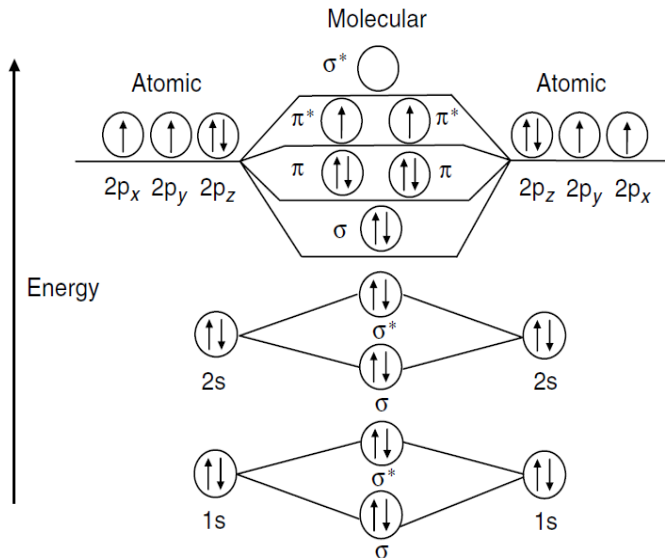
اکسیداسیون را از جنبه‌ای دیگر نیز می‌توان بررسی کرد که در منابع مختلف کمتر به آن پرداخته شده است. از این دیدگاه اکسیداسیون را می‌توان به دو گروه تقسیم کرد. که عبارتند از ۱- اکسیداسیون توسط اکسیژن غیر رادیکالی یگانه^{۶۷} ۲- اکسیداسیون توسط اکسیژن دی رادیکالی سه گانه^{۶۸} [Akon et al., 2008]

۲-۵-۱- اکسیداسیون با اکسیژن دی رادیکالی سه گانه

اکسیداسیون توسط اکسیژن سه گانه در ۷۰ سال اخیر به منظور پایداری بهتر مواد غذایی در برابر اکسیداسیون به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. اکسیژن سه گانه همان اکسیژن هوا است که ما تنفس می‌کنیم. همانطور که در اوربیتال مولکولی اکسیژن سه گانه (شکل ۲-۵) مشاهده می‌شود این مولکول یک دی رادیکال است یا به عبارت دیگر در لایه ظرفیت خود دو الکترون آزاد دارد و در حضور میدان مغناطیسی سه سطح انرژی را از خود نشان می‌دهد [Akon et al., 2008].

⁶⁷ Singlet oxygen

⁶⁸ Triplet oxygen

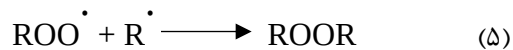
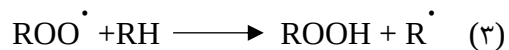


شکل ۲-۵- اوربیتال مولکولی اکسیژن سه گانه

۲-۵-۱-۱- مکانیسم اکسیداسیون اکسیژن سه گانه

اکسیژن سه گانه یک مولکول دی رادیکال است که فقط با ترکیبات رادیکالی وارد واکنش می‌شود. اکسیداسیون این اکسیژن دارای مراحل است که عبارتند از: مرحله شروع^{۶۹}، گسترش^{۷۰} و پایان^{۷۱}. مرحله شروع: در این مرحله الکیل رادیکال به وجود می‌آید (واکنش ۱). عواملی که باعث افزایش تشکیل ترکیبات الکیلی می‌شوند عبارتند از: دما، نور و وجود فلزات. لازم به ذکر است که برای تولید الکیل، هیدروژنی جدا می‌شود که کمترین انرژی فعال سازی را برای جدا شدن داشته باشد سپس الکیل تولید شده با اکسیژن سه گانه واکنش می‌دهد و رادیکال پروکسیل تولید می‌کند (واکنش ۲) که این رادیکال می‌تواند هیدروژن را از یک اسید چرب بگیرد و پروکسید و یک رادیکال آزاد تولید کند (واکنش ۳) که این آغاز مرحله تداوم یا گسترش است. واکنش‌های ۴، ۵ و ۶ در مرحله تداوم انجام می‌شوند [Akon et al., 2008].

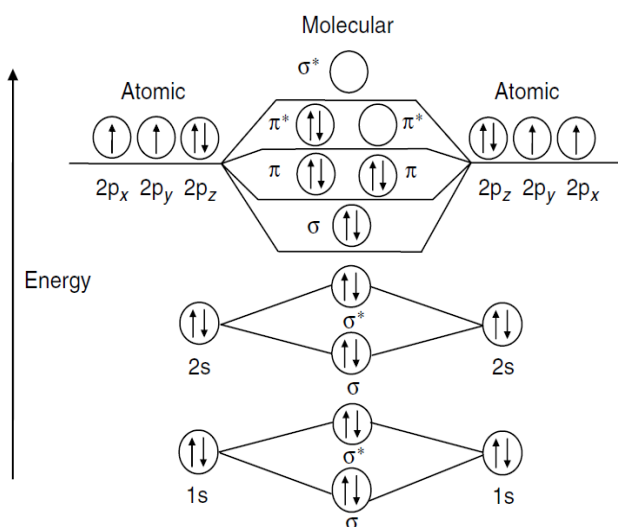
⁶⁹ Initiation
⁷⁰ Propagation
⁷¹ Termination



پراکسیدهای تولید شده در مرحله تداوم، که محصولات اولیه اکسیداسیون نیز نامیده می‌شوند ناپایدار هستند و در مرحله‌ی پایان تجزیه می‌شوند و به ترکیبات غیر فعال فرار و غیر فرار تبدیل خواهند شد که از این ترکیبات می‌توان به آلدهیدها، کتون‌ها، الکل‌ها و غیره اشاره کرد [Fennema 1996].

۲-۵-۲- مکانیسم اکسیداسیون با اکسیژن غیر رادیکالی یگانه

همانطور که در شکل (۲-۶) مشاهده می‌شود اکسیژن یگانه، رادیکالی نیست و اگر در یک میدان مغناطیسی قرار بگیرد فقط یک حالت انرژی را از خود نشان می‌دهد و به همین دلیل به این نوع از اکسیژن، اکسیژن یگانه می‌گویند [Akon et al., 2008].



شکل ۲-۶- اوربیتال مولکولی اکسیژن یگانه

اکسیژن یگانه بسیار ناپایدار است و انرژی زیادی دارد و در نتیجه انرژی فعال سازی واکنش اکسیداسیون را به تنهایی تأمین می‌کند و به همین دلیل انرژی فعال سازی واکنش اکسیداسیون کم خواهد شد و برای انجام واکنش نیاز به رادیکالی بودن ترکیباتی چون اسیدهای چرب ندارد. اکسیژن یگانه توسط واکنش‌های آنزیمی، شیمیایی و فوتوشیمیایی تولید می‌شود. در تولید شیمیایی اکسیژن یگانه، وجود نور، اکسیژن سه گانه و ترکیب حساس به نور مانند کلروفیل^{۷۲}، فتوفیتین^{۷۳}، پورفیرین^{۷۴}، ریبوفلاوین^{۷۵} و غیره الزامی است. به طور خلاصه مکانیسم تولید اکسیژن یگانه را می‌توان این گونه توضیح داد که ترکیبات حساس به نور انرژی نور را می‌گیرند و برانگیخته می‌شوند و اگر در محیط، اکسیژن سه گانه وجود داشته باشد این انرژی را به اکسیژن می‌دهند و اکسیژن به حالت یگانه تبدیل می‌شود و اکسیژن یگانه به اسیدهای چرب حمله می‌کند و هیدروپراکسید تولید می‌کند. لازم به ذکر است که ترکیبات حساس به نور، به طور مستقیم نیز می‌توانند با اسیدهای چرب وارد واکنش شوند و رادیکال آزاد تولید کنند. آنتی اکسیدان‌ها در کاهش سرعت اکسیداسیون که توسط اکسیژن یگانه اتفاق می‌افتد هیچ

⁷² Chlorophyll

⁷³ Pheophytins

⁷⁴ Porphyrins

⁷⁵ Riboflavin

تأثیری ندارند چون آنتی اکسیدان‌ها روی رادیکال‌های آزاد موثر هستند و این در حالی است که در اکسیداسیون توسط اکسیژن یگانه رادیکال آزادی ایجاد نمی‌شود [Akon et al., 2008].

۲-۶- آنتی اکسیدان^{۷۶}

آنتی اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که شروع اکسیداسیون را به تأخیر می‌اندازند و سرعت آن را کاهش می‌دهند. این ترکیبات می‌توانند به صورت طبیعی در مواد غذایی وجود داشته باشند یا به صورت دستی به مواد غذایی اضافه شوند و یا در طول فرایند ایجاد شوند. آنتی اکسیدان‌ها کیفیت مواد غذایی را بهبود نمی‌بخشند اما باعث افزایش ماندگاری مواد غذایی و حفظ کیفیت آن‌ها می‌شوند و علاوه بر این باعث کاهش در هدر رفت مواد مغذی می‌گردند. اثر آنتی اکسیدان‌ها بستگی به متغیرهای زیادی از جمله: ساختار، انرژی فعال سازی، قدرت اکسیداسیون و احیاکنندگی و قدرت حل شوندگی آن‌ها دارد [Akon et al., 2008].

۲-۶-۱- ویژگی‌های لازم برای آنتی اکسیدان‌های مورد استفاده در مواد غذایی

آنتی اکسیدان‌هایی که در مواد غذایی استفاده می‌شوند باید دارای ویژگی‌های زیر باشند:

۱- قیمت ارزان

۲- غیر سمی

۳- موثر در غلظت‌های کم

۴- پایدار

۵- در فرایندهای مواد غذایی فعالیت خود را حفظ کنند [Akon et al., 2008].

⁷⁶Antioxidant

۲-۶-۲- طبقه بندی آنتی اکسیدان‌ها

آنتی اکسیدان‌ها را می‌توان بر اساس مکانیسم اثر آن‌ها طبقه بندی کرد. بر این اساس آنتی اکسیدان‌ها به آنتی اکسیدان‌های اولیه^{۷۷} و ثانویه^{۷۸} تقسیم بندی می‌شوند.

۲-۶-۲-۱- آنتی اکسیدان‌های اولیه

آنتی اکسیدان‌های اولیه اتم هیدروژن خود را به رادیکال‌های آزاد می‌دهند و در نتیجه ترکیبات غیر رادیکالی و آنتی اکسیدان رادیکالی، تولید می‌شود که این رادیکال تولید شده به دلیل چرخش الکترون آزاد در حلقه‌ی فنولی آنتی اکسیدان، پایدار می‌باشد و در نتیجه پیشرفت اکسیداسیون به تأخیر می‌افتد. آنتی اکسیدان‌های اولیه میل ترکیبی بالایی در واکنش دادن با رادیکال‌های آزاد اکسی و پرواکسی دارند و آن‌ها همچنین به طور مستقیم می‌توانند با چربی‌های رادیکالی وارد واکنش شوند و آن‌ها را پایدار کنند. باید به این نکته توجه شود که آنتی اکسیدان‌های اولیه با توجه به مکانیسم عملشان باید در مراحل اولیه اکسیداسیون و در دوره‌ی القایی^{۷۹} که رادیکال‌های آزاد در حال شکل گیری هستند اضافه شوند تا از پیشرفت اکسیداسیون جلوگیری کنند [Akon et al., 2008].

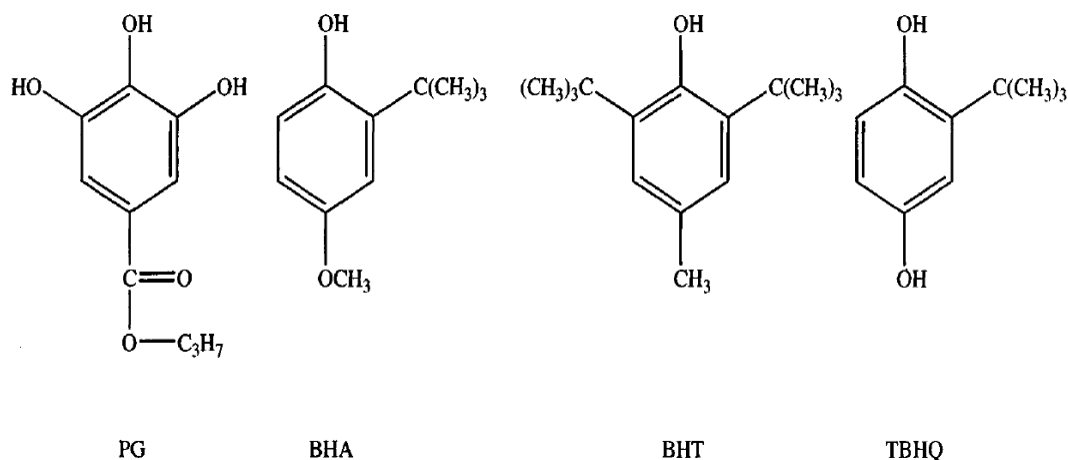
متداول‌ترین آنتی اکسیدان‌های اولیه مورد استفاده آنتی اکسیدان‌های سنتزی هستند که از این جمله می‌توان به بوتیلید هیدروکسی آنیسول (BHA)، بوتیلید هیدروکسی تولوئن (BHT)، پروپیل گالات (PG) و ترشیاری بوتیل هیدروکینون (TBHQ) اشاره کرد که ساختار آن‌ها در شکل (۲-۷) آورده شده است. برخی از ترکیبات طبیعی نیز می‌توانند نقش آنتی اکسیدان‌های اولیه را ایفا کنند که از این دسته نیز

⁷⁷ Primary Antioxidants

⁷⁸ Secondary Antioxidants

⁷⁹ Induction period

می‌توان توکوفرول‌ها^{۸۰}، کاروتنوئیدها^{۸۱}، ترکیبات فنولیک موجود در گیاهان و غیره اشاره کرد [Akon et al., 2008].



شکل ۷-۲- آنتی اکسیدان‌های سنتزی [Deman ., 1999]

۲-۲-۶-۲- آنتی اکسیدان‌های ثانویه

آنتی اکسیدان‌های ثانویه می‌توانند توسط مکانیسم‌های متفاوتی سرعت اکسیداسیون را کاهش دهند اما نمی‌توانند مانند آنتی اکسیدان‌های اولیه رادیکال‌های آزاد را با دادن هیدروژن به طور مستقیم غیر فعال کنند. همانطور که در بالا ذکر شد آنتی اکسیدان‌های ثانویه مکانیسم‌های مختلفی برای کاهش سرعت اکسیداسیون دارند که برخی از این مکانیسم‌ها عبارتند از: کلاته کنندگی فلزات^{۸۲}، تجزیه هیدروپراکسیدها به ترکیبات غیر فعال، غیرفعال سازی اکسیژن یگانه، جذب نور فرابنفش، شارژ دوباره آنتی اکسیدان‌های اولیه (با دادن هیدروژن به آن‌ها) و به دام انداختن اکسیژن. به فعالیت‌های این چینی آنتی اکسیدان‌ها خاصیت سینرجیستی^{۸۳} یا تشدید کنندگی می‌گویند چون باعث افزایش فعالیت و اثر بخشی آنتی اکسیدان‌های اولیه می‌شوند. اسید سیتریک، اسید اسکوربیک، آسکوربیل پالمیتات، لسیتین و

⁸⁰ Tocopherols

⁸¹ Carotenoids

⁸² Metal chelating

⁸³ Synergist

هیدروژن نقش خود را ایفا می‌کنند. اسید ال آسکوربیک قدرت احیاکننده‌گی بالایی دارد [Akon et al., 2008].

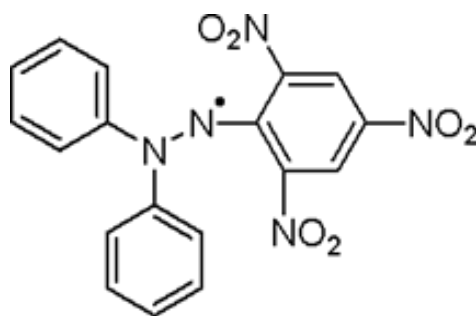
۲-۶-۲-۳- عوامل فرونشاندن اکسیژن یگانه^{۹۱}

اکسیژن یگانه مولکولی پر انرژی و ناپایدار است که با اسیدهای چرب واکنش داده و باعث تولید هیدروپراکسید می‌شود. ترکیباتی مانند کاروتنوئیدها که خود شامل بتا کاروتن، لیکوپن و لوتئین می‌شوند انرژی بالای اکسیژن یگانه را می‌گیرند و انرژی آن را به صورت گرما آزاد می‌کنند [Akon et al., 2008].

۲-۷- روش‌های اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی

۲-۷-۱- روش حذف رادیکال آزاد ۲و۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)^{۹۲}

روش حذف رادیکال مهمترین روش تعیین ساز و کار آنتی‌اکسیدان‌ها در مواد غذایی است. چندین روش برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌وسیله حذف رادیکال‌های سنتزی در حلال‌های آلی قطبی مانند متانول در دمای اتاق وجود دارد که یکی از این روش‌ها، حذف رادیکال ۲و۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) است که ساختار آن در شکل (۲-۸) آورده شده است.

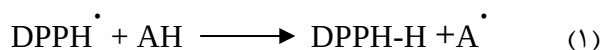


شکل ۲-۸- ساختار ۲و۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل

^{۹۱} Singlet Oxygen Quenchers

^{۹۲} 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

رادیکال DPPH یک رادیکال چربی دوست است که دارای جذب بیشینه در طول موج ۵۱۷-۵۱۵ نانومتر است. در آزمون تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی، رادیکال‌های DPPH با آنتی‌اکسیدان‌ها یا دیگر گونه‌های رادیکالی واکنش می‌دهند و مقدار آن کاهش می‌یابد (واکنش ۱ و ۲) و در نتیجه جذب در طول موج ۵۱۷-۵۱۵ نانومتر کاهش می‌یابد. کاهش مولکول‌های DPPH با تعداد گروه‌های هیدروکسیل در دسترس تقریباً معادل است. گروه‌های هیدروکسیل با دادن هیدروژن به رادیکال‌های DPPH رنگ آن را از بنفش تیره به زرد روشن تبدیل می‌کنند. جذب در طول موج ۵۱۷-۵۱۵ نانومتر بیانگر مقدار DPPH باقیمانده است. درجه‌بندی زمانی سینتیک واکنش رادیکال DPPH به این صورت است: واکنش سریع در کمتر از ۵ دقیقه، واکنش متوسط در ۳۰-۵ دقیقه و واکنش آهسته در بیشتر از ۳۰ دقیقه انجام می‌شود [Chua et al., 2009].

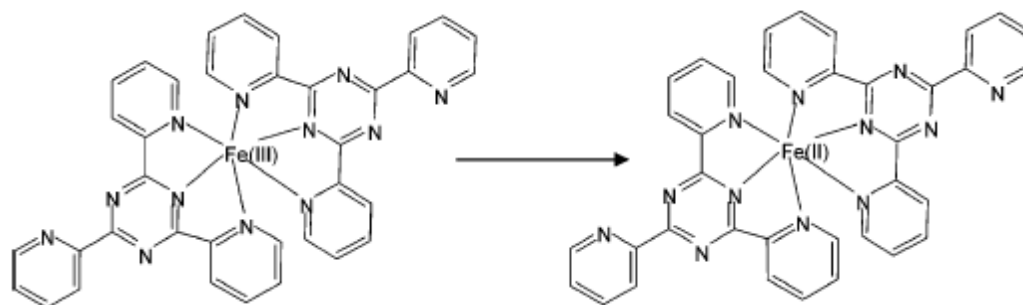


واکنش رادیکال‌های DPPH با برخی از فنول‌ها مانند آلفا توکوفرول به سرعت رخ می‌دهد در حالی که واکنش رادیکال‌های DPPH با دیگر گونه‌های رادیکالی به کندی صورت می‌گیرد. در مقالات معمولاً عدد جذب را بعد از ۱۵ تا ۳۰ دقیقه از شروع واکنش گزارش می‌دهند. در برخی از مقالات نیز IC_{50}^{93} که بیانگر غلظت مورد نیاز آنتی‌اکسیدان مورد نظر برای حذف ۵۰ درصد رادیکال‌های DPPH در یک دوره زمانی خاص است، گزارش می‌شود [Dasgupta and De., 2003].

⁹³ Half maximal inhibitory concentration

۲-۷-۲- روش احیاء آهن

این روش توسط بنزای و استرین در سال ۱۹۹۹ به منظور اندازه‌گیری قدرت احیاء کننده‌گی پلاسما گسترش یافت و بعد از آن این روش برای اندازه‌گیری خواص آنتی اکسیدانی در گیاهان استفاده شد. اساس این روش همانطور که در شکل (۲-۹) مشاهده می‌شود احیاء آهن (III) به آهن (II) است.



شکل ۲-۹- احیاء آهن (III) به آهن (II)

قدرت احیاء کنندگی بستگی به درجه هیدروکسیلاسیون و مزدوج بودن ترکیبات فنولیک دارد. نتایج حاصل از آزمون احیاء آهن به زمان وابسته است. فنولیک‌هایی که سریع واکنش می‌دهند در ۴ دقیقه اول با آهن پیوند برقرار می‌کنند. اما برخی از فنولیک‌ها خیلی کند وارد واکنش می‌شوند و مدت زمانی طولانی تری مورد نیاز است تا آن‌ها شناسایی شوند از این ترکیبات می‌توان به اسید کافئیک، اسید تانیک، اسید فرولیک، اسید آسکوربیک و کوئرستین اشاره کرد [Pulido et al., 2000]. احیاء آهن روشی سریع، ساده و ارزان قیمت است و همچنین به تجهیزات خاصی نیاز ندارد [Prior et al., 2005].

۲-۸- روش سطح پاسخ

روش سطح پاسخ که برای نخستین بار توسط باکس و ویلسون^{۹۴} (۱۹۵۱) معرفی شد، مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضی است که در مورد فرآیندهایی کاربرد دارد که چند متغیری هستند یا

⁹⁴ Box & Wilson

مکانیسم‌های دخیل در آنها به خوبی مشخص نشده‌اند و اطلاعات موجود در مورد سیستم بسیار کم می‌باشد، یا میان متغیرها بر هم کنش وجود داشته و پاسخ غیر خطی است [Mizubuti et al., 2000].

باکس و ویلسون، کارایی شمار زیادی از طرح‌های آزمایشی را مقایسه کرده و مفهوم طرح‌های مرکب^{۹۵} را برای نخستین بار معرفی کردند. پیشرفت اصلی مقاله‌های باکس و همکارانش در دهه ۱۹۵۰، ارائه‌ی طرح‌های آزمایشی بود که به پیشنهاد بکارگیری طرح‌های مرکب توسط آنان منتهی گردید. با وجود اینکه مزایای طرح فاکتوریل برای تخمین زدن تابع پاسخ، مدت‌های مدیدی است که شناخته شده ولی از معایب آن، بکارگیری شمار زیادی واحدهای آزمایشی است که برای فاکتورهای زیاد، مورد نیاز می‌باشد که از نظر عملی غیر ممکن است. باکس و ویلسون (۱۹۵۱) ایده‌های ساده‌ی آزمایش‌های فاکتوریل با استفاده طرح مرکب را از طریق افزودن نقاط اضافی به طرح فاکتوریل متحول ساختند [Mead., 1975]. طبق گزارش این محققین، هدف اصلی روش سطح پاسخ، سوق یافتن به شرایط بهینه است که توسط حداکثر سطح پاسخ حاصل می‌شود. کانون توجه مقاله‌ی باکس و ویلسون و مقاله‌های بعدی آن‌ها، بکارگیری نتایج آزمایش برای برازش مدل پاسخ چند جمله‌ای و در نتیجه تصمیم‌گیری در مورد سطوح فاکتورها در آزمایش‌های بعدی بوده است. در نتیجه برای آزمایشی که هدف آن بهینه‌سازی است، طرح مرکب مرکزی^{۹۶} (CCD) ارجعیت دارد [Mead., 1975]. یکی از مهمترین ویژگی‌ها و جنبه‌های روش سطح پاسخ، چرخش‌پذیری^{۹۷} آن می‌باشد. در تعریف طرح مرکب مرکزی که توسط باکس و ویلسون (۱۹۵۱) پیشنهاد شده، در نظر گرفتن رابطه‌ی بین سطوح نقاط محوری^{۹۸} و نقاط طرح فاکتوریل^{۹۹} که به عنوان پایه‌ی طرح مرکب است، دارای اهمیت می‌باشد. طرح‌هایی که تابع واریانس آن‌ها کروی یا نزدیک کروی است، اصطلاحاً طرح‌های چرخش‌پذیر خوانده شده‌اند به طوری که واریانس پاسخ پیش‌بینی شده در یک نقطه

^{۹۵} Composite design

^{۹۶} Central Composite Design (CCD)

^{۹۷} Rotatability

^{۹۸} Axial Points

معین، مقداری است که تنها بستگی به فاصله‌ی آن نقطه از مرکز طرح و نه جهت آن دارد [Rice-Evans et al., 1994]. دباون^{۹۹} (۱۹۵۹) اذعان داشت که رده‌ی CCD های چرخش پذیر نیازمند پنج سطح برای هر فاکتور هستند [Mead., 1975].

۹-۲- مروری بر کارهای گذشته

۹-۲-۱- بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولیک

در زمینه‌ی استخراج و بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولیک از منابع مختلف، تحقیقات گسترده‌ای انجام شده است که در زیر به برخی از آن‌ها اشاره می‌گردد.

لیانا-پاتیرانا^{۱۰۰} و شهیدی^{۱۰۱} (۲۰۰۵)، شرایط استخراج (دما، ترکیب حلال و زمان استخراج) ترکیبات فنولیک از دانه‌ی کامل و پوست گندم نرم و سخت را با استفاده از روش سطح پاسخ بهینه سازی نمودند که شرایط بهینه به ترتیب برابر با دمای ۶۱ درجه سانتی گراد، غلظت ۵۴٪، زمان ۶۴ دقیقه بود [liyana et al., 2005].

سیلوا^{۱۰۲} و همکاران (۲۰۰۷)، شرایط استخراج فنولیک کل، فلاونوئیدها و فلاونول‌های لینگا ادولیس^{۱۰۳} (گیاهی دارویی که در مناطق آمریکای جنوبی رشد می‌کند) را با استفاده از روش سطح پاسخ بهینه سازی نمودند که شرایط بهینه برابر با دمای ۵۸/۲ درجه سانتی گراد، اتانول با غلظت ۸۶/۸٪ و زمان ۴۶/۸ دقیقه بود [Silva et al., 2007].

⁹⁹De Baun, 1959

¹⁰⁰Liyna-Pathirana

¹⁰¹and Shahidi

¹⁰²Silva

¹⁰³Lingaodulis

رضا تبارکی و همکاران (۲۰۱۱)، شرایط استخراج (دما، درصد حلال و زمان) آنتی اکسیدان‌های طبیعی از سبوس برنج را با استفاده از روش سطح پاسخ بهینه سازی کردند که شرایط بهینه به ترتیب برابر با ۵۴-۵۱ درجه سانتی گراد، اتانول با غلظت ۶۵-۷۰ درصد، و زمان ۴۵-۴۰ دقیقه بود. [Tabaraki and Nateghi, 2011]

یانگ لیو^{۱۰۴} و همکاران (۲۰۱۳)، شرایط استخراج ترکیبات فنولیک (زمان، غلظت حلال و نسبت نمونه به حلال) را از پوست دانه‌های اوریل فروکس^{۱۰۵} با استفاده از روش سطح پاسخ بهینه کردند که شرایط بهینه به ترتیب برابر با ۲۱ دقیقه، اتانول با غلظت ۵۲ درصد و نسبت نمونه به حلال ۳۱/۱ بود. [Liu et al., 2014]

بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولیک با استفاده از روش سطح پاسخ در مواد مختلف دیگری نیز مورد بررسی قرار گرفته است که به طور خلاصه می‌توان به استخراج ترکیبات فنولیک از سیب، انگور قرمز، ترگیل^{۱۰۶}، استخراج فلاونوئیدها از فولیوم اکومیا^{۱۰۷}، استخراج آنتی اکسیدان‌های طبیعی و ترکیبات فنولیک از گاردنیا^{۱۰۸}، سیب چوبی^{۱۰۹}، اختری^{۱۱۰} اشاره کرد.

[Yang et al., 2009; Saikia et al., 2015; Ilaiyaraja et al., 2015; Huang et al., 2009; Cheok et al., 2013; Morelli et al., 2012; Alberti et al., 2014].

¹⁰⁴ Yong liu

¹⁰⁵ *Euryale ferox*

¹⁰⁶ *Garcinia mangostana* Linn

¹⁰⁷ *Folium eucommiae*

¹⁰⁸ *Gardenia jasminoides* Ellis

¹⁰⁹ *Feronia limonia*

¹¹⁰ *Averrhoa carambola*

۲-۹-۲- اندازه‌گیری خواص آنتی اکسیدانی

در سال ۲۰۰۱، پترسون^{۱۱۱} و همکاران فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ی جوی دو سر را با دو روش حذف رادیکال آزاد ۲و۲- دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازین (DPPH) و بی‌رنگ شدن بتاکاروتن اندازه‌گیری کرده و میزان ترکیبات فنولیک کل عصاره را تعیین کردند. این محققین نشان دادند بین میزان ترکیب‌های فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده ارتباط مستقیمی وجود دارد [Peterson., et al 2001].

النی^{۱۱۲} و همکاران (۲۰۰۹) فعالیت آنتی اکسیدانی یک نوع چای^{۱۱۳} را با روش حذف DPPH مورد ارزیابی قرار دادند که مشخص شد کلروجنیک اسید و مشتقات آن دارای خواص آنتی اکسیدانی زیادی هستند [Gioti et al., 2009].

محسن و آمار (۲۰۰۹) خواص آنتی اکسیدانی عصاره کاکل ذرت را که با حلال‌های مختلف استخراج کردند با روش حذف DPPH اندازه‌گیری کردند و مشخص شد که بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی، مربوط به عصاره متانولی است [Mohsen and Ammar, 2009].

اردستانی و یزدان پرست (۲۰۰۷) فعالیت آنتی اکسیدانی گونه‌ای از بومادران^{۱۱۴} را با روش‌های مختلفی از جمله روش حذف DPPH، جذب رادیکال هیدروکسیل و قدرت احیاء‌کنندگی آهن اندازه‌گیری کردند و نتایج نشان داد که هر چقدر غلظت عصاره بیشتر باشد فعالیت آنتی اکسیدانی نیز افزایش می‌یابد [Ardestani and Yazdanparast, 2007].

¹¹¹ Peterson

¹¹² Eleni

¹¹³ *Hypericum perforatum*

¹¹⁴ *Achillea santolina*

گورسوی^{۱۱۵} و همکاران (۲۰۰۹) خواص آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی هفت گونه از یک نوع قارچ را بررسی کردند. آن‌ها برای تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی، از روش‌هایی مانند حذف رادیکال DPPH، احیاء آهن و خاصیت کلانته‌کنندگی استفاده کردند [Gursoy et al., 2009].

وجدیلو^{۱۱۶} و همکاران (۲۰۱۴) نیز بر روی خواص آنتی اکسیدانی شربت به^{۱۱۷} کار کردند [Wojdyło et al., 2014].

۲-۹-۳- شناسایی ترکیبات فنولیک با کروماتوگرافی مایع

سوارز^{۱۱۸} و همکاران (۲۰۰۸) ترکیبات فنولیک موجود در روغن زیتون بکر^{۱۱۹} را با کروماتوگرافی مایع و آشکار ساز جرمی تعیین کردند که مهمترین ترکیبات شناسایی شده فلاونوئیدها، لیگنان‌ها و فنیل الکل‌ها بودند [Suárez et al., 2008].

سیرام^{۱۲۰} و همکاران (۲۰۰۶) با به کارگیری کروماتوگرافی مایع ترکیبات فنولیک را در توت فرنگی شناسایی کردند که مشخص شد ترکیباتی مانند الایک اسید^{۱۲۱}، الایک تانین^{۱۲۲} و گالوتان^{۱۲۳} ترکیبات فنولیک غالب موجود در توت فرنگی هستند [Seeram et al., 2006].

آلاکولانجا^{۱۲۴} و همکاران (۲۰۱۴) ترکیبات فنولیک را در دو گونه از یک نوع میوه به نام رامونچی^{۱۲۵} با استفاده از کروماتوگرافی مایع و به همراه آشکار ساز جرمی شناسایی و دسته بندی کردند که ۳۵ ترکیب، شناسایی و طبقه بندی شد [Alakolanga et al., 2014].

¹¹⁵ Gursoy
¹¹⁶ Wojdyło
¹¹⁷ quince juice
¹¹⁸ Suarez
¹¹⁹ Virgin olive oil
¹²⁰ Seeram
¹²¹ Ellagic acid
¹²² Ellagitannins
¹²³ Gallotannin

مالدینی^{۱۲۶} و همکاران در سال ۲۰۱۱ و ساپونیکووا^{۱۲۷} با کروماتوگرافی مایع ترکیبات فنولیکی موجود در بیرسونیا کراسیفولیا^{۱۲۸} و چای سبز را مورد بررسی قرار دادند که باعث شناسایی ترکیباتی مانند کاتچین، اپی کاتچین و مشتقات آن‌ها شد. [Maldini et al., 2011; Sapozhnikova, 2014]

¹²⁴ Alakolanga

¹²⁵ Flacourtia indica & Flacourtia inermis

¹²⁶ Maldini

¹²⁷ Sapozhnikova

¹²⁸ *Byrsonima crassifolia*

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد مورد استفاده

متانول، اتانول، معرف فولین، کربنات سدیم، نیترات سدیم، کلراید آلومینیوم، هیدروکسید سدیم، اسید گالیک، کوئرسیتین، پتاسیم فسفات، پتاسیم فری سیانید، اسید تری کلرو استیک، تری کلرید آهن، مولیبدات آمونیوم، اسید سولفوریک، فسفات سدیم، بوتیلید هیدروکسی تولوئن (BHT)، آب دیونیزه شده، استونیتریل و آمونیوم استات از شرکت مرک^{۱۲۹} آلمان و ۲۰۲- دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) از شرکت سیگما آلد ریچ^{۱۳۰} آمریکا تهیه شد.

۳-۲- وسایل و تجهیزات مورد استفاده

اسپکتروفوتومتر (مدل Unico UV 2100 ساخت کشور آمریکا)، دستگاه مولد امواج فراصوت (Topsonic ساخت ایران)، ترازو (Kern آلمان)، کروماتوگرافی مایع-طیف سنج جرمی^{۱۳۱} (مدل API3200 ساخت کشور کانادا)

۳-۳- روش‌ها

۳-۳-۱- آماده سازی نمونه

سنبله زیبا از کوه‌های زاگرس واقع در منطقه فریدن^{۱۳۲} واقع در ۱۲۰ کیلومتری غرب استان اصفهان جمع آوری شد و توسط گروه گیاه شناسی دانشگاه صنعتی اصفهان شناسایی گردید. نمونه‌ها در سایه و در دمای اتاق خشک گردید و قسمت‌های هوایی آن با آسیاب (مدل moulinex ساخت کشور چین) آسیاب شد و نمونه‌های آسیاب شده در ظروف پلاستیکی بدون منفذ در محلی تاریک و خنک نگه داری شد.

¹²⁹ Merck

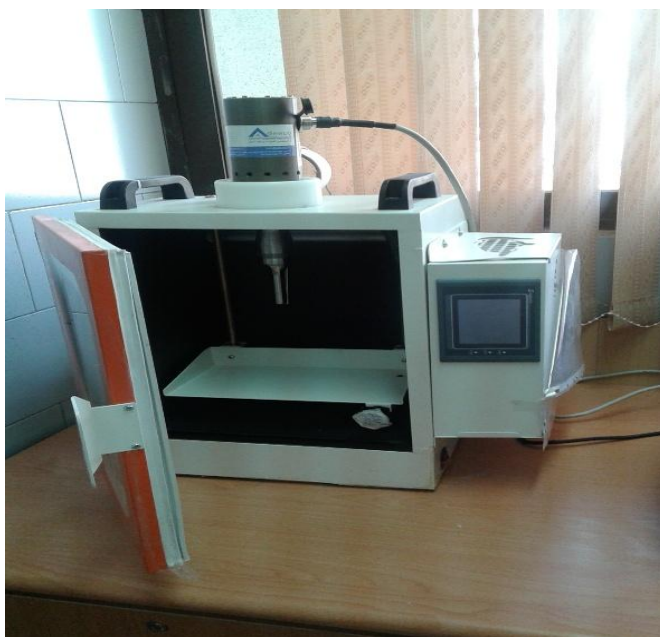
¹³⁰ Sigma Aldrich

¹³¹ LC-ESI-MS/MS

¹³² Fereidan

۳-۳-۲- استخراج به کمک امواج فراصوت

مقدار مشخصی از نمونه را با حجم مشخصی از حلال (با توجه به شرایط هر آزمایش) مخلوط کرده و سپس در زیر پروب مولد امواج فراصوت (شکل ۳-۱) به گونه‌ای قرار داده شد که پروب تا عمق ۲ سانتی متر در محلول حاوی نمونه قرار بگیرد و سپس شدت و مدت زمان با توجه به هر آزمایش تنظیم شد. علاوه بر این، دستگاه توانایی تولید امواج فراصوت به صورت پالسی را نیز داشت که به صورت ۱۰ ثانیه روشن و ۲ ثانیه خاموش تنظیم شد. این دستگاه مجهز به یک دماسنج نیز بود که به همراه پروب داخل محلول حاوی نمونه قرار می‌گرفت و دما را به طور دیجیتالی در هر لحظه از فرایند در صفحه کنترل دستگاه نمایان می‌کرد. در طی فرایند استخراج، دما با یخ ثابت نگه داشته شد (دمای محیط) به گونه‌ای که ظرف حاوی نمونه و حلال در ظرف دیگری که حاوی آب و یخ بود قرار داده و دما کنترل می‌شد و در پایان، پس از هر استخراج، عصاره حاصل با کاغذ صافی صاف گردید و در فالكون‌های ۵۰ میلی لیتری در فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگه داری شد.



شکل ۳-۱- دستگاه مولد امواج فراصوت (Topsonic ساخت ایران)

۳-۳-۳- اندازه‌گیری محتوی فنول کل

به منظور اندازه‌گیری فنول کل ۴۰ میکرولیتر از نمونه با سمپلر به لوله آزمایش منتقل شد و سپس به ترتیب ۳/۲ میلی لیتر آب مقطر و ۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین به آن اضافه گردید و روی همزن خوب به هم زده شد و بعد از ۸-۱ دقیقه ۶۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۲۰٪ به آن اضافه گردید و دو مرتبه به هم زده شد 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 اسید گالیک بر یک گرم نمونه خشک گزارش شد. تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار صورت گرفت [Waterhouse, 2002].

۳-۳-۳-۱- رسم منحنی استاندارد اسید گالیک

برای رسم منحنی استاندارد ۰/۵ گرم اسیدگالیک را در ۱۰ میلی لیتر اتانول خالص حل کرده و سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده (۵ گرم بر لیتر) و مقادیر حجمی ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی لیتر از محلول اولیه برداشته و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده تا غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر بدست آید و سپس جذب آنها مطابق روش اندازه‌گیری فنول کل در ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. آزمون جذب برای هر یک از محلول‌های استاندارد در سه تکرار انجام شد. بر اساس نتایج، منحنی جذب اسید گالیک با توجه به غلظت‌های ساخته شده رسم شد و سپس مقدار فنول کل برای هر یک از عصاره‌ها، با استفاده از نمودار استاندارد ترسیم شده بر حسب اسید گالیک محاسبه شد [Waterhouse, 2002].

۳-۳-۳-۲- تهیه محلول سدیم کربنات

۲۰ گرم کربنات سدیم بدون آب را در ۸۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و سپس آن را جوشانده و بعد از سرد شدن در دمای محیط چند کریستال کربنات سدیم به آن اضافه کرده و ۲۴ ساعت در دمای

اتاق قرار داده و بعد از این مدت محلول را با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف کرده و سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد [Waterhouse, 2002].

۳-۴- اندازه‌گیری فلاونوئید کل

به منظور اندازه‌گیری فلاونوئید کل ۴۰۰ میکرولیتر از عصاره با ۶۰۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شد و سپس به آن ۰/۰۵ میلی لیتر نیترات سدیم ۵٪ اضافه گردید و بعد از ۵ دقیقه ۰/۱ میلی لیتر کلراید آلومینیوم ۱۰٪ اضافه شد و سپس بعد از ۶ دقیقه به ترتیب ۰/۵ میلی لیتر هیدروکسید سدیم ۱ مولار و ۱ میلی لیتر آب مقطر به محلول اضافه شد و جذب در ۵۱۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل Unico UV 2100 ساخت کشور آمریکا) اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که همه آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد و نتایج معادل میلی گرم کوئرستین در هر گرم ماده خشک نمونه گزارش شد [Hatamnia et al., 2014].

۳-۴-۱- رسم منحنی استاندارد کوئرستین

۱۰۰ میلی گرم از کوئرستین در ۱۰۰ میلی لیتر حلال ۵۰٪ متانول/آب حل کرده (غلظت ppm ۱۰۰۰) و برای تهیه غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm به ترتیب ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی لیتر از غلظت ppm ۱۰۰۰ برداشته شد و به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد و طبق روش اندازه‌گیری فلاونوئید کل، جذب در ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. و نمودار استاندارد فلاونوئید رسم گردید. (شکل-۵-۱- استاندارد فلاونوئید کل) [Hatamnia et al., 2014].

۳-۳-۵- تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی

۳-۳-۵-۱- روش حذف رادیکال آزاد ۲و۲- دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق آزمون DPPH و به وسیله معرف ۲و۲- دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل انجام شد. شرایط کار به این صورت بود که ۴۰ میکرولیتر از عصاره با ۱/۵ میلی لیتر محلول متانولی ۰/۱ میلی مولار رادیکال آزاد ۲و۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل، مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای محیط نگهداری شد و سپس جذب آن در ۵۱۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر (مدل Unico UV 2100 ساخت کشور آمریکا) خوانده شد. از حلال متانول برای صفر کردن دستگاه استفاده شد و به همراه نمونه‌ها نیز یک نمونه دیگر که حاوی ۴۰ میکرولیتر متانول به همراه ۱/۵ میلی لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار ۲و۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل بود نیز به عنوان نمونه کنترلی استفاده شد و جذب آن در ۵۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و از جذب نمونه‌ها کم شد. همه نمونه‌ها در ۳ تکرار انجام شد. درصد فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از رابطه‌ی ۳-۱ محاسبه می شود:

[Hatamnia et al., 2014]

$$\text{رابطه ۳-۱} \quad \text{درصد فعالیت آنتی اکسیدانی} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} \times 100$$

۳-۳-۵-۲- روش احیاء آهن

ابتدا یک میلی لیتر از نمونه به ترتیب با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم (pH = ۶/۶ و غلظت ۰/۲ مولار) و ۲/۵ میلی لیتر فری سیانید پتاسیم ۱٪ درصد مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد نگه داشته شد. سپس ۲/۵ میلی لیتر اسید تری کلرو استیک ۱۰٪ به مخلوط اضافه گردید. ۲/۵ میلی لیتر از محلول بالا با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۰/۵ میلی لیتر تری کلرید آهن ۰/۱٪ به آن اضافه شد و در آخر جذب بعد از ۳۰ دقیقه در ۷۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل Unico UV 2100 ساخت کشور آمریکا) اندازه‌گیری شد. نتایج به دست آمده با

آنتی اکسیدان سنتزی بوتیلید هیدروکسی تولوئن (BHT) مورد مقایسه قرار گرفت [Lim and Murtijaya, 2007].

۳-۵-۳-۳- روش اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی کل ۱۳۳

اساس این روش تبدیل شدن مولیبدن (VI) به مولیبدن (V) توسط عصاره است که در نتیجه آن در محیط‌های اسیدی یک کمپلکس سبز رنگ فسفات مولیبدن (V) ایجاد می‌شود که مقدار این ترکیب تولید شده را می‌توان در طول موج ۶۹۵ نانومتر اندازه‌گیری کرد. روش بدین صورت است که ابتدا ۵۰ میکرولیتر از نمونه با ۳ میلی لیتر از معرف (اسید سولفوریک ۰/۶ مولار، سدیم فسفات ۲۸ میلی مولار و مولیبدات آمونیوم ۴ میلی مولار) مخلوط شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد و بعد از این مدت نمونه‌ها در دمای محیط خنک و جذب اندازه‌گیری شد. مقدار ظرفیت آنتی اکسیدانی بر اساس میلی گرم آنتی اکسیدان سنتزی بوتیلید هیدروکسی تولوئن (BHT) گزارش شد. [Kubola and Siriamornpun., 2008].

۳-۵-۳-۳-۱- رسم منحنی استاندارد بوتیلید هیدروکسی تولوئن

ابتدا ۲۵ میلی گرم بوتیلید هیدروکسی تولوئن در ۲۵ میلی لیتر محلول ۶۰٪ متانول/آب حل شد تا غلظت ۱۰۰۰ ppm به دست آید سپس به منظور تهیه غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ ppm به ترتیب ۱/۲۵، ۲/۵ و ۶/۲۵ میلی لیتر از محلول ۱۰۰۰ ppm برداشته و به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده شد. سپس طبق روش ذکر شده جذب در ۶۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و منحنی استاندارد رسم گردید. (شکل-۵-۲- استاندارد ظرفیت آنتی اکسیدانی) [Kubola and Siriamornpun., 2008].

¹³³ Total antioxidant capacity

۳-۳-۶- تشخیص ترکیبات فنولیک در عصاره با کروماتوگرافی مایع - طیف سنج

جرمی

به منظور تشخیص ترکیبات فنولیک در عصاره سنبله زیبا از کروماتوگرافی مایع به همراه طیف سنج

جرمی (مدل دستگاه API3200) استفاده شد. مشخصات دستگاه استفاده شده:

- ۱- ستون: از ستون Xterra RP18 با قطر ۳/۵ میکرومتر و طول ۲/۱ × ۱۵۰ میلی متر استفاده شد.
- ۲- سرعت جریان و حجم تزریق به ترتیب برابر با ۳۰۰ میکرولیتر بر دقیقه و ۲۰ میکرولیتر بود. لازم به ذکر است که تزریق به صورت اتوماتیک صورت گرفت و کل مدت زمان تزریق ۳۰ دقیقه طول کشید.
- ۳- اختلاف پتانسیل و دمای مورد استفاده برای یونیزاسیون ترکیبات به ترتیب برابر با ۴۵۰۰- ولت و ۵۰۰ درجه سانتی گراد بود و دمای اتاق^{۱۳۴} که ستون دستگاه در آن قرار داشت ۳۰ درجه سانتی گراد بود.
- ۴- در فاز متحرک از دو حلال استونیتریل (حلال A) و استات آمونیوم (۱۰ میلی مول و pH=۴) به عنوان حلال B استفاده شد. سیستم تزریق حلال ها به صورت گرادیانت بود که برنامه زمان بندی شده آن در جدول (۳-۱) آمده است.

جدول ۳-۱- غلظت حلال در سیستم گرادیانت

زمان (دقیقه)	سرعت جریان	درصد حلال A	درصد حلال B
(میکرولیتر/دقیقه)			
۰	۳۰۰	۲۰	۸۰
۲	۳۰۰	۲۰	۸۰
۲۰	۳۰۰	۹۰	۱۰
۲۵	۳۰۰	۹۰	۱۰

¹³⁴Oven

۸۰	۲۰	۳۰۰	۳۰
----	----	-----	----

۳-۳-۷- روش آماری و نرم افزارهای مورد استفاده

در این تحقیق از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی در پنج سطح استفاده شد که مزیت این روش بررسی اثر خطی، متقابل و درجه دوم متغیرهای فرایند با تعداد آزمایش کمتر است و به منظور اجرای این طرح از نرم افزار (7.0.0) Design-expert استفاده شد و آنالیزهای آماری با نرم افزار SPSS 20 انجام شد. برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Microsoft Excel 2010 استفاده شد. شناسایی ترکیبات فنولیک موجود در عصاره سنبله زیبا با نرم افزار Analyst انجام شد.

فصل چهارم

نتایج و بحث

۴-۱- مقایسه استخراج ترکیبات فنولیک به کمک امواج فراصوت و آزمون

شاهد (روش غرقابی)

براساس آزمون t و با توجه به شکل (۴-۱) مشخص شد که امواج فراصوت بر روی استخراج ترکیبات فنولیک تأثیر معنی داری دارند و باعث افزایش استخراج ترکیبات فنولیک از ۱۲/۱۵ (میلی گرم معادل اسید گالیک/یک گرم نمونه) به ۱۶/۴۴ (میلی گرم معادل اسید گالیک/یک گرم نمونه خشک) می‌شوند. جاکوز^{۱۳۵} و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که در استخراج ترکیبات فنولیک از برگ‌های *Ilex paraguariensis* روش استخراج به کمک امواج فراصوت موثرتر از روش غرقابی است [Jacques et al., 2007]. امواج فراصوت می‌توانند حباب‌هایی در مایع تولید کرده و به تبع آن فشار منفی در محیط ایجاد کنند. حباب‌های تشکیل شده، سپس رشد کرده و در نهایت تخریب می‌شوند. نزدیک لایه‌ی مرزی فاز جامد، فروپاشی (تخریب) حفره‌ها به صورت نامتقارن است که این پدیده جریانات با سرعت خیلی بالا در مایع ایجاد می‌کند. این فوران درون محیط ضربات خیلی قوی به سطح فاز جامد می‌زند [Luque-Garcia et al., 2003]. بنابراین، تغییر ایجاد شده در محیط باعث افزایش سرعت استخراج می‌شود. گابالدوان-لیوا^{۱۳۶} و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که امواج فراصوت، انتقال جرم برخی از ترکیبات فلفل قرمز را به دلیل افزایش نفوذپذیری دیواره‌ی سلولی افزایش می‌دهند [Gabaldo'n et al., 2007]. نتایج تحقیق حاضر مشابه نتایج به دست آمده توسط رودریگز^{۱۳۷} و همکاران (۲۰۰۸) و بالاچاندرا^{۱۳۸} و همکاران (۲۰۰۶) و داپورتو^{۱۳۹} و همکاران بود [Rodrigues et al., 2008; Balachandran et al., 2006; Da Porto et al., 2013].

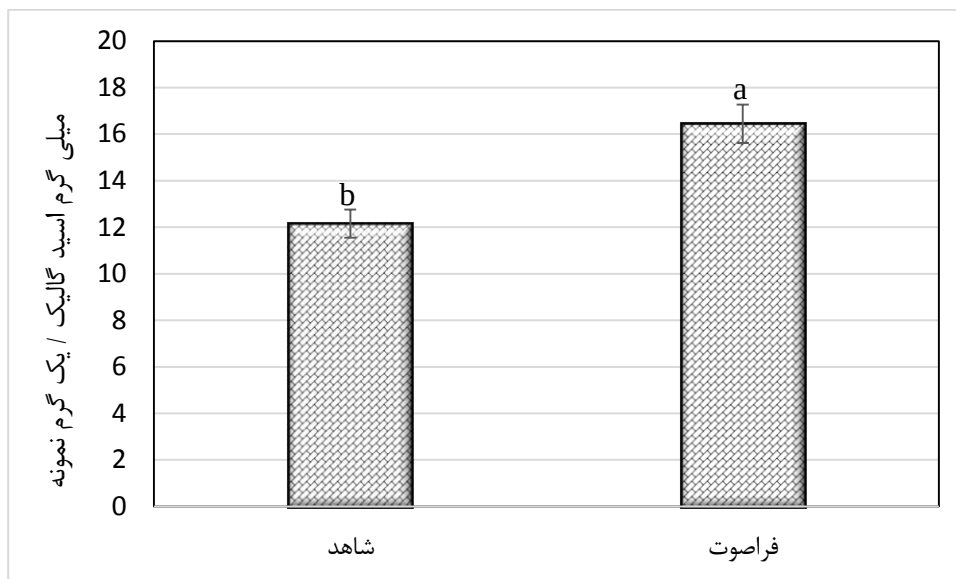
¹³⁵ Jacques

¹³⁶ Gabaldo'n-Leyva

¹³⁷ Rodrigues

¹³⁸ Balachandran

¹³⁹ Da Porto

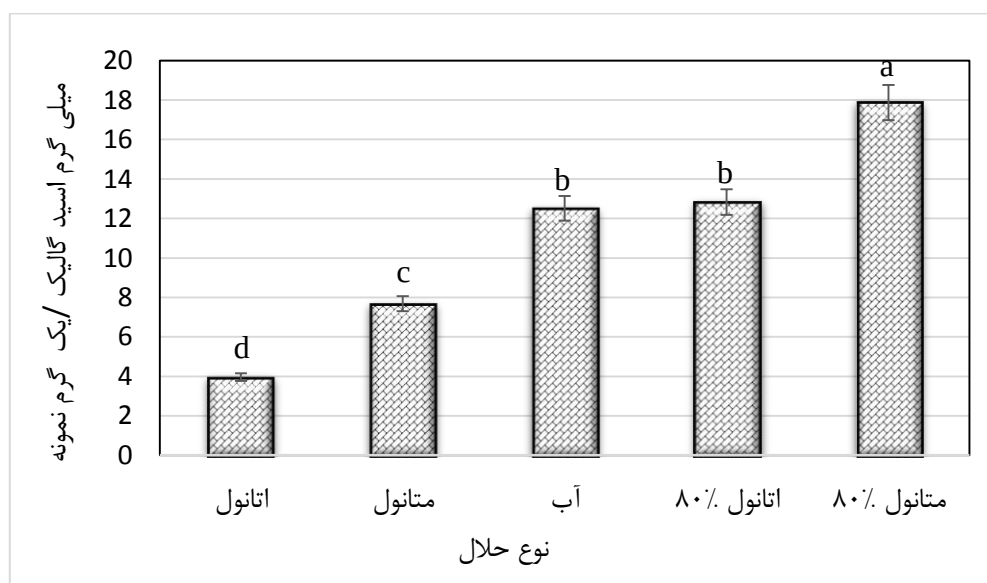


شکل ۴-۱- مقایسه استخراج ترکیبات فنولیک به کمک امواج فراصوت و آزمون شاهد

۴-۲- انتخاب بهترین حلال

انتخاب نوع حلال می‌تواند نوع ترکیبات و سرعت خروج ترکیبات مورد نظر را تغییر دهد. حلالیت ترکیبات فنولیک تحت تأثیر ساختار شیمیایی آن‌ها در گیاه است که ممکن است تنوع آن‌ها از مواد ساده تا ترکیبات پلیمری پیچیده باشند. حلالیت ترکیبات فنولیک همچنین به قطبیت حلال یا حلال‌های مورد استفاده بستگی دارد. بنابراین خیلی مشکل است که یک روش مناسب را برای استخراج ترکیبات فنولیک از همه گیاهان بیان کرد [Nacz et al., 2006]. بنابراین، با توجه به مطالعه‌های محققین دیگر در زمینه‌ی استخراج ترکیبات فنولیک از نمونه‌های مختلف حلال‌های آب، متانول، اتانول، متانول/آب (۲۰/۸۰)، اتانول/آب (۲۰/۸۰)، به منظور بررسی اثر نوع حلال بر میزان راندمان استخراج ترکیبات فنولیک از سنبله زیبا انتخاب شد [Chen et al., 2005; Pinelo et al., 2004]. با توجه به شکل (۴-۲) حلال متانول/آب (۲۰/۸۰) قادر به استخراج ترکیبات فنولیک بیشتری نسبت به سایر حلال‌ها است. همچنین نتایج مقایسه‌ی میانگین با آزمون دانکن نشان داد که اختلاف متانول/آب (۲۰/۸۰) با سایر حلال‌ها با سطح اطمینان ۹۵٪ معنی دار است. بنابراین، متانول/آب (۲۰/۸۰) به عنوان بهترین حلال از نظر استخراج

ترکیبات فنولیک بود که کارهای انجام شده در این زمینه نیز این نتیجه را تأیید می‌کنند [Tabaraki and Nateghi, 2011; Razali et al., 2012]. افزایش استخراج ترکیبات فنولیک توسط متانول ۸۰٪ را می‌توان مربوط به این دانست که قطبیت متانول ۸۰٪ بیشترین شباهت را به قطبیت ترکیبات فنولیک موجود در سنبله زیبا دارد و باعث افزایش مقدار استخراج این ترکیبات خواهد شد.



شکل ۴-۲- اثر نوع حلال بر روی فنول کل

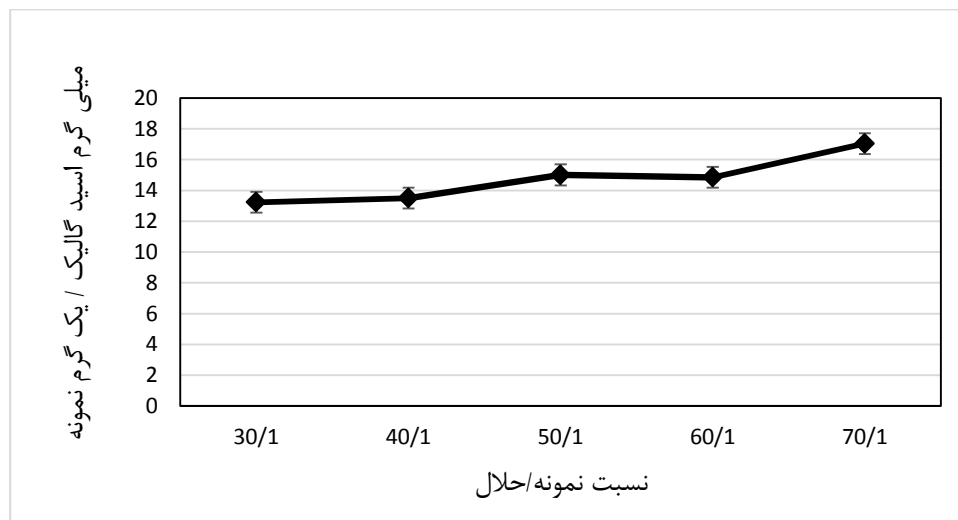
۴-۳- تعیین دامنه متغیرها

به منظور تعیین بهترین دامنه متغیرهای موثر در فرایند ابتدا یکسری پیش تست انجام شد که نتایج به شرح زیر است.

۴-۳-۱- اثر نسبت نمونه به حلال

با توجه به شکل (۴-۳) مقدار فنول کل برای نسبت نمونه به حلال ۳۰/۱، ۴۰/۱، ۵۰/۱، ۶۰/۱ و ۷۰/۱ به ترتیب برابر با $13/23 \pm 0/19$ ، $13/51 \pm 0/07$ ، $15/01 \pm 0/65$ ، $14/86 \pm 0/85$ ، $17/04 \pm 0/46$ (میلی گرم معادل میلی گرم اسید گالیک/یک گرم نمونه خشک) است. مقدار فنول کل استخراج شده با

نسبت حلال به نمونه رابطه‌ی مستقیم دارد اما بین نسبت‌های ۱/۵۰ و ۱/۶۰ مقدار فنول کل استخراج شده ثابت باقی می‌ماند و سپس افزایش می‌یابد که این روند مطابق نتایج سیلوا^{۱۴۰} و همکاران (۲۰۰۷) است [Silva et al., 2007]. روند افزایشی مقدار فنول استخراج شده با افزایش نسبت حلال به نمونه را می‌توان این گونه بیان کرد که چون با افزایش نسبت حلال به نمونه، غلظت ترکیبات فنولیک در حلال کم می‌شود و تفاوت غلظت درون نمونه و محیط اطراف آن، افزایش پیدا می‌کند در نتیجه ترکیبات فنولیک از نمونه با سرعت بیشتری خارج می‌شوند [Vuong et al., 2013; Al-farsi and Lee., 2008] اما لازم به ذکر است که افزایش بیش از حد نسبت حلال به نمونه مقرون به صرفه نیست و ما نمی‌توانیم هر مقداری از حلال را انتخاب کنیم [Tabaraki and Nateghi., 2011].



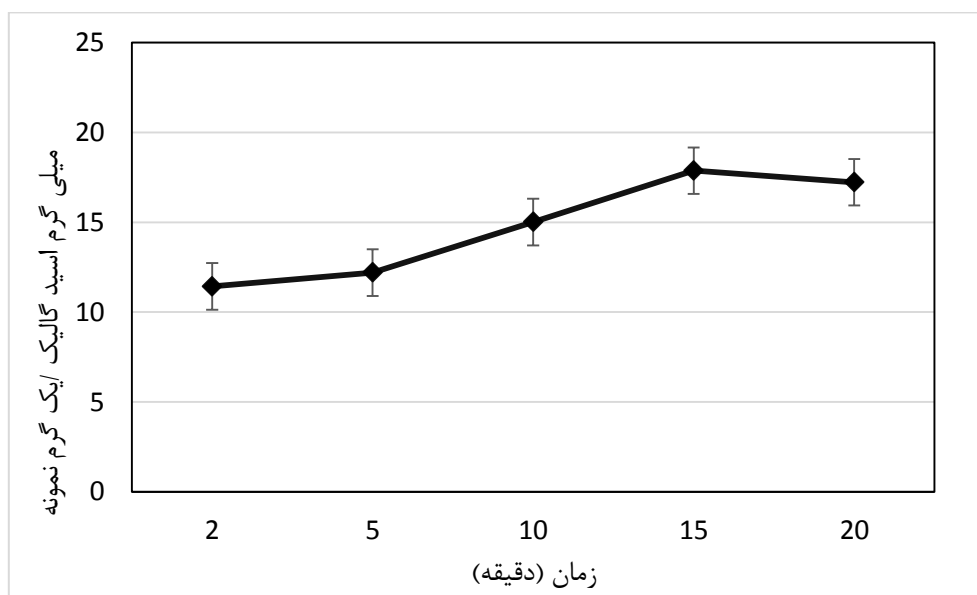
شکل ۴-۳- اثر نسبت نمونه به حلال بر روی فنول کل

۴-۳-۲- اثر زمان استخراج

با توجه به نمودار (۴-۴) مقدار فنول کل در زمان‌های ۲، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه به ترتیب برابر با $17/22 \pm 0/52$ ، $17/87 \pm 0/84$ ، $15/01 \pm 0/66$ ، $12/20 \pm 0/49$ ، $11/43 \pm 0/27$ (میلی گرم معادل میلی گرم اسید گالیک/یک گرم نمونه خشک) است. با توجه به نتایج به دست آمده، بهترین زمان برای

¹⁴⁰ Silva

استخراج ترکیبات فنولیک ۱۵ دقیقه است. در زمان‌های کمتر حلال فرصت کمتری برای استخراج این ترکیبات از سلول‌های گیاهی دارد و در زمان‌های بیشتر از ۱۵ دقیقه نیز مقدار ترکیبات فنولیک استخراج شده ثابت و یا حتی کم خواهند شد و علت آن این است که در ۱۵ دقیقه‌ی اول همه ترکیبات فنولیک استخراج خواهند شد و با افزایش زمان ترکیبات فنولیک بیشتر تحت تأثیر دما و فشار حباب‌های کاویتاسیونی قرار می‌گیرند و در نتیجه تخریب خواهند شد [Carrera et al., 2012; Liu et al., 2013].

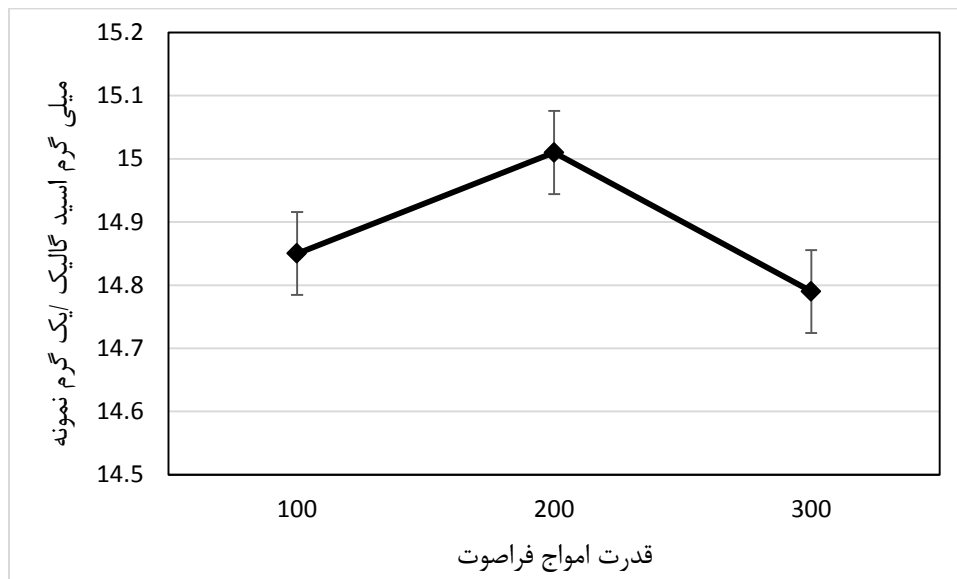


شکل ۴-۴- اثر زمان استخراج بر روی فنول کل

۴-۳-۳- اثر قدرت امواج فراصوت

با توجه به نمودار (۴-۵) مقدار ترکیبات فنولیک به دست آمده توسط قدرت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ وات به ترتیب برابر با $14/85 \pm 0/88$ ، $15/01 \pm 0/65$ و $14/79 \pm 0/79$ (میلی گرم معادل میلی گرم اسید گالیک/یک گرم نمونه خشک) است. همانطور که در نمودار (۴-۵) مشاهده می‌شود با افزایش قدرت امواج فراصوت مقدار ترکیبات فنولیک استخراج شده نیز افزایش می‌یابد و سپس کاهش می‌یابد. دلیل روند نزولی استخراج ترکیبات فنولیک با امواج فراصوت با قدرت بالاتر را می‌توان مربوط به این دانست که

امواج با قدرت بالاتر در محیط رادیکال آزاد ایجاد می‌کنند و همچنین این امواج باعث تخریب ترکیبات فنولیک به طور مستقیم می‌شوند این نتایج مطابق نتایج کاررا و همکاران بود [Carrera et al., 2012].



شکل-۴-۵- اثر قدرت امواج فراصوت بر روی فنول کل

۴-۴- بهینه سازی شرایط استخراج به کمک امواج فراصوت با استفاده از روش سطح پاسخ

هدف از انجام آزمایش‌های بهینه‌سازی، به دست آوردن یک مدل ریاضی برای پیش‌بینی رفتار فرایند می‌باشد. از این رو، طرح‌های بهینه‌سازی از عوامل کمتری برخوردار بوده ولی نسبت به طرح‌های غربال‌گری نسبتاً بزرگتر می‌باشند [Haaland, 1989]. با توجه به نتایج به دست آمده از پیش‌تست، برای نرم افزار سطوح هر متغیر تعریف شد و کد گذاری گردید که نتایج آن در جدول (۴-۱) آورده شده است.

جدول ۴-۱- سطوح متغیرها

متغیرهای فرایند	سطوح				
	۲	۱	۰	-۱	-۲
X ₁ (قدرت امواج فراصوت W)	۳۵۰	۳۰۰	۲۵۰	۲۰۰	۱۵۰
X ₂ (نسبت نمونه به حلال)	۷۰	۶۰	۵۰	۴۰	۳۰
X ₃ (زمان دقیقه)	۱۸	۱۴	۱۰	۶	۲
X ₄ (غلظت متانول v/v%)	۹۰	۷۰	۵۰	۳۰	۱۰

با توجه به تعریف سطوح متغیرها برای نرم افزار سطح پاسخ و تعداد این متغیرها، نرم افزار یک سری آزمایش‌هایی را طراحی می‌کند که آزمایش‌ها به ترتیبی که نرم افزار پیشنهاد کرده است انجام شد و پاسخ‌های هر آزمایش اندازه‌گیری شد. که نتایج حاصله در جدول (۴-۲) آورده شده است.

جدول ۴-۲- شرایط استخراج از گیاه سنبله زیبا با طرح مرکب مرکزی و پاسخ آن‌ها

استاندارد	اجرا	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	فنول کل	AA	فلاونوئید کل	AA/mg TPC	AA/mg TFC
۱	۱۷	۲۰۰	۴۰	۶	۳۰	۱۳/۰۷	۶۱/۵۱	۳۷/۳۵	۴/۷۱	۱/۶۴
۲	۲۶	۳۰۰	۴۰	۶	۳۰	۱۴/۶	۴۱/۹۴	۴۰/۲۱	۲/۸۷	۱/۰۴
۳	۵	۲۰۰	۶۰	۶	۳۰	۱۴/۰۵	۳۹/۵۴	۳۵/۶۳	۲/۸۱	۱/۱۱
۴	۲۸	۳۰۰	۶۰	۶	۳۰	۱۷/۳۸	۳۴/۵۲	۴۷/۴۸	۱/۹۹	۰/۷۲
۵	۳۰	۲۰۰	۴۰	۱۴	۳۰	۱۴/۹۶	۵۸/۳۷	۴۰/۶۴	۳/۹۰	۱/۴۳
۶	۱۲	۳۰۰	۴۰	۱۴	۳۰	۱۵/۱۱	۷۰/۳۰	۴۳/۰۶	۴/۶۵	۱/۶۳

1/0.8	2/70	43/53	47/38	17/57	30	14	60	200	14	7
0/97	2/45	49/45	48/12	19/63	30	14	60	300	19	8
1/52	4/22	40/21	61/30	14/52	70	6	40	200	8	9
1/62	4/57	43/0.6	70/0.8	15/33	70	6	40	300	1	10
0/88	2/14	42/87	37/97	17/71	70	6	60	200	27	11
0/95	2/74	52/0.9	49/48	18/0.8	70	6	60	300	2	12
1/68	4/10	38/67	65/17	15/87	70	14	40	200	18	13
1/61	4/30	47/23	76/15	17/69	70	14	40	300	3	14
0/93	2/72	51/0.9	47/70	17/52	70	14	60	200	10	15
0/93	2/80	56/36	52/72	18/84	70	14	60	300	4	16
1/13	3/0.9	42/30	47/70	15/4	50	10	50	150	22	17
1/21	2/92	45/87	55/75	19/0.6	50	10	50	350	15	18
2/34	5/75	38/70	90/48	15/74	50	10	30	250	11	19
0/93	2/50	49/25	45/61	18/26	50	10	70	250	6	20
1/15	3/0.3	43/40	50/00	16/51	50	2	50	250	20	21
1/43	3/60	49/70	71/23	19/76	50	18	50	250	13	22
0/92	2/39	36/54	33/47	14/00	10	10	50	250	16	23
0/87	3/33	39/29	34/31	10/29	90	10	50	250	7	24
1/11	2/82	44/50	49/37	17/49	50	10	50	250	23	25
1/0.8	2/84	43/68	47/39	16/65	50	10	50	250	21	26
1/26	3/11	43/68	55/0.2	17/67	50	10	50	250	24	27
1/21	3/0.1	44/77	54/0.8	17/95	50	10	50	250	25	28
1/38	3/72	44/22	60/46	16/22	50	10	50	250	9	29

۴-۴-۱- برآزش مدل

ساخت یک مدل یکی از مهمترین مراحل در بهینه سازی فرایند استخراج است. در واقع مدل سازی شامل برقراری روابط کمی بین متغیرهای فرایند و پاسخهای مورد نظر بر اساس دادههای آزمایش است. بهترین مدلی که برای همه پاسخها نرم افزار پیشنهاد کرد مدل درجه دوم چند جمله‌ای است که در جدول (۳-۴) مواردی مانند ضریب همبستگی و عدم برآزش مدل درجه دوم آورده شده است. مقدار عددی R^2 نشان‌دهنده میزان انحراف داده‌ها از مدل رگرسیون می‌باشد و اگر عدد آزمون عدم برآزش بزرگتر از ۰/۰۵ باشد نشان دهنده این است که این آزمون معنی دار نیست و مدلی که آزمون عدم برآزش آن معنی دار نباشد مدل مناسبی برای فرایند استخراج است. با توجه به مطالب ذکر شده مدل‌های درجه دوم آورده شده در جدول (۳-۴) مناسب هستند.

جدول ۳-۴- نتایج تجزیه واریانس مدل درجه دوم پاسخهای مختلف

پاسخ	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار P	ضریب همبستگی (R^2)	عدم برآزش
فنول کل	۱۰۵/۴۱	۷/۵۳	۵/۱۳	۰/۰۰۱۶	۰/۸۳	۰/۰۵۶
فلاونوئید کل	۶۰۷/۲۹	۴۳/۳۸	۸/۸۱	۰/۰۰۰۱	۰/۹۰	۰/۰۰۰۸
AA	۴۶۶۹/۸۴	۳۳۳/۵۶	۱۲/۲۹	۰/۰۰۰۱	۰/۹۲	۰/۳۸
AA/mgTPC	۲۰/۱۵	۱/۴۴	۹/۳۸	۰/۰۰۰۱	۰/۹۰	۰/۳۴
AA/mgTFC	۳/۱۴	۰/۲۲	۱۲/۷۵	۰/۰۰۰۱	۰/۹۲	۰/۲۶

در مدل سازی، ضرایب رگرسیونی مدل تخمین زده می‌شود که این ضرایب در جدول (۴-۴) آورده شده است.

جدول ۴-۴- ضرایب همبستگی مدل‌های درجه دوم پیش بینی شده برای پاسخ‌ها

coefficient	TPC	TFC	AA	AA/mgTPC	AA/mgTFC
β_0	۱۷/۲۵	۴۴/۲۷	۵۲/۹۱	۳/۰۷	۱/۲۰
خطی					
β_1 (قدرت امواج فراصوت)	۰/۷۸**	۲/۳۴***	۱/۶۹ ^{ns}	-۰/۰۵۳ ^{ns}	-۰/۰۲۶ ^{ns}
β_2 (نمونه/حلال)	۱/۰۳***	۲/۸۸***	-۹/۸۸***	-۰/۸۱***	-۰/۳۱***
β_3 (زمان)	۰/۷۹**	۱/۸۲**	۴/۶۷***	۰/۱۱ ^{ns}	۰/۰۵۶ ^{ns}
β_4 (غلظت حلال)	۰/۰۷۴ ^{ns}	۱/۶۶**	۲/۵۲*	۰/۱۴ ^{ns}	۰/۰۱۷ ^{ns}
درجه دوم					
β_{11}	۰/۰۳۶ ^{ns}	۰/۱۵ ^{ns}	-۰/۲۴ ^{ns}	-۰/۰۱۱ ^{ns}	-۷/۵۲۲× ۱۰ ^{-۳ns}
β_{22}	-۰/۰۲۲ ^{ns}	۰/۱۲ ^{ns}	۳/۸۴**	۰/۲۷**	۰/۱۱***
β_{33}	۰/۲۶ ^{ns}	۰/۷۷ ^{ns}	۱/۹۸ ^{ns}	۰/۰۶۵ ^{ns}	۰/۰۲۳ ^{ns}
β_{44}	-۱/۲۳***	-۱/۳۹**	-۴/۷۰***	-۰/۰۴۹ ^{ns}	-۰/۰۷۷**
اثر متقابل					
β_{12}	۰/۱۷ ^{ns}	۰/۹۷ ^{ns}	۶/۵۳۸× ۱۰ ^{-۳ns}	۷/۹۵۶× ۱۰ ^{-۳ns}	-۳/۴۵۱× ۱۰ ^{-۳ns}
β_{13}	-۰/۰۴۳ ^{ns}	-۰/۲۹ ^{ns}	۲/۰۶ ^{ns}	۰/۱۶ ^{ns}	۰/۰۵۲ ^{ns}
β_{14}	-۰/۱۷ ^{ns}	۰/۱۸ ^{ns}	۳/۰۱*	۰/۲۱*	۰/۰۶۳ ^{ns}
β_{23}	۰/۰۱۳ ^{ns}	۰/۸۵ ^{ns}	-۰/۰۴۶ ^{ns}	۰/۰۲۵ ^{ns}	-۰/۰۱۷ ^{ns}

β_{24}	-0.13^{ns}	$1/15^{ns}$	$-1/39^{ns}$	-0.39^{ns}	-0.55^{ns}
β_{34}	-0.24^{ns}	-0.056^{ns}	$-1/48^{ns}$	-0.067^{ns}	-0.27^{ns}
CV	7/35 %	5/04 %	9/72 %	11/90 %	10/76 %

* اختلاف معنی دار در سطح ۵٪، ** اختلاف معنی دار در سطح ۱٪ و *** اختلاف معنی دار در سطح ۰/۱٪

۴-۴-۲- مدل استخراج ترکیبات فنولیک

با توجه به جدول (۴-۴) در استخراج ترکیبات فنولیک (TPC) نسبت نمونه به حلال دارای اثر خطی مثبت و معنی دار با سطح اطمینان ۹۹/۹٪ است. زمان و قدرت امواج فراصوت دارای اثر مثبت خطی و معنی داری در سطح ۹۹٪ است و همچنین اثر درجه دوم غلظت حلال بر روی استخراج ترکیبات فنولیک با سطح اطمینان ۹۹/۹٪ منفی است. و معادله نهایی استخراج ترکیبات فنولیک به صورت زیر خواهد بود (معادله-۴-۱).

$$Y=17.25+0.78X_1+1.03X_2+0.79X_3-1.23X_4^2 \quad \text{معادله-۴-۱}$$

۴-۴-۳- مدل استخراج ترکیبات فلاونوئیدی

با توجه به جدول (۴-۴) و ضرایب مربوط به استخراج ترکیبات فلاونوئیدی (TFC) می‌توان این گونه بیان کرد که اثر خطی قدرت امواج فراصوت و نسبت نمونه به حلال در سطح ۹۹/۹٪، و همچنین غلظت حلال و زمان در سطح ۹۹٪ بر روی استخراج ترکیبات فلاونوئیدی معنی دار و مثبت است اما اثر درجه دوم غلظت حلال بر روی این پاسخ معنی دار و منفی است. و معادله نهایی استخراج ترکیبات فلاونوئیدی به صورت زیر خواهد بود (معادله-۴-۲).

$$Y=44.27+2.34X_1+2.88X_2+1.82X_3+1.66X_4-1.39X_4^2 \quad \text{معادله-۴-۲}$$

۴-۴-۴- مدل فعالیت آنتی اکسیدانی (AA)

با توجه به جدول ضرایب (۴-۴) اثر خطی نسبت نمونه به حلال و اثر درجه دوم غلظت حلال بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی با سطح اطمینان ۹۹/۹٪ معنی دار و منفی است و اثر خطی زمان (با سطح اطمینان ۹۹/۹٪) و غلظت حلال (سطح اطمینان ۹۵٪) و اثر درجه دوم نسبت نمونه به حلال (با سطح اطمینان ۹۹٪) معنی دار و مثبت است و همچنین اثر متقابل قدرت امواج فراصوت و غلظت حلال معنی دار و مثبت است. معادله نهایی مطابق معادله ۳-۴ خواهد بود.

$$Y=52.91+1.69X_1-9.88X_2+4.67X_3+2.52X_4+3.1X_1X_4+3.84X_2^2-4.7X_4^2 \quad \text{معادله ۳-۴}$$

۴-۴-۵- مدل فعالیت آنتی اکسیدانی به ازاء یک میلی گرم فنول (AA/mgTPC)

با توجه به ضرایب این پاسخ در جدول (۴-۴) اثر خطی نسبت نمونه به حلال با سطح اطمینان ۹۹/۹٪ معنی دار و منفی است و اثر درجه دوم نسبت نمونه به حلال مثبت است و همچنین اثر متقابل قدرت امواج فراصوت و غلظت حلال با سطح اطمینان ۹۵٪ معنی دار و مثبت است و معادله به صورت زیر خواهد بود (معادله ۴-۴).

$$Y=3.07-0.053X_1-0.81X_2+0.14X_4+0.27X_2^2+0.21X_1X_4 \quad \text{معادله ۴-۴}$$

۴-۴-۶- مدل فعالیت آنتی اکسیدانی به ازاء یک میلی گرم فلاونوئید (AA/mgTFC)

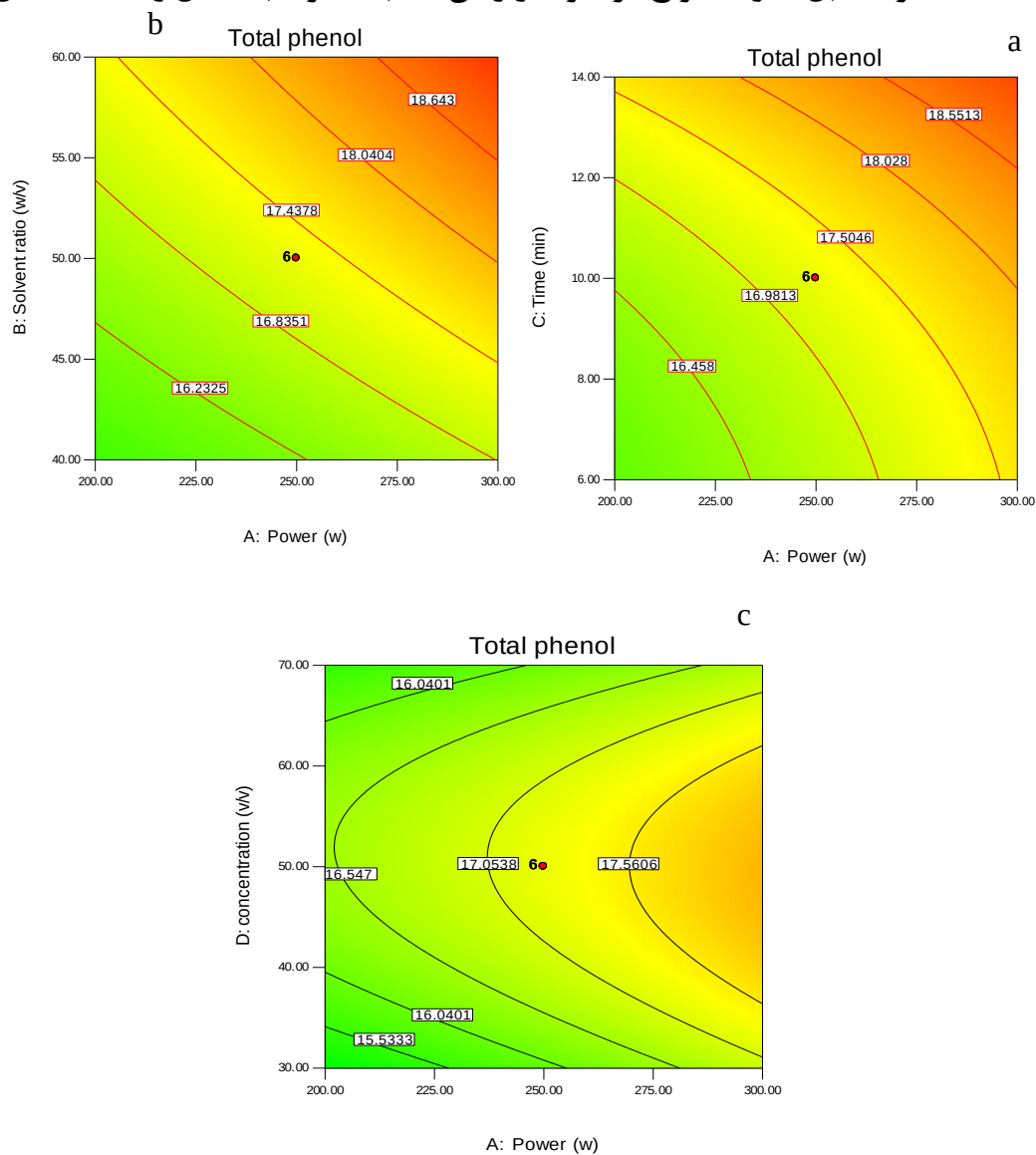
با توجه به ضرایب این پاسخ در جدول (۴-۴) اثر خطی نسبت نمونه به حلال با سطح اطمینان ۹۹/۹٪ معنی دار و منفی است و همچنین اثر درجه دوم نسبت نمونه به حلال (با سطح ۹۹/۹٪) معنی دار و مثبت است و اثر درجه دوم غلظت حلال منفی است و مدل نهایی به صورت زیر خواهد بود (معادله ۴-۵).

$$Y=1.20-0.31X_2+0.11X_2^2-0.077X_4^4 \quad \text{معادله ۴-۵}$$

۴-۴-۷- تجزیه سطوح پاسخ

۴-۴-۷-۱- فنول کل

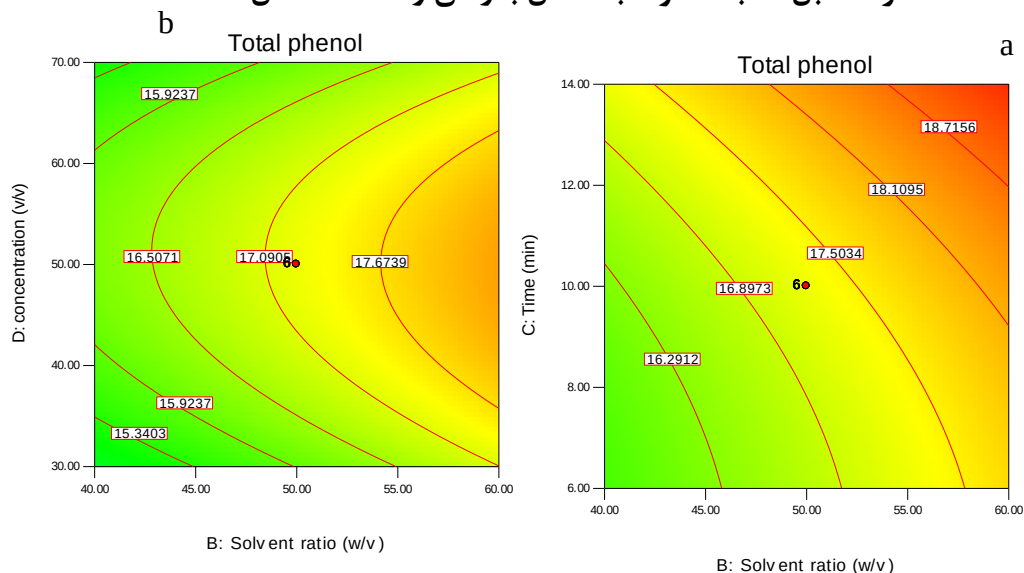
۴-۴-۷-۱-۱- اثر متقابل قدرت امواج فراصوت و زمان، نسبت نمونه به حلال و غلظت حلال



شکل ۴-۶- منحنی تراز اثر متقابل قدرت امواج فراصوت با زمان (a) نسبت نمونه به حلال (b) و غلظت حلال (c) بر روی فنول کل

با توجه به شکل (a,b-۴-۶) با افزایش قدرت امواج فراصوت به همراه نسبت نمونه به حلال و زمان، استخراج ترکیبات فنولیک افزایش پیدا می‌کند. شکل (c-۴-۶) نشان می‌دهد که بیشترین میزان ترکیبات فنولیک در امواج با قدرتهای بالاتر از ۲۷۰ وات و غلظتهای بین ۴۰ تا ۶۰ درصد حاصل شده است.

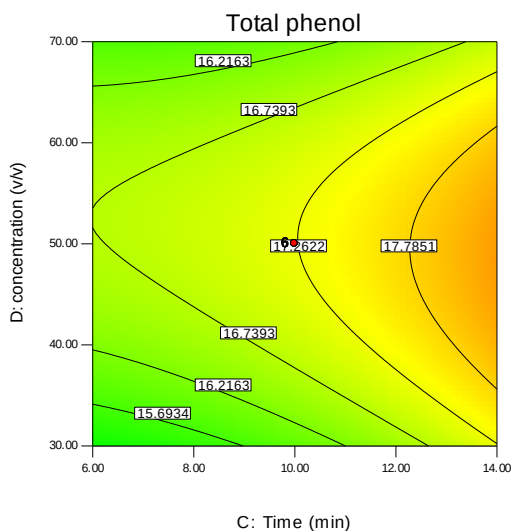
۴-۷-۱-۲- اثر متقابل نسبت نمونه به حلال با زمان و غلظت حلال



شکل ۴-۷-۱-۲- منحنی تراز اثر متقابل نسبت نمونه به حلال زمان (a) و غلظت حلال (b) بر روی فنول کل

با توجه به شکل (a-۴-۷) با افزایش نسبت نمونه به حلال و زمان، استخراج ترکیبات فنولیک بیشتر می‌شود. مطالعات نشان داده است که افزایش زمان استخراج ترکیبات فنولیک با امواج فراصوت باعث می‌شود که حلال مدت زمان بیشتری با نمونه در تماس باشد و در نتیجه راندمان فرایند استخراج افزایش می‌یابد [Hossain, & et al 2012]. با توجه به شکل (b-۴-۷) بیشترین راندمان استخراج در غلظت حلال میانه و نسبت‌های حلال به نمونه بالاتر از ۵۵ به دست آمده است.

۴-۷-۱-۳- اثر متقابل غلظت حلال با زمان

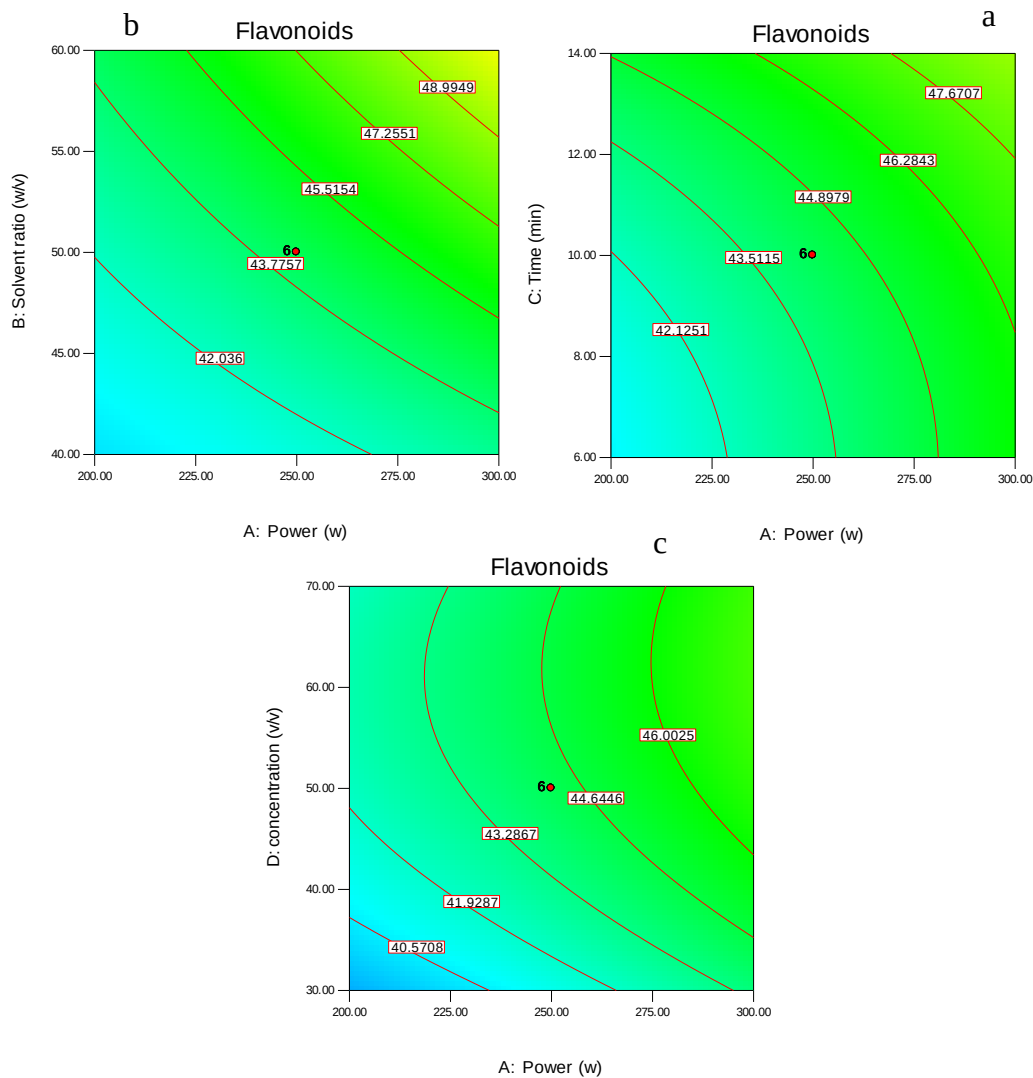


شکل ۴-۸- منحنی تراز اثر متقابل زمان با غلظت حلال بر روی فنول کل

با توجه به شکل (۴-۸) با افزایش زمان مقدار ترکیبات فنولیک استخراج شده افزایش می‌یابد و با افزایش غلظت حلال ابتدا ترکیبات فنولیک استخراج شده بیشتر می‌شود و سپس کاهش می‌یابد و حداکثر مقدار ترکیبات فنولیک استخراج شده در غلظت‌های بین ۴۰-۶۰ درصد و زمان‌های بالاتر از ۱۲ دقیقه است.

۴-۷-۲- فلاونوئید کل

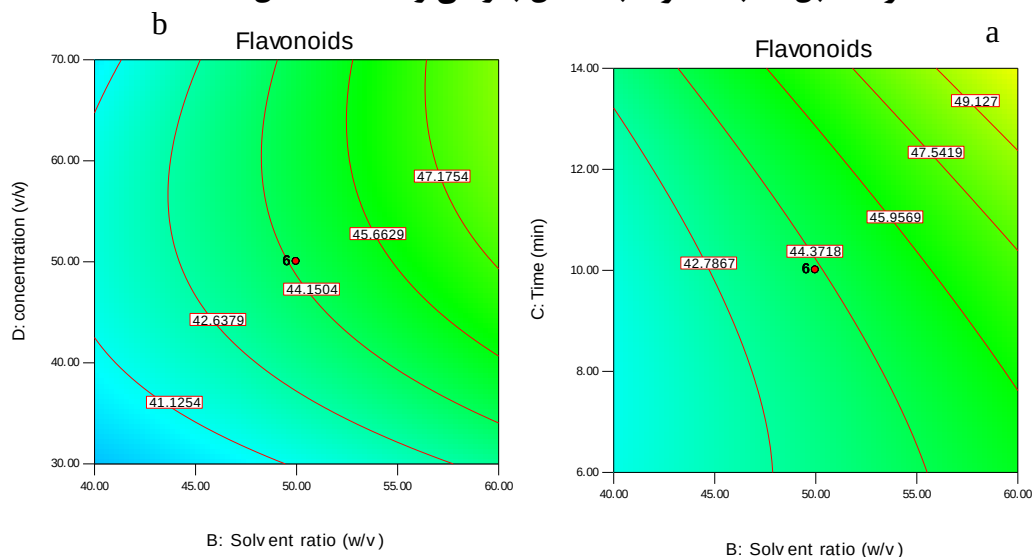
۴-۷-۲-۱- اثر متقابل قدرت امواج فراصوت با زمان، نسبت نمونه به حلال و غلظت حلال



شکل ۴-۹- منحنی تراز اثر متقابل قدرت امواج فراصوت با زمان (a) نسبت نمونه به حلال (b) و غلظت حلال (c) بر روی فلاونوئید

با توجه به شکل (a,b,c-۹-۴) با افزایش قدرت امواج فراصوت با زمان، نسبت نمونه به حلال و غلظت حلال مقدار ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده نیز بیشتر می‌شود و حداکثر مقدار ترکیبات فلاونوئیدی در بیشترین مقدار از هر متغیر به دست می‌آید.

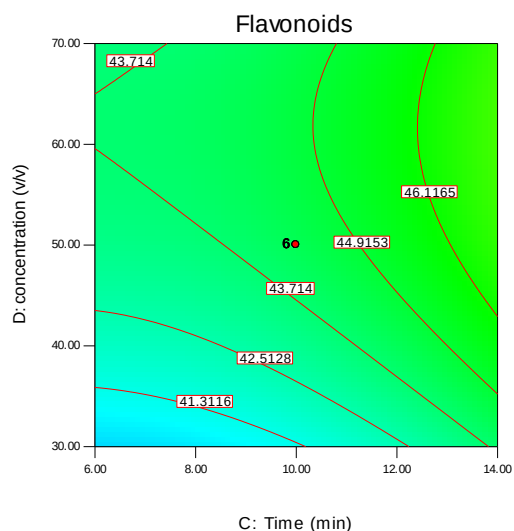
۴-۴-۷-۲- اثر متقابل نسبت نمونه به حلال با زمان و غلظت حلال



شکل ۴-۱۰- منحنی تراز اثر متقابل نسبت نمونه به حلال با زمان (a) و غلظت حلال (b) بر روی فلاونوئید

همانطور که در شکل (۴-۱۰-a,b) مشاهده می شود با افزایش نسبت نمونه به حلال، زمان استخراج و غلظت حلال مقدار ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره افزایش می یابد.

۴-۴-۷-۳- اثر متقابل غلظت حلال با زمان

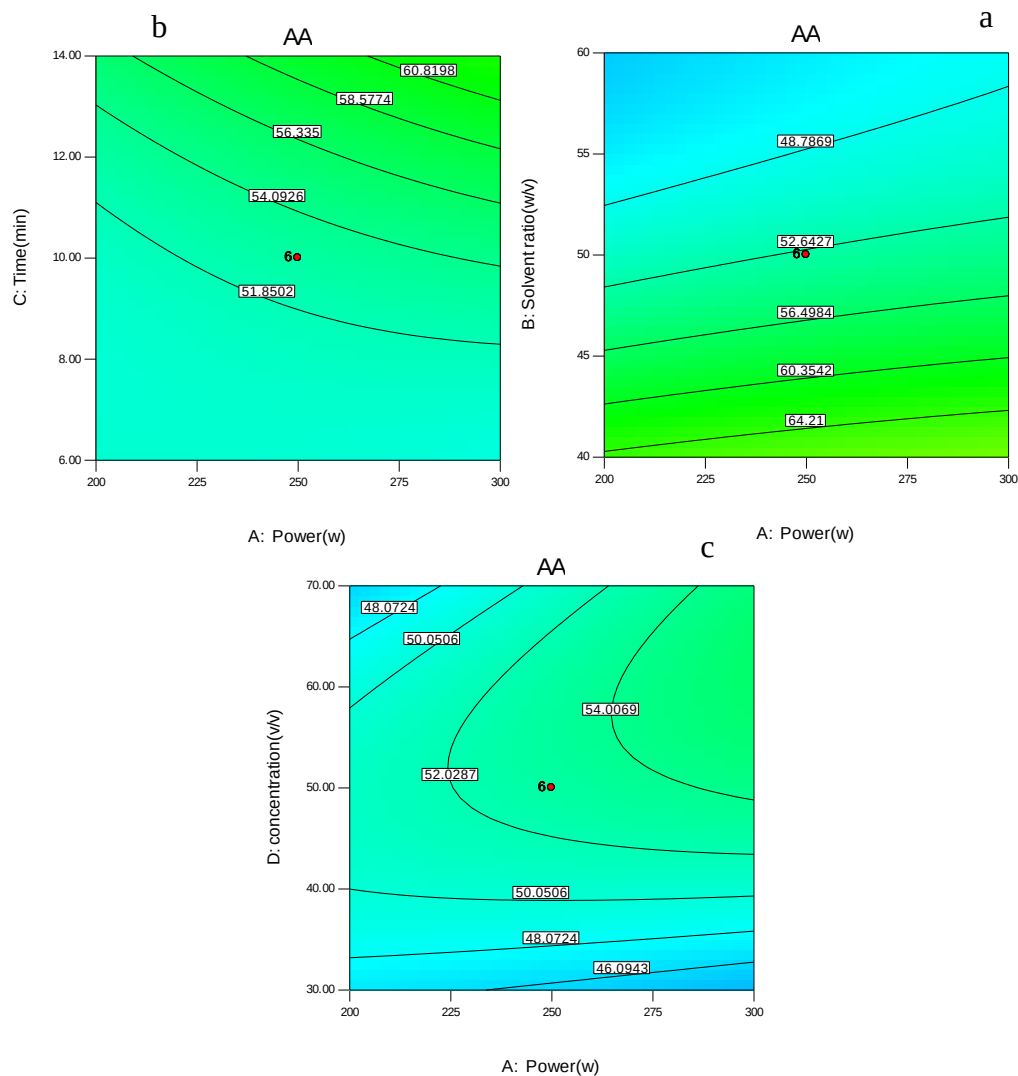


شکل ۴-۱۱- منحنی تراز اثر متقابل غلظت حلال با زمان بر روی فلاونوئید

شکل (۴-۱۱) بیانگر این است که در یک زمان ثابت با افزایش غلظت حلال ترکیبات فلاونوئیدی افزایش یافته و سپس در غلظت‌های بالاتر از ۶۰ درصد مقدار ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده کم می‌شود.

۴-۷-۳- فعالیت آنتی اکسیدانی

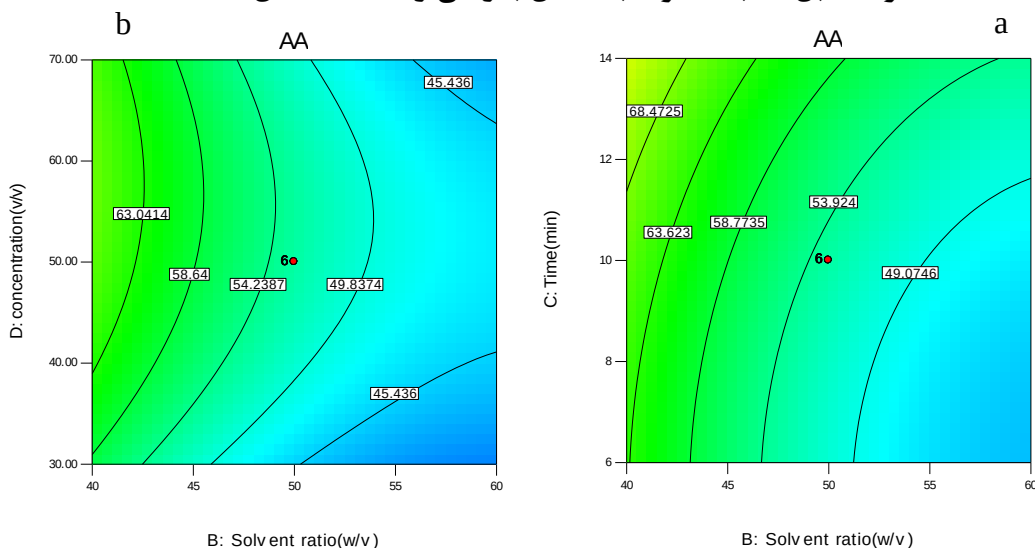
۴-۷-۳-۱- اثر متقابل قدرت امواج فراصوت با نسبت نمونه به حلال، زمان و غلظت حلال



شکل (۴-۱۲) منحنی تراز اثر متقابل قدرت امواج با نسبت نمونه به حلال (a)، زمان (b) و غلظت حلال (c) بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی

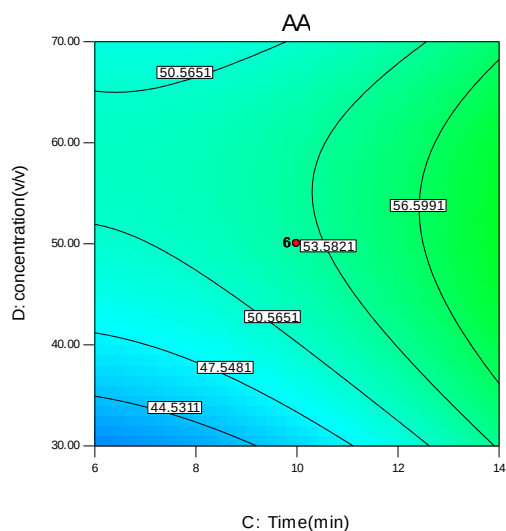
شکل (۴-۱۲) اثر متقابل قدرت امواج فراصوت نسبت نمونه به حلال، زمان و غلظت حلال را نشان می‌دهد همانطور که در شکل (۴-۱۲-a) دیده می‌شود قدرت امواج فراصوت تأثیری بر روی افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی اثر ناچیزی دارد و در شکل (۴-۱۲-b) نیز دیده می‌شود که اثر قدرت امواج فراصوت بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی ابتدا ناچیز است و سپس از زمان ۱۲ دقیقه به بعد افزایش می‌یابد. و شکل (۴-۱۲-c) بیانگر این موضوع است که با افزایش قدرت امواج فراصوت فعالیت آنتی اکسیدانی زیاد می‌شود و حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی در قدرت ۲۷۵-۳۰۰ وات و غلظت ۵۰-۶۰ درصد به دست می‌آید.

۴-۴-۷-۳-۲- اثر متقابل نسبت نمونه به حلال با زمان و غلظت حلال



شکل (۴-۱۳)- منحنی تراز اثر متقابل نسبت نمونه به حلال با زمان (a) و غلظت حلال (b) بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی با توجه به شکل (۴-۱۳-a,b) نسبت نمونه به حلال با فعالیت آنتی اکسیدانی رابطه عکس دارد و به عبارت دیگر با کاهش نسبت نمونه به حلال درصد فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش می‌یابد و با افزایش غلظت حلال و زمان استخراج فعالیت آنتی اکسیدانی زیاد می‌شود.

۴-۴-۷-۳- اثر متقابل غلظت حلال با زمان

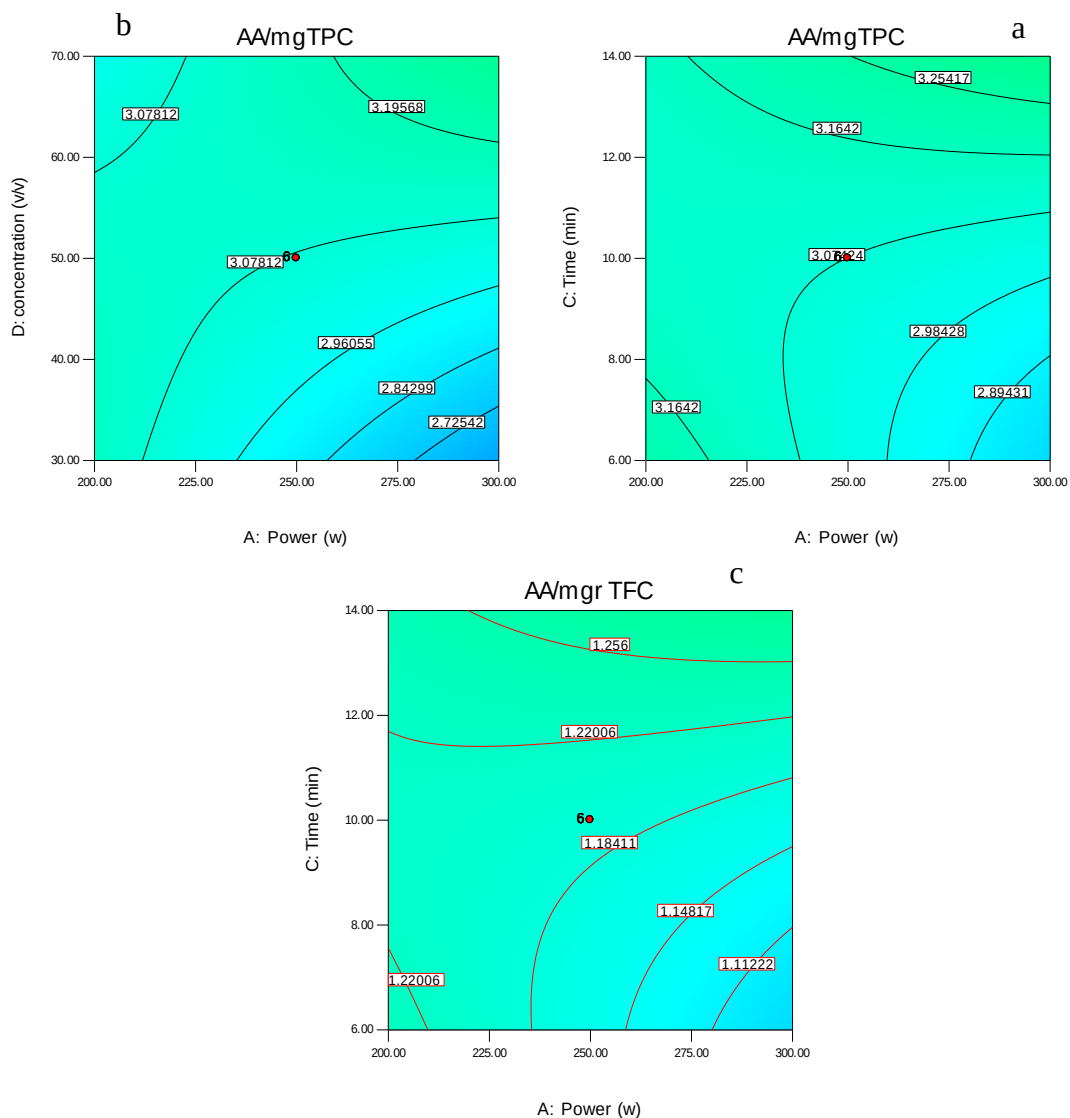


شکل ۴-۱۴- منحنی تراز اثر متقابل غلظت حلال با زمان بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی

با توجه به شکل (۴-۱۴) با افزایش زمان فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش یافته اما با افزایش غلظت حلال فعالیت آنتی اکسیدانی ابتدا افزایش می‌یابد و سپس کم می‌شود و بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در زمان‌های بین ۱۲-۱۴ دقیقه و غلظت‌های ۵۰-۶۰ درصد حاصل می‌شود.

۴-۷-۴-۴- فعالیت آنتی اکسیدانی به ازاء یک میلی گرم فنول و فلاونوئید (AA/mgTPC) و (AA/mgTFC)

۴-۷-۴-۱- اثر متقابل قدرت امواج فراصوت، زمان و غلظت حلال

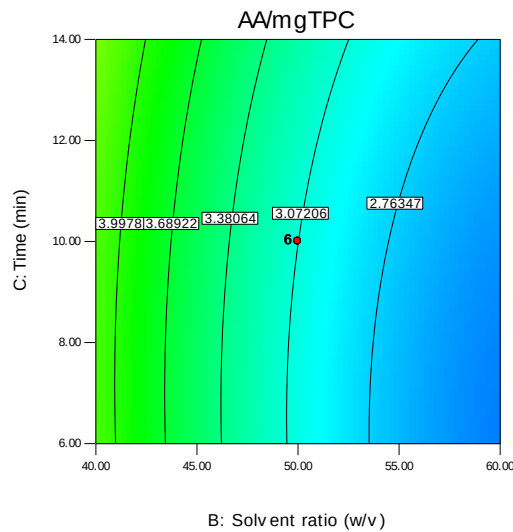


شکل ۴-۱۵- منحنی تراز اثر متقابل قدرت امواج فراصوت با زمان (a) و غلظت حلال (b), بر روی AA/mgTPC و منحنی تراز اثر متقابل قدرت با زمان (c) بر روی AA/mgTFC

با توجه به شکل (۴-۱۵, a,b) قدرت امواج فراصوت، زمان استخراج و غلظت حلال اثر چندانی بر روی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به ازاء یک میلی گرم فنول کل (AA/mgTPC) نداشته است. با توجه به

شکل (۴-۱۵-C) در مورد فعالیت آنتی اکسیدانی به ازاء یکی میلی گرم از ترکیبات فلاونوئیدی (AA/mgTFC) نیز می‌توان به این نتیجه رسید که قدرت امواج فراصوت و زمان اثر کمی بر پاسخ داشته است.

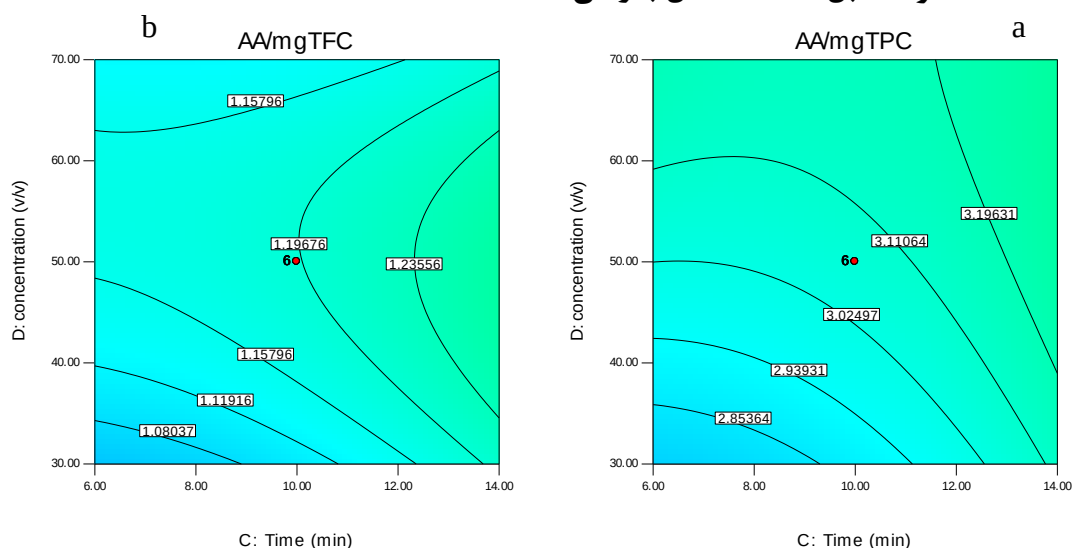
۴-۴-۷-۲- اثر متقابل نسبت نمونه به حلال با زمان



شکل ۴-۱۶- منحنی تراز اثر متقابل نسبت نمونه به حلال با زمان بر روی AA/mgTPC

با توجه به شکل (۴-۱۶) می‌توان نتیجه گرفت که عامل اصلی در افزایش AA/mgTPC نسبت نمونه به حلال است و زمان استخراج تقریباً بی‌تأثیر است. بیشترین میزان AA/mgTPC در نسبت‌های حلال به نمونه کمتر از ۵۰ حاصل شده است. نتیجه حاصل شده به این دلیل است که در نسبت‌های حلال به نمونه کمتر احتمالاً ترکیبات با گروه‌های هیدروکسیل بیشتر یا اینکه ترکیبات فنولیک کوچکتر استخراج شده‌اند. از این نتیجه می‌توان اینگونه برداشت کرد که به منظور استخراج ترکیبات فنولیک با خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتر استفاده از نسبت‌های حلال به نمونه زیاد مناسب نیست.

۴-۴-۳- اثر متقابل غلظت حلال با زمان



شکل ۴-۱۷- منحنی تراز اثر متقابل زمان با غلظت حلال بر روی AA/mgTPC (a) و AA/mgTFC (b)

با توجه به شکل (۴-۱۷-a و b) می‌توان گفت که زمان و غلظت حلال تقریباً رابطه مستقیمی با AA/mgTFC و AA/mgTPC دارند و افزایش در هر دو متغیر باعث افزایش این پاسخ شده است. البته با توجه به شکل‌ها اثر این متغیرها کم است.

۴-۴-۸- تعیین شرایط بهینه و آزمون اعتبار سنجی

پس از تعیین شرایط بهینه با بهترین مدل پیشنهاد شده توسط نرم افزار، به منظور تایید ظرفیت پیش بینی مدل آزمون اعتبار سنجی انجام گرفت. که شرایط آزمایش و مقادیر پیش بینی شده و واقعی هر پاسخ در جدول (۴-۵) آمده است. با توجه به مقادیر پیش بینی شده و واقعی با سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌توان گفت که مقادیر پیش بینی شده برای پاسخ‌ها، با مقدار اندازه‌گیری شده در شرایط واقعی مطابقت دارد در نتیجه درستی مدل‌ها تأیید می‌شود.

جدول ۴-۵- شرایط آزمون بهینه و نتایج آزمون اعتبارسنجی

پاسخ ها	متغیرها	واقعی	پیش بینی شده
قدرت امواج	نسبت	زمان	غلظت
فراصوت	نمونه به	(دقیقه)	حلال
(وات)	حلال		(v/v%)
	(v/w)		
۳۰۰	۴۰/۱	۱۴	۶۰
۱۶/۵۹±۰/۱۸	۱۷/۶۶		
۳۰۰	۴۰/۱	۱۴	۶۰
۴۴/۵۳	۴۴/۸۱±۰/۷۹		
۳۰۰	۴۰/۱	۱۴	۶۰
۷۸/۰۳	۸۰±۰/۳۹		
۳۰۰	۴۰/۱	۱۴	۶۰
۴/۴۸	۴/۸۲		
۳۰۰	۴۰/۱	۱۴	۶۰
۱/۷۵	۱/۷۸		

۴-۵- اندازه گیری خواص آنتی اکسیدانی عصاره در شرایط بهینه

۴-۵-۱- اندازه گیری خاصیت احیاءکنندگی آهن

خاصیت احیاءکنندگی آهن معیار خوبی برای تعیین پتانسیل آنتی اکسیدانی است [Yildirim et al.,

2000]. احیاءکنندگی فلزات سنگین به این منظور مورد ارزیابی قرار می‌گیرد چون عمده فعالیت آنتی

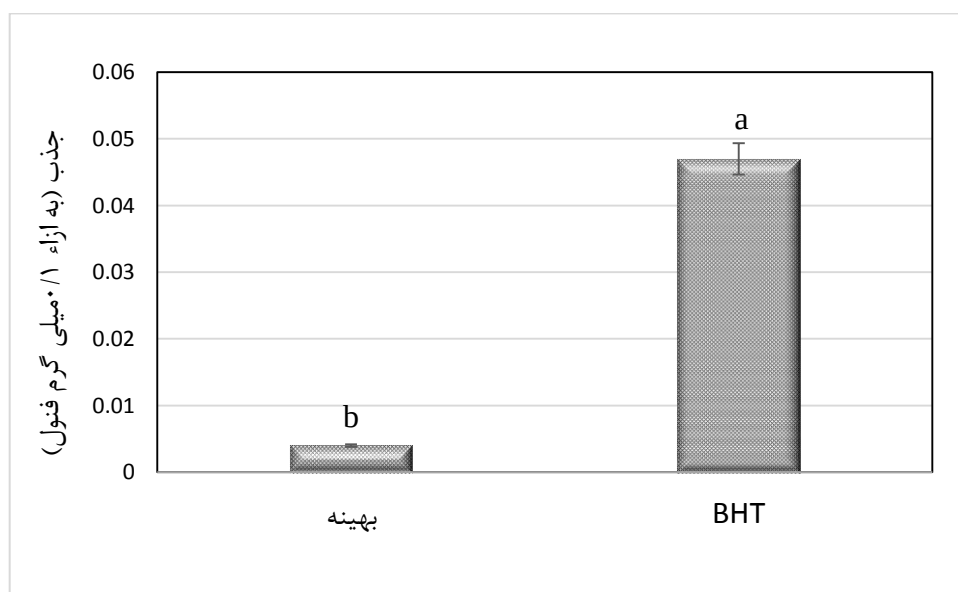
اکسیدانی ترکیبات فنولیک مربوط به ویژگی‌های اکسایش/کاهش آن‌ها است که به این ترکیبات اجازه

می‌دهد به عنوان یک عامل احیاءکننده، دهنده هیدروژن و فروشاننده اکسیژن عمل کنند

[Ramarathnam et al., 1997; Singh et al., 2007]. به طور کلی خواص احیاءکنندگی مربوط به وجود

ترکیباتی است که عمل خود را با شکستن رادیکال و با دادن هیدروژن نشان می‌دهند [Kubola and

[Siriamornpun, 2008]. با توجه به نتایج آورده شده در شکل (۴-۱۸) خاصیت احیاءکنندگی آنتی اکسیدان BHT به طور معنی داری (با سطح اطمینان ٪ ۹۵) بیشتر از عصاره در شرایط بهینه است. خاصیت احیاءکنندگی آهن در گیاهان مختلف متفاوت است که دلیل آن تنوع در گونه‌های گیاهی و همچنین تفاوت در منطقه رویش گیاه است [Razali et al., 2012].



شکل ۴-۱۸- خاصیت احیاء کنندگی آهن

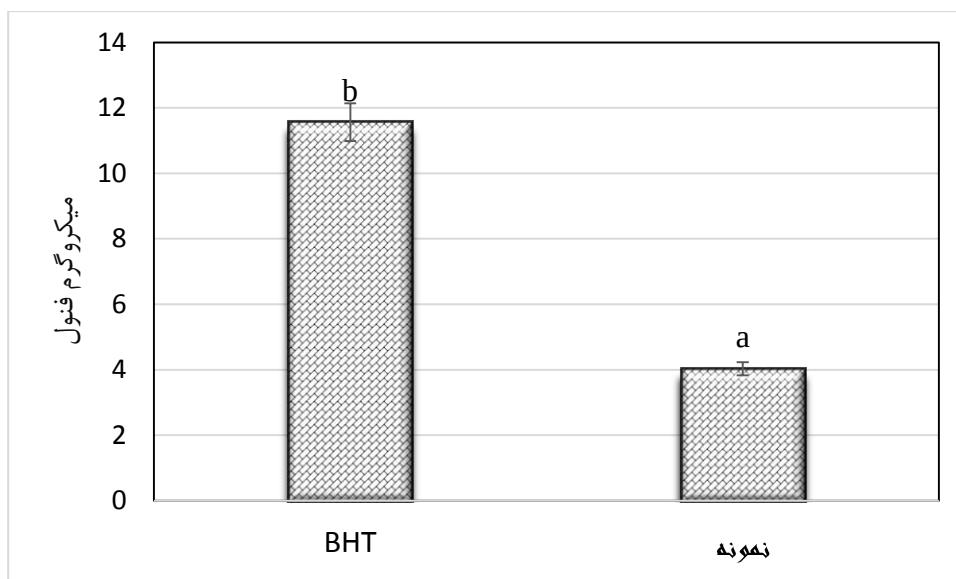
۴-۵-۲- اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

این روش بر اساس احیاء مولیبدن (VI) به مولیبدن (V) است که در نتیجه آن در pH پایین کمپلکس رنگی فسفات مولیبدن (V) ایجاد می‌شود. این روش یک روش کمی است چون نتایج آن براساس میلی گرم BHT یا اسید اسکوربیک بیان می‌شود [Prieto et al., 1999; kubola and Siriamornpun., 2008]. طبق آزمایشات انجام شده ظرفیت آنتی اکسیدانی کل به ازاء یک گرم از نمونه سنبله زیبا معادل با ۱۴/۶۱ میلی گرم آنتی اکسیدان سنتزی BHT بود.

۴-۵-۳- اندازه گیری IC_{50}

IC_{50} غلظتی از عصاره است که باعث کاهش ۵۰ درصدی غلظت رادیکال آزاد می‌شود. با توجه به شکل (۴-۱۹) مقدار IC_{50} برای عصاره بهینه و آنتی اکسیدان BHT به ترتیب برابر با ۴/۰۳ و ۱۱/۵۶ میکروگرم است. برای کاهش ۵۰ درصد از غلظت رادیکال آزاد به طور معنی داری (با سطح اطمینان ۹۵٪) مقدار کمتری از ترکیبات فنولیکی موجود در سنبله زیبا نسبت به آنتی اکسیدان سنتزی BHT مورد نیاز است. این نتیجه نشان می‌دهد که نوع ترکیب فنولیک بیشتر از مقدار آن در فعالیت آنتی اکسیدانی نقش دارد. این نتایج با نتایج کارهای دیگران از جمله راباباه و همکاران (۲۰۰۴) و شهیدی و نازاک (۲۰۰۴) مطابقت دارد. این محققین گزارش کرده‌اند که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های گیاهی می‌تواند تحت تاثیر ساختارهای متفاوت اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها و همچنین مشتقات این ترکیبات باشد. به عنوان مثال، فعالیت آنتی اکسیدانی اسیدهای فنولیک و مشتقات آن همانند استرها، وابسته به تعداد گروه‌های هیدروکسیل در مولکول است [Rababah et al., 2004; Shahidi and Naczki, 2004].

نمودارهای مربوط به BHT و عصاره در شکل ۵-۳ و شکل ۴-۵ آورده شده است.



شکل ۴-۱۹- مقدار IC_{50}

۴-۶- شناسایی ترکیبات فنولیک با کروماتوگرافی مایع - طیف سنج جرمی

ترکیبات شناسایی شده با کروماتوگرافی مایع-طیف سنج جرمی در سنبه زیبا در جدول (۴-۷) آورده شده است. در جدول ۴-۸ ستون $[M-H]^-$ مربوط به وزن m/z ترکیبات فنولیک در آشکار ساز اول است و ستون MS-MS مربوط به شکست این ترکیبات در آشکارساز جرمی دوم است. لازم به ذکر است که به منظور شناسایی ترکیبات فنولیک عصاره سنبه زیبا وزن مولکولی هر یک از ترکیبات و وزن شکست‌هایی که در آشکار ساز جرمی ایجاد شد با استفاده از مقالات مختلف و ایجاد کتابخانه برای آشکار ساز جرمی صورت گرفت.

جدول ۴-۷- ترکیبات فنولیک شناسایی شده با کروماتوگرافی مایع- طیف سنج جرمی

منبع	MS-MS ion	$[M-H]^-$ M/Z	زمان بازدارندگی (دقیقه)	نام ترکیب	
[Suárez et al., 2008]	۱۳۶٫۹۲	۱۵۱	۰٫۶۴۸	Vanillin	۱
[Sapozhnikova, 2014]	۲۳۸٫۸ ، ۲۱۰٫۹	۲۶۷	۰٫۷۱۹	Coumestrol	۲
[Sapozhnikova, 2014]	۱۵۰٫۷ ، ۱۳۴٫۹	۲۶۸٫۸	۰٫۸۶۲	Eriodictyol	۳
[Sapozhnikova, 2014]	۱۵۰٫۸ ، ۱۱۹	۲۷۰٫۸	۰٫۹۳۳	Naringenin	۴
[Simirgiotis et al., 2013]	۳۳۱ ، ۱۶۹	۴۵۷	۱٫۰۰۵	Epigallocatechin gallat	۵
[Sapozhnikova, 2014]	۱۲۴٫۹ ، ۱۰۶٫۸	۱۶۸٫۷	۱٫۱۴۸	Gallic Acid	۶
[Sapozhnikova, 2014]	۲۴۰٫۹ ، ۲۰۰٫۷	۲۶۸٫۸	۱٫۳۶۲	Pelargonidin	۷
[Sapozhnikova, 2014]	۲۶۷٫۸ ، ۲۳۸٫۸	۲۸۲٫۹	۱٫۵۰۵	Biochanin	۸
[Simirgiotis et al., 2013]	۱۷۹	۴۳۳	۱٫۶۷۴	Quercetin-3-O-ribose	۹
[Jaiswal et al., 2014]	۳۵۳	۵۱۵	۱٫۷۱۹	3,5-dicaffeoyl quinic Acid	۱۰
[Sapozhnikova, 2014]	۲۹۹٫۸ ، ۲۷۰٫۹	۶۰۹	۲٫۰۰۵	Rutin	۱۱
[Sapozhnikova, 2014]	۱۶۳٫۹ ، ۱۵۰٫۹	۳۰۰٫۸	۲٫۲۱۹	Hesperetin	۱۲

[Sapozhnikova, 2014]	123/1.107/8	166/6	2/50.5	Vanillic Acid	13
[Dou et al., 2007]	293	577	3/790	Rhamnosylvitexin	14
[Sapozhnikova, 2014]	159.132/9	268/6	3/861	Genistin	15
[Khoo, et al., 2012]	285	417	3/939	Cyaniding-3-O-arabinoside	16
[Sapozhnikova, 2014]	174/9	284/9	4/004	Cyanidin	17
[Suárez et al., 2008]	229.185	365	4/147	Oleuropein derivate	18
[Suárez et al., 2008]	106	137	4/504	Tyrosol	19
[Dou et al., 2007]	191.169	343	4/576	5-galloylquinic Acid	20
[Sapozhnikova, 2014]	150/9.132/9	285	4/861	Luteolin	21
[Sapozhnikova, 2014]	178/9.150/8	316	5/361	Myricetine	22
[Lin et al., 2010]	223.191	387	5/861	5-Sinapoylquinic Acid	23
[Sapozhnikova, 2014]	256/7.190/8	300/9	6/432	Delphinidin	24
[Sapozhnikova, 2014]	134/9.107/2	178/8	6/504	Caffeic Acid	25
[Sapozhnikova, 2014]	254.108/9	288/8	7/004	Epicatechin	26
[Lin et al., 2010]	256	447	7/147	Luteolin-7-O-glucoside	27
[Jaiswal et al., 2014]	301.271	433	7/575	Quercetin-3-O- α -arabinoside	28
[Sapozhnikova, 2014]	252/9.106	301	8/218	Entrodiol	29
[Khoo, et al., 2012]	-	505	8/289	Hirsutidin-3-O-glucoside	30
[Torras-Claveria et al., 2007]	179.135	373	8/361	Rosmarinic acidmethylester	31
[Flamini., 2013]	125	183	8/575	Methyl gallat	32
[Jaiswal et al., 2014]	175	609	8/718	Luteolin-7-O-(6-O-glucosyl-glucoside)	33
[Sapozhnikova, 2014]	161	341	8/861	Caffeic Acid-4-	34

2014]				glucoside	
[Sapozhnikova, 2014]	۲۳۹/۹، ۱۹۶/۹	۲۵۴/۹	۹/۰۰۴	Petrosilbene	۳۵
[Wojdyło et al., 2014]	۱۳۶	۳۳۷	۹/۴۳۲	<i>p</i> -coumaroyl quinic acid derivatives	۳۶
[Jaiswal et al., 2014]	۱۹۱	۳۶۷	۹/۸۶۱	5-O-Feruloyl quinic Acid	۳۷
[Sapozhnikova, 2014]	۱۲۰/۹، ۱۱۹/۱	۲۴۰/۸	۹/۹۳۲	Equol	۳۸
[Simirgiotis et al., 2013]	۴۸۱، ۳۰۱	۸۱۵	۱۰/۰۷۵	Furosinin	۳۹
[Suárez et al., 2008]	۱۵۱، ۱۳۶	۳۵۷	۱۰/۲۸۹	Pinoresinol	۴۰
[Wojdyło et al., 2014]	۴۶۳	۶۰۹	۱۱/۱۴۶	Quercetin glucoside acylated by <i>p</i> -coumaric acid	۴۱
[Flamini., 2013]	۲۲۷	۳۸۹	۱۱/۲۸۹	Cis-resveratrol-3-O-glucoside	۴۲
[Jaiswal et al., 2014]	۲۲۵	۵۶۳	۱۱/۷۱۷	Apigenin-7-O-6-O-pentosyl hexoside	۴۳
[Sapozhnikova, 2014]	۲۵۱/۷، ۲۲۲/۸	۲۶۶/۸	۱۳/۶۴۶	Formonetin	۴۴
[Torras-Claveria et al., 2007]	۱۰۹	۱۵۳	۱۹/۷۱۶	Protocatechuic Acid	۴۵

نتایج جدول (۴-۷) نشان می‌دهد که در گیاه سنبله زیبا ۴۵ ترکیب فنولیک مختلف وجود دارد. از بین این ۴۵ ترکیب یکسری از ترکیبات غالب تر بودند که می‌توان به سیانیدین، روتین، دلفینیدین و فرمنتین اشاره کرد.

۴-۷- نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که استخراج ترکیبات فنولیک به کمک امواج فراصوت نسبت به روش غرقابی راندمان بیشتری داشت و بهترین حلال در استخراج ترکیبات فنولیک متانول/آب ۲۰/۸۰

بود و شرایط بهینه برای استخراج ترکیبات فنولیک از سنبله زیبا به ترتیب برابر با قدرت ۳۰۰ وات، نسبت نمونه به حلال ۱ به ۴۰، زمان ۱۴ دقیقه و غلظت ٪ ۶۰ بود. مقادیر فنول کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی اکسیدانی، AA/mgTFC و AA/mgTPC در شرایط بهینه به ترتیب برابر با $16/59 \pm 0/18$ (میلی گرم معادل میلی گرم اسید گالیک/یک گرم نمونه خشک)، $44/81 \pm 0/79$ (میلی گرم معادل میلی گرم کوئرستین/یک گرم نمونه خشک)، $80 \pm 0/39$ ٪ و ٪ ۴/۸۲ و ٪ ۱/۷۸ بود. مقادیر پیش بینی شده پاسخها توسط مدل درجه دوم و مقادیر به دست آمده از آزمایش در شرایط بهینه با سطح اطمینان ٪ ۹۵ مشابه بودند. خاصیت احیاء کنندگی آهن برای آنتی اکسیدان BHT بیشتر از عصاره بود و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل برابر با ۱۴/۶۱ میلی گرم BHT بود و همچنین نتایج نشان داد که مقدار IC_{50} برای عصاره کمتر از آنتی اکسیدانی BHT است و در نهایت ۴۵ ترکیب فنولیک در گیاه سنبله زیبا شناسایی گردید.

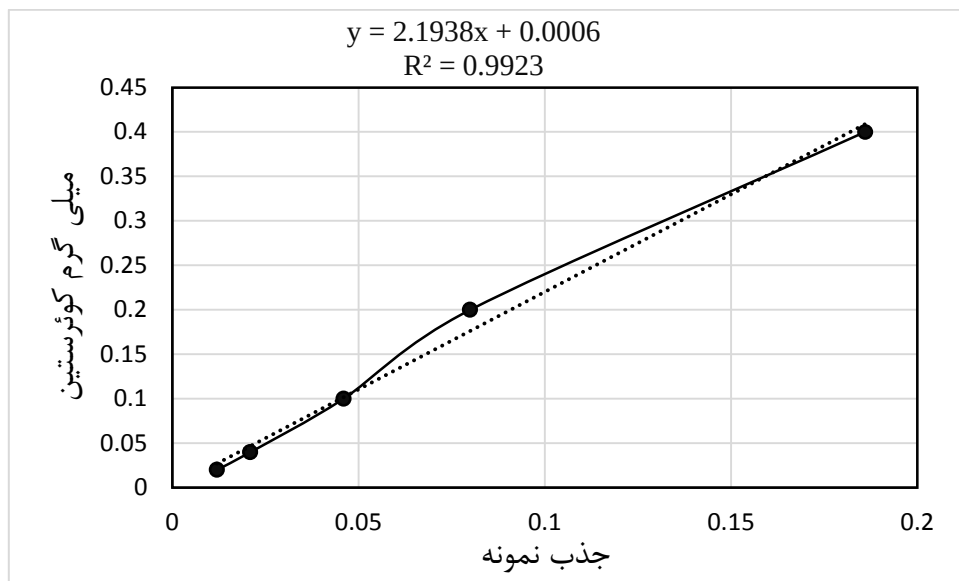
۴-۸- پیشنهادات

- ۱- بررسی میزان فعالیت ضد میکروبی عصاره سنبله زیبا (قسمت‌های هوایی).
- ۲- میزان پایداری ترکیبات فنولیک عصاره سنبله زیبا در مواد غذایی مختلف و همچنین در فرایندهای مختلف مانند سرخ کردن، فرایندهای حرارتی مانند استریلیزاسیون، پاستوریزاسیون و غیره بررسی گردد.
- ۳- برهم کنش ترکیبات فنولیک گیاه سنبله زیبا با اجزای مختلف مواد غذایی از جمله پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها بررسی شود.

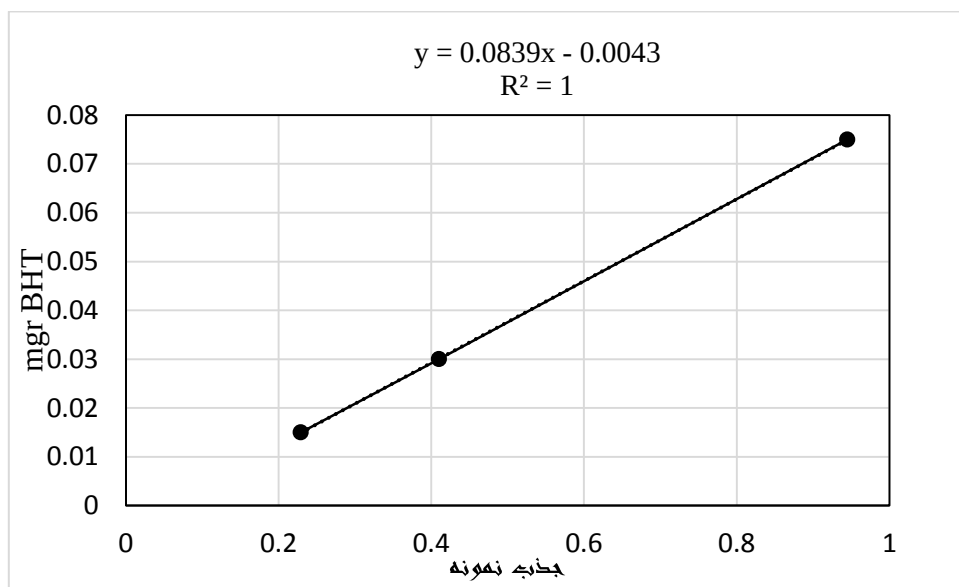
۴- تعیین مقدار ترکیبات فنولیک موجود در گیاه سنبله زیبا

فصل پنجم

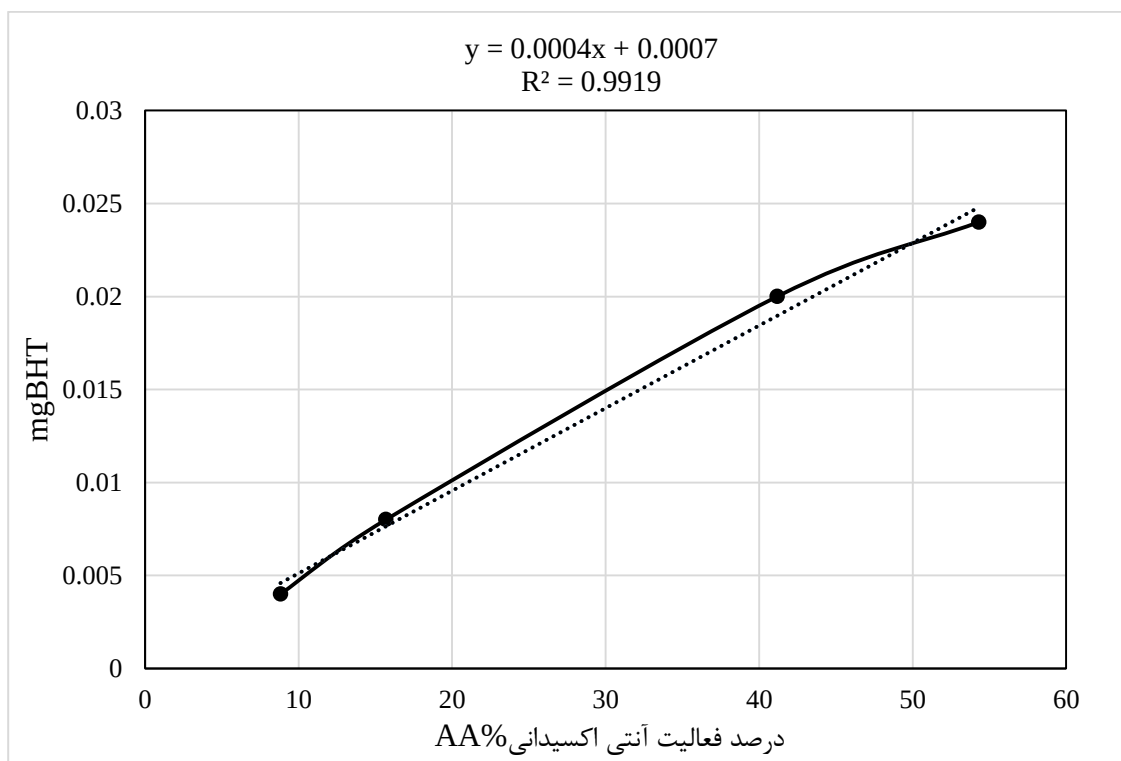
ضمائم



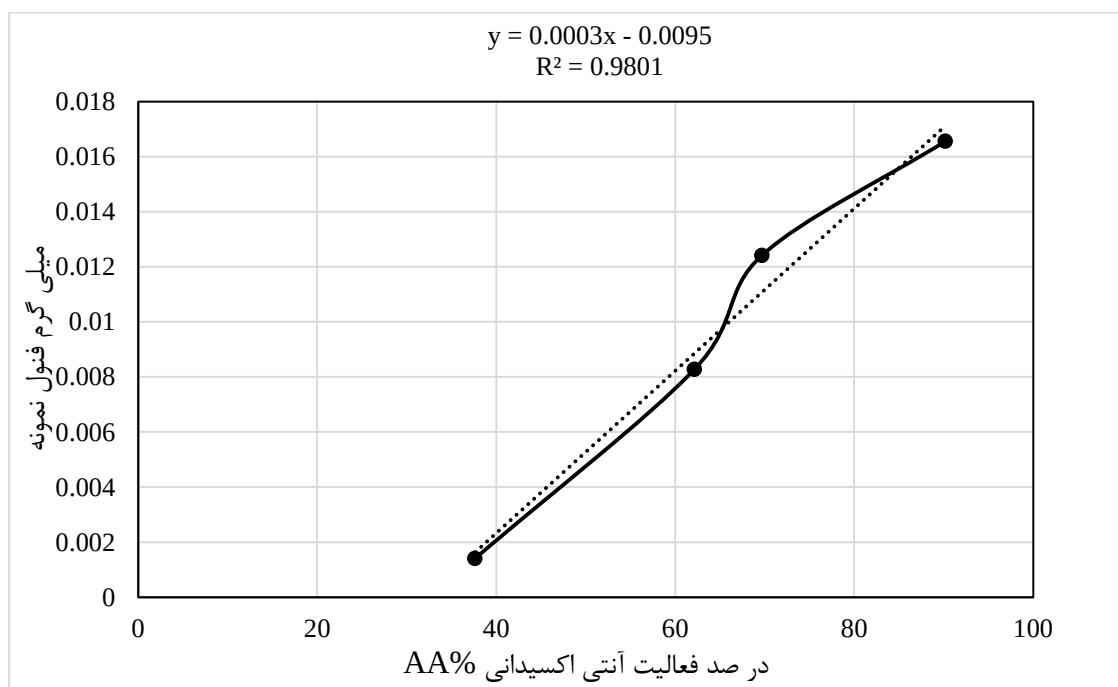
شکل ۵-۱- استاندارد فلاونوئید کل بر اساس کوئرسٹین



شکل ۵-۲- استاندارد ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بر اساس BHT



شکل ۵-۳- IC₅₀ آنتی اکسیدان BHT



شکل ۵-۴- IC₅₀ نمونه

- Aghaei Y. Mirjalili M. H. and Nazeri V. (2013) "Chemical Diversity among the Essential Oils of Wild Populations of *Stachys lavandulifolia* Vahl (Lamiaceae) from Iran" **J. of Chemistry & Biodiversity**., 10, pp 262-273.
- Akon C.C. and Min D. B. (2008) "*Food lipid: chemistry, nutrition, and biotechnology*", Third edition, CRC Press Taylor & Francis Group, pp 229-309, 410-428.
- Alakolanga A. G. A. W. Siriwardane, A. M. D. A. Savitri Kumar N. Jayasinghe L. Jaiswal R. and Kuhnert N. (2014) "LC-MSⁿ identification and characterization of the phenolic compounds from the fruits of *Flacourtia indica* (Burm. F.) Merr. and *Flacourtia inermis* Roxb" **J. of Food Research International**., 62, pp 388-396.
- Alberti A. Zielinski A. A. F. Zardo D. M. Demiate I. M. Nogueira A. and Mafra L. I. (2014) "Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology" **J. of Food Chemistry**., 149, pp 151-158.
- Al-Farsi A. M. and Lee, Y., C. (2008) "Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds" **J. of Food Chemistry**., 108, pp 977-985.
- Ardestani A. and Yazdanparast R. (2007) "Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts" **J. of Food Chemistry**., 104, pp 21-29.
- Awad T. S. Moharram H.A. Shaltout O.E. Asker D. and Youssef, M. M. (2012) "Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review" **J. of Food Research International**., 48, pp 410-427.
- Balachandran S. Kentish S. E. Mawson R. and Ashokkumar M. (2006) "Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger" **J. of Ultrasonics Sonochemistry**., 13, pp 471-479.
- Bas D. and Boyanci IH. (2007) "Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology", **J. of food Engineering**., 78, pp 836-845.
- Carrera C. Ruiz-Rodríguez A. Palma M. and Barroso C. G. (2012) "Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes" **J. of Analytica Chimica Acta**., 732, pp 100-104.
- Chandrapala J. Oliver C. Kentish S. and Ashokkumar M. (2012) "Ultrasonics in food processing" **J. of Ultrasonics Sonochemistry**., 19, pp 975-983.
- Chemat F. Zill E. H. and Khan M. K. (2011) "Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction" **J. of Ultrasonics Sonochemistry**. 18, pp 813-835.
- Chen F. Cai T. Zhao G. Liao X. Guo L. and Ltu X. (2005). "Optimizing conditions for the purification of crude octacosanol extraction from rice bran wax by molecular distillation analyzed using response surface methodology" **J. of Food Engineering**., 70, pp 47-53.

- Cheok C.Y. Chin N. L. Yusof Y.A. Talib R. A. and Law C. L. (2013) "Optimization of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) extractions from mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) hull using ultrasonic treatments" **J. of Industrial Crops and Products.**, 50, pp 1-7.
- Cho Y. J. Hong J. Y. Chun H. S. Lee S. K. and Min H. Y. (2006) "Ultrasonication-assisted Extraction of Resveratrol from Grapes" **J. of Food Engineering.**, 77, pp 725-730.
- Chua S. C. Tan C. P. Mirhosseini H. Lai O. M. Long K. and Baharin B. S. (2009) "Optimization of ultrasound extraction condition of phospholipids from palm-pressed fiber". **J. of Food Engineering.**, 92, pp 403-409.
- Da Porto C. Porretto E. and Decorti D. (2013) "Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds" **J. of Ultrasonics Sonochemistry.**, 20, pp 1076-1080.
- Dasgupta N. and De B. (2004) "Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract in vitro" **J. of Food Chemistry** ., 88, pp 219-224.
- Delazar A. Delnavazi M. R. Nahar L. Moghadam S. B. Mojarab M. Gupta A. Williams A. S. Rahman M. M. and Sarker S. D. (2013) "Lavandulifolioside B: a new phenylethanoid glycoside from the aerial parts of *Stachys lavandulifolia* Vahl" **J. of Natural Product Research.**, 25, pp 8-16.
- Demian J. M. (1999) "**Principles of Food Chemistry**". Third Edition, Aspen Publishers Inc, pp 63
- Dou J. Lee V. S. Y. Tezen J. T. C. and Lee M. R. (2007) "Identification and Comparison of Phenolic Compounds in the Preparation of Oolong Tea Manufactured by Semifermentation and Drying Processes" **J. of Agricultural and food chemistry.**, 55, pp 7462-7468.
- Fennema O. R. (1996), "**Food Chemistry**". Third Edition, Marcel Dekker, pp 225.
- Flamini R. (2013) "Recent Applications of Mass Spectrometry in the Study of Grape and Wine Polyphenols" **J. of Hindawi Publishing Corporation.**, 2013, pp 1-45.
- Gabaldo'n-Leyva C. A. Quintero-Ramos A. Barnard J. Balandra'n-Quintana R. R. Talama's-Abbud R. and Jimenez-Castro J. (2007) "Effect of ultrasound on the mass transfer and physical changes in brine bell pepper at different temperatures" **J. of Food Engineering.**, 81, pp 374-379.
- Gioti E. M. Fiamegos Y. C. Skalkos D. C. and Stalikas C. D. (2009) "Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece" **J. of Food Chemistry.**, 117, pp 398-404.
- Gursoy N. Sarikurkcu C. Cengiz M. and Solak M. H. (2009) "Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven *Morchella* species" **J. of Food and Chemical Toxicology.**, 47, pp 2381-2388.
- Haaland P. O. (1989), "Experimental Design in Biotechnology". New York: Marcel Dekker.

- Hatamnia A. A. Abbaspour N. and Darvishzadeh R. (2014) "Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica subsp. kurdica*) fruits" **J. of Food Chemistry.**, 145, pp 306-311.
- Heim K. E. Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J. (2002). "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships" **J. of Nutritional Biochemistry.**, 13, pp572-584.
- 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 (*Phlomidosema parviflorum*) leaves using response surface methodology" **J. of Industrial Crops and Products.**, 57, pp 195-202.
- Huang W. Xue A. Niu H. Jia Z. and Wang J. (2009) "Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro" **J. of Food Chemistry.**, 114, pp 1147-1154.
- Ilaiyaraja N. Likhith K. R. Sharath Babu G. R. and Khanum F. (2015) "Optimisation of extraction of bioactive compounds from *Feronia limonia* (wood apple) fruit using response surface methodology (RSM)" **J. of Food Chemistry.**, 173, pp 348-354.
- Jacques R. A. Freitas L. D. S. Perez V. F. Dariva C. Oliveria A. P. D. Olivera J. V. D. and Caramao E. B. (2007) "The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration" **J. of Ultrasonic Sonochemistry.**, 14, pp 6-12.
- Jaiswal R. Müller H. Müller A. Karar M. G. E. and Kuhnert N. (2014) "Identification and characterization of chlorogenic acids, chlorogenic acid glycosides and flavonoids from *Lonicera henryi* L. (Caprifoliaceae) leaves by LC-MSⁿ" **J. of Phytochemistry.**, 108, pp 252-263.
- Khadivi-Khub A. Aghaei Y. and Mirjalili M. H. (2014). "Phenotypic and phytochemical diversity among different populations of *Stachys lavandulifolia*" **J. of Biochemical Systematics and Ecology.**, 54, pp 272-278.
- Khoo H. E. Azlan A. Ismail A. and Abas F. (2012) "Antioxidative Properties of Defatted Dabai Pulp and Peel Prepared by Solid Phase Extraction" **J. of molecules.**, 17, pp 9754-9773.
- Kim, D. O. and Lee, C. Y. (2002) "Extraction and isolation of polyphenolics" *Current protocols in food analytical chemistr*, New York.
- Kubola J. and Siriamornpun S. (2008) "Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro" **J. of Food Chemistry.**, 110, pp 881-890.
- Lim Y. Y. and Murtijaya J. (2007) Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods" **J. of LWT - Food Science and Technology.**, 40, pp 1664-1669.

- Lin L. Z. and Harnly J. M. (2010) "Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat)" **J. of Food Chemistry.**, 120, pp 319-326.
- Liu C. W. Wang Y. C. Lu H. C. and Chiang W.D. (2014) "Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for total phenols with anti-hyperglycemic activity from *Psidium guajava* leaves" **J. of Process Biochemistry.**, 49, pp 1601-1605.
- Liu Y. Wei S. and Liao M. (2013) "Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Euryale ferox* seed shells using response surface methodology" **J. of Industrial Crops and Products.**, 49, pp 837-843.
- Liyana-Pathirana C. and Shahidi F. (2005) "Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology" **J. of Food Chemistry.**, 93, pp 47-56.
- Luque-Garcia J. L. and Luque de Castro M. D. (2003) "Ultrasound: a Powerful tool for leaching" **J. of Trends Analytical Chemistry.**, 22, pp 41-47.
- Maldini M. Montoro P. and Pizza C. (2011) "Phenolic compounds from *Byrsonima crassifolia* L. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by LC-ESI MS/MS" **J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.**, 56, pp 1-6.
- Mead R. and Pike D. J. (1975) "A review of response surface methodology from a biometric viewpoint" **J. of Biometric viewpoint, Biometrics.**, 31, pp 803-851.
- Mizubuti I. Y. Junior O. B. de Olivia souza L. W. dos Santos Ferrera da Silva R. S. and ida E. I (2000) "Rspone surface methodology for extraction optimization of pigeon pea protein" **J. of Food Chemistry.**, 70, pp 259-265.
- Mohsen S. M. and Ammar A. S. M. (2009) "Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts" **J. of Food Chemistry.**, 112, pp 595-598.
- Morelli L. L. L. and Prado M. A. (2012) "Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology" **J. of Ultrasonics Sonochemistry.**, 19, pp 1144-1149.
- 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" **J. of Ultrasonics Sonochemistry**, 20, pp1149-1154.
- Naczki M. and Shahidi F. (2006) "Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis, Review" **J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.**, 41, pp 1523-1542.
- Obied H. K. Bedgood Jr D. R. Prenzler P. D. and Robards K. (2007) "Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography" **J. of Analytica Chimica Acta.**, 603, pp 176-189.

- Pan G. Yu G. Zhu C. and Qiao J. (2012) "Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds) FC) from hawthorn seed (HS)" **J. of Ultrasonics Sonochemistry.**, 19, pp 486-490.
- Peterson D. M. Emmons C. L. and Hibbs A. (2001) "Phenolic antioxidants and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats" **J. of Cereal Science.**, 33, pp 97-103.
- Pinelo M. Rubilar M. Sineiro J. and Nuñez M. J. (2004) "Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*)" **J. of Food Chemistry.**, 85, pp 267-273.
- Prieto P. Pineda M. and Aguilar M. (1999) "Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E" **J. of Analytical Biochemistry.**, 269, pp 337-341.
- Prior R. L. Wu X. and Schalich K. (2005) "Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements" **J. of Agricultural and Food Chemistry.**, 53, pp 4290-4302.
- Pulido R. Bravo L. and Saura-Calixto F. (2000) "Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay" **J. of Agric. Food Chemistry.**, 48, pp 3396-3402.
- Quifer-Rada P. Vallverdú-Queralt A. Martínez-Huélamo M. Chiva-Blanch G. Jáuregui O. Estruch R. and Lamuela-Raventós R. (2015) "A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS)" **J. of Food Chemistry.**, 169, pp 336-343.
- Rababah T. M. Hettiarachchy N. S. and Horax R. (2004) "Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and tert-Butylhydroquinone" **J. of. Agriculture and Food Chemistry.**, 52, pp 5183-5186.
- Ramarathnam N. Ochi H. and Takeuchi M. (1997) "Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications" Champaign, IL: AOCS Press, pp. 76-87.
- Ramirez-Lopez L. M. McGlynn W. Goad C. L. and Mireles DeWitt C. A. (2014) "Simultaneous determination of phenolic compounds in Cynthiana grape (*Vitis aestivalis*) by high performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry" **J. of Food Chemistry.**, 149, pp 15-24.
- Razali N. Mat-Junit S. Abdul-Muthalib A. F. Subramaniam S. and Abdul-Aziz A. (2012) "Effects of various solvents on the extraction of antioxidant phenolics from the leaves, seeds, veins and skins of *Tamarindus indica* L" **J. of Food Chemistry.**, 131, pp 441-448.
- Rice-Evans C. A. and Burdon R. H. (1994) "Free Radical Damage and its control" **J. of New comprehensive Biochemistry**, 28, pp 25-66, 113-130.

- Rodrigues S. Pinto G. A. S. and Fernandes F. A. N. (2008) "Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology" **J. of Ultrasonics Sonochemistry.**, 15, pp 95-100.
- Şahin, S. Aybastier, Ö. and Işık, E. (2013) "Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology". **J. of Food Chemistry**, 141, pp 1361-1368.
- Saikia S. Mahnot N. K. and Mahanta C. L. (2015) "Optimisation of phenolic extraction from *Averrhoa carambola* pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying" **J. of Food Chemistry.**, 171, pp 144-152.
- Sapozhnikova Y. (2014) "Development of liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for analysis of polyphenolic compounds in liquid samples of grape juice, green tea and coffee" **J. of Food Chemistry.**, 150, pp 87-93.
- Seeram N. P. Lee R. Scheuller H. S. and Heber D. (2006) "Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy" **J. of Food Chemistry.**, 97, pp 1-11.
- Shah M. A. Bosco S. J. D. and Mir S. A. (2014) "Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products" **J. of Meat Science.**, 98, pp 21-33.
- Shahidi F. and Naczki M. (2004), "**Phenolics in food and nutraceuticals**", First Edition, CRC Press LLC. Boca Raton, Florida.
- Silva E. M. Rogez H. and Larondelle Y. (2007) "Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology" **J. of Separation and Purification Technology.**, 55, pp 381-387.
- Simirgiotis M. J. Bórquez J. and Schmeda-Hirschmann G. (2013) "Antioxidant capacity, polyphenolic content and tandem HPLC–DAD–ESI/MS profiling of phenolic compounds from the South American berries *Luma apiculata* and *L. chequén*" **J. of Food Chemistry.**, 139, pp 289-299.
- Singh R. Singh S. Kumar S. and Arora S. (2007) "Studies on antioxidant potential of methanol extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn" **J. of Food Chemistry.**, 103, pp 505-511.
- Suárez M. Macià A. Romero M. P. and Motilva M. J. (2008) "Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil" **J. of Chromatography A.**, 1214, pp 90-99.
- Tabaraki R. and Nateghi A. (2011) "Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology" **J. of Ultrasonics Sonochemistry.**, 18, pp 1279-1286.

- Tao Y. Zhang Z. and Sun D. W. (2014) “Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature” **J. of Ultrasonics Sonochemistry**., 21, pp 1461-1469.
- Torras-Claveria, L. Jauregui, O. Bastida, J. Codina, C. & Viladomat, F. (2007) “Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur) Waste” **J. of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 8436-8443.
- Tundis R. Peruzzi L. and Menichini F. (2014) “Phytochemical and biological studies of *Stachys* species in relation to chemotaxonomy: A review” **J. of. Phytochemistry**., 102, pp 7-39.
- Vermerris W. Nicholson R. (2006), “**Phenolic compound biochemistry**”, Springer, pp. 1-2.
- Vuong Q. V. Hirun S. Roach P. D. Bowyer M. C. Phillips P. A. and Scarlett C. J. (2013) “Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of *Carica papaya* leaf aqueous extracts” **J. of Herbal Medicine**., 3, pp 104-111.
- Waterhouse A. L. (2002), “Determination of total phenolics”, In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: New York: John Wiley & Sons, pp.2-3
- Wojdyło A. Teleszko M. and Oszmiański J. (2014) “Antioxidant property and storage stability of quince juice phenolic compounds” **J. of Food Chemistry**., 152, pp 261-270.
- Yang B. Liu X. and Gao Y. (2009) “Extraction optimization of bioactive compounds (crocin, geniposide and total phenolic compounds) from *Gardenia* (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruits with response surface methodology” **J. of Innovative Food Science & Emerging Technologies**., 10, pp 610-615.
- Yıldırım A. Mavi A. Oktay M. Kara A. A. Algur F. and Bilaloglu V. (2000) “Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of *Tilia* (*Tilia Argentea* Desf Ex DC), *Sage* (*Salvia triloba* L.), and *Black Tea* (*Camellia sinensis*) extracts” **J. of Agriculture and Food Chemistry**., 48, pp 5030–5034.
- Yogendra Kumar M. S. Tirpude R. J. Maheshwari D. T. Bansal A. and Misra K. (2013) “Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves in vitro” **J. of Food Chemistry**., 141, pp 3443-3450.
- Zhu Z. w. Li J. Gao X. M. Amponsem E. Kang L. y. Hu L. m. Zhang B. l. and Chang Y. x. (2012) “Simultaneous determination of stilbenes, phenolic acids, flavonoids and anthraquinones in *Radix polygoni multiflori* by LC–MS/MS” **J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**., 62, pp 162-166.

ABSTRACT

Stachys lavandulifolia Vahl (Mountain tea) is the main species of genus *Stachys* L which wildy grows in Iran. *S.lavandulifolia* has many medicinal and antioxidant properties. In this study Response Surface Methodology (RSM) was used in order to evaluated the effect of extraction condition (power of ultrasound, solvent to solid ratio, time and solvent concentration) on Total Phenolic Content (TPC), Total Flavonoid Content (TFC), Antioxidant Acticity (AA), Antioxidant Activity per mg TPC (AA/mgTPC) and Antioxidant Activity per mg TFC (AA/mgTFC). According to The results of analysis of variance table (ANOVA) the polynomial quadratic equation was the best model for describing the optimum conditions. The optimum extraction conditions were as follows: power: 300W, solvent to solid ratio: 40/1, time: 14 min and concentration 60%. The responses, which including: TPC, TFC, AA, AA/mgTPC and AA/mgTFC in optimum conditions were as follows: 16.59 ± 0.18 (mg Gallic acid/g DW), 44.81 ± 0.79 (mgQuercetin/g DW), $80 \pm 0.39\%$ 4.82% and 1.78% respectively. Antioxidant properties, such as ferric reducing ability and total antioxidant capacity and also IC_{50} value in optimum conditions were measured which result as follows: 0.004 ± 0.0001 (absorbance per 0.1 mg phenol), 14.61(mgBHT/g DW), and 4.03 (μ g Gallic acid) respectively. Phenolic compounds of *S.lavandulifolia* extracted were analysed with LC-ESI-MS/MS which 45 compounds were identified.

Keywords: *Stachys lavandulifolia*, Phenolic Compound, Response Surface Methodology, Ultrasonic-Assisted extraction, Liquic Chromatography-Mass spectrophotometry



دانشگاه شاهرود

University of Shahrood

Faculty Agriculture

**Optimization Of Ultrasonic-Assisted Extraction
Of Phenolic Compounds From *Stachys
Lavandulifolia***

Soroush Rahimi Khoigan

Supervisor:Dr.Ahmad Rajaei

2015 September