

بهینه‌سازی فرایند استخراج ترکیبات فنولی برگ درخت بنه (*Pistacia atlantica* sub. Sp. mutica)

با استفاده از دستگاه اولتراسوند

الهام احمدی¹، رقیه دلیری^{2*}، محمدرضا سعیدی اصل²، نرگس رحیمی³

1- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

2- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

3- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد بیرجند، دانشگاه آزاد اسلامی، بیرجند، ایران.

تاریخ پذیرش: 1397/06/12

تاریخ دریافت: 1396/10/19

چکیده

با پیشرفت علوم و صنایع غذایی گرایش به جایگزینی افزودنی‌های طبیعی به جای انواع سنتزی در مواد غذایی رو به افزایش است. با توجه به اثرات سوء آنتی اکسیدان‌های سنتزی استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های منابع طبیعی به عنوان یک راه حل منطقی در نظر گرفته می‌شود. در این تحقیق برای بهینه‌سازی فرآیند سه عامل شدت امواج فراصوت، اندازه ذره، نسبت نمونه به حلال در سه سطح به منظور تعیین نقاط بهینه فرایند استخراج با دستگاه اولتراسوند و حلال متانول 80% استفاده گردید. در این مطالعه از طرح سطح پاسخ با سه متغیر (نسبت نمونه به حلال، شدت صوت دستگاه فراصوت و اندازه ذره نمونه) برای بهینه‌سازی فرایند استخراج ترکیبات فنولیک از برگ درخت بنه، با 5 تکرار در نقطه مرکزی، استفاده شد. شدت صوت 69%، مش 20 و نسبت نمونه به حلال 0.020 gr/ml بیشترین استخراج را در بین تیمارهای مورد مطالعه داشت. نتایج این مطالعات نشان داد که نسبت نمونه به حلال بیشترین تاثیر را در بازده استخراج ترکیبات فنولیک از برگ درخت بنه داشته در حالی که اندازه ذرات تاثیر زیادی بر روند استخراج نداشت. در این مطالعه بهترین مدل برای سه متغیر، مدل Quadratic بود که با ضریب تبیین بالایی داده‌ها را برازش داد. همچنین نتایج مبین این بود با افزایش شدت صوت امواج فراصوت بازده استخراج ترکیبات فنولیک کاهش دارد.

واژه‌های کلیدی: بنه، ترکیبات فنولیک، اولتراسوند، روش سطح پاسخ، بهینه‌سازی

1- مقدمه

ترکیبات فنلی متابولیت‌های ثانویه از گیاهان به ویژه گیاهان دارویی هستند. این ترکیبات توان آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند و از طرق مختلف در حذف و جلوگیری از ایجاد رادیکال‌های آزاد موثرند. به طوری که این ترکیبات رادیکال‌های آزاد را حذف می‌کنند و همچنین باعث رسوب عناصر اکسیدان مانند آهن می‌شوند (23). تحقیقاتی در سال‌های اخیر روی میزان ترکیبات فنولیک موجود در محصولات کشاورزی و پس‌مانده صنعتی آنها و میزان در دسترس بودن این ترکیبات انجام شده است. عصاره میوه‌ها، سبزیجات و غلات که غنی از ترکیبات فنولی است در صنعت مواد غذایی بسیار قابل توجه شده‌اند به این دلیل که قادرند تغییرات اکسیداتیو چربی‌ها را آهسته کرده و بنابراین کیفیت و ارزش تغذیه‌ای مواد غذایی را بهبود دهند (9). بنه یا پسته‌ی وحشی با نام علمی پستاسیا آتلانتیکا¹ از خانواده‌ی آناکاردیاسه² درختی است که در اغلب مناطق ایران و حتی در کشورهای با شرایط آب و هوایی مدیترانه رویش دارد. بنه شامل سه زیر گونه است: پستاسیا آتلانتیکا زیر گونه موتیکا³، پستاسیا آتلانتیکا زیر گونه کابولیکا⁴، پستاسیا آتلانتیکا زیر گونه کردیکا⁵ (10). برگ بنه به واسطه وجود مواد شیمیایی و دارویی از مدت‌ها قبل به صورت سنتی برای درمان بعضی از امراض از قبیل: جوشانده برگ سبز بنه برای ضد عفونی و درمان بسیاری از غده‌های چرکین، به عنوان قابض (درمان اسهال)، خوشبوکننده دهان، ضد عفونی کننده زخم‌ها و... مورد استفاده قرار می‌گرفته است (4). برگ بنه از فعالیت ضد رادیکالی و درصد باز ماندگی بالایی برخوردار است و در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های شناخته شده مانند اسید آسکوربیک، عصاره برگ بنه از توان آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای برخوردار بود (19). با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک⁶ در عصاره‌های برگ بنه

ترکیبات فلاونولی⁷، اسید فنولیکی⁸، فلاونی⁹، آنتوسیانین¹⁰، اسید گالیک¹¹ و اسید پاراکوماریک¹² شناسایی شده و مشخص شد که عصاره این گونه دارای قدرت احیا کنندگی بالایی است (7). از نقطه نظر استخراج ترکیبات مؤثره از محصولات کشاورزی و یا پس‌مانده‌های صنعتی، میزان استخراج ترکیبات فعال آنها از جمله ترکیبات فنولیک بسیار مهم است و میزان حضور ترکیبات فنولیک در محصولات غذایی به صورت طبیعی و یا غنی شده نشان دهنده ارزش غذایی آن محصول در حفظ سلامتی بشر است به همین جهت در فرایند استخراج عواملی چون نوع حلال، نسبت نمونه به حلال، اندازه ذرات نمونه، مدت زمان استخراج و دما بسیار مهم هستند. همچنین نحوه عمل استخراج می‌تواند به صورت سنتی از طریق روش‌هایی مانند سوکسله و غرقابی و یا از طریق فناوری‌های جدیدی چون مایکروویو و یا امواج مافوق صوت صورت گیرد. بررسی نتایج حاصل از تاثیر فاکتورهای مختلف در میزان استخراج با روش مافوق صوت از طریق روش آماری آزمون سطح پاسخ¹³ صورت گیرد چون در این روش آماری با حداقل آزمون انجام شده بیشترین اطلاعات ممکن از روند میزان استخراج به دست خواهد آمد. به همین دلیل تقاضای زیادی برای روش‌های عصاره‌گیری جدید با زمان کوتاه‌تر، میزان حلال کمتر و آسیب کمتر به محیط زیست وجود دارد. روش‌های جدید عصاره‌گیری برای استخراج ترکیبات زیست فعال از گیاهان بسیار سریع و موثر عمل می‌کنند (9). استخراج به وسیله امواج فراصوت امکان استخراج ترکیبات حساس به حرارت را فراهم می‌سازد. در مقایسه با تکنیک‌های استخراج جدید دیگر هم چون استخراج با مایکروویو، دستگاه فراصوت ارزان تر است و اجرای آن راحت تر می‌باشد. استخراج به کمک فراصوت مشابه استخراج با سوکسله می‌تواند با هر حلالی برای

7- Flavonol

8- Phenolic Acid

9- Flavone

10- Anthocyanin

11- Gallic Acid

12- Para-Coumaric Acid

13- Response Surface Methodology

1- Pistacia atlantica

2- Anacardiaceae

3- Pistacia atlantica sub. sp. mutica

4- Pistacia atlantica sub. sp. cabulica

5- Pistacia atlantica sub. sp. kurdica

6- TLC

می‌کنیم و در بالون ژوژه 25 میلی لیتر به حجم می‌رسانیم. در انتها با روش اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی میزان فنول کل اندازه می‌گیریم (6).

3-2- روش اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی (روش فولین سیوکالتو)

500 میکرولیتر از عصاره درون لوله آزمایش درب‌دار ریخته شده و پس از افزودن 2.5 میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو (رقیق شده با آب به نسبت 10:1) بعد از 5 دقیقه به آن 2 میلی لیتر محلول بیکربنات سدیم 7.5% افزوده و در دمای اتاق به مدت 1 ساعت قرار داده شد. پس از گذشت زمان یک ساعت جذب نمونه در طول موج 765 نانومتر در مقابل بلانک اندازه‌گیری شد (13). جهت تهیه بلانک 500 میکرولیتر عصاره را در لوله آزمایش می‌ریزیم بجای 2.5 میلی لیتر فولین سیوکالتو و 2 میلی لیتر محلول بیکربنات سدیم 7.5% به عصاره 4.5 میلی لیتر حلال مورد نظر اضافه می‌کنیم. داده‌ها بر اساس میلی گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک گزارش شد.

3-3- رسم منحنی استاندارد برای رابطه جذب و غلظت اسید گالیک

محلول‌های استاندارد در غلظت‌های مختلف اسید گالیک منوهیدراته (0، 5، 10، 15، 20، 25 میلی گرم در میلی لیتر در متانول 80 درصد) تهیه شد. 500 میکرولیتر از هر محلول درون لوله آزمایش درب دار ریخته شده و سایر مراحل مانند آزمایش قبل انجام شد. آزمون جذب برای هر یک از محلول‌های استاندارد در سه تکرار انجام شد، بر اساس نتایج جذب خوانده شده، منحنی استاندارد اسید گالیک رسم شد و سپس مقدار کل ترکیبات فنولیک برای هر یک از عصاره‌ها، بر اساس معادله خط منحنی جذب اسید گالیک محاسبه شد (5).

4- روش آماری

برای بررسی اثر متغیرهای شدت صوت امواج فراصوت، اندازه ذره، نسبت نمونه به حلال بر روی بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولیک آزمون بر اساس طرح RSM در

استخراج دامنه وسیعی از ترکیبات طبیعی استفاده شود (22). در استخراج عملیات کم تری درگیر آن بوده و در نتیجه آلودگی آن کم تر است. استخراج به کمک امواج فراصوت نسبت به استخراج فوق بحرانی¹ (SCF) تجهیزات بسیار ساده‌تری را نیاز دارد (21). تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر همزمان سه فاکتور نسبت نمونه به حلال، شدت صوت دستگاه فراصوت، اندازه ذره نمونه با طرح سطح پاسخ توسط نرم‌افزار Design Expert انجام شد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- آماده‌سازی نمونه

برگ درخت بنه در اواخر فروردین از ارتفاعات باقران (شهرستان بیرجند واقع در استان خراسان جنوبی) جمع‌آوری شد، پس از جدا کردن قسمت‌های زائد و شاخه‌ها، طی یک روز با خشک‌کن انجمادی در دمای 60°C خشک شد. سپس برگ‌های خشک شده بوسیله آسیاب خانگی پودر و سه اندازه ذره با گذراندن از الک‌های با مش 20، 50 و 80 حاصل شد. نمونه‌های پودر شده در بسته‌های نایلونی (هوا) کاملاً گرفته شده) به منظور جلوگیری از نفوذ رطوبت بسته‌بندی شده و بسته‌ها در محل تاریک در فریزر خانگی تا زمان استخراج نگهداری شدند.

2-2- مواد و وسایل مورد نیاز

استاندارد اسید گالیک، معرف فولین سیوکالتو (Folin-Ciocalteu)، بیکربنات سدیم و حلال‌های مورد استفاده همگی از شرکت مرک خریداری شدند.

3- روش کار

3-1- استخراج با اولتراسوند

جهت تهیه عصاره از برگ درخت بنه از روش استخراج با دستگاه اولتراسوند و حلال متانول 80% استفاده شد. مقدار مورد نظر از نمونه را وزن کرده و در داخل بشری می‌ریزیم با استوانه مدرج 25 میلی لیتر از حلال متانول 80% در آن می‌ریزیم و آن را در دستگاه فراصوت به مدت 40 دقیقه قرار می‌دهیم. پس از آن عصاره را با کاغذ صافی صاف

مورد استفاده قرار گرفت و تاثیرفاکتورها در سه سطح، شدت امواج فراصوت (AMPL) (40%، 69%، 98%)، مش (20، 50، 80) نسبت نمونه به حلال (0/020gr/ml، 0/011gr/m، 0/002gr/m) بر روی بازده استخراج ترکیبات فنولیک مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول 4-10). معنادار بودن آماری عبارت‌ها در معادله رگرسیونی در سطح اطمینان 95 درصد ($p < 0.05$) مورد بررسی قرار گرفت. میزان فنول کل به دست آمده از استخراج با روش امواج فراصوت و حلال متانول 80% برحسب میلی گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک در جدول نشان داده شده است (جدول 1).

سه عامل و سه سطح طراحی و بر اساس طرح Box- Behnken در نرم افزار Design Expert 7.1.5 آزمون انجام شد.

5- بحث و نتیجه گیری

5-1- بررسی سه متغیر شدت امواج فراصوت، نسبت نمونه به حلال و اندازه ذرات نمونه با استفاده از روش آماری سطح پاسخ

در این پژوهش روش سطح پاسخ (RSM) به منظور تعیین نقاط بهینه فرایند استخراج با روش امواج فراصوت جهت دستیابی به بیشینه ترکیبات فنولیک و بازدهی عصاره

جدول 1- مقادیر مختلف غلظت فنول کل بر حسب میلی گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک در هر تیمار

Run	X1 Ratio	X2 Amplitude	X3 Mesh	Acid galic
1	0/011	40	20	60/59
2	0/011	69	50	60/35
3	0/020	69	80	49/46
4	0/011	98	80	57/85
5	0/002	40	50	50/03
6	0/002	98	50	36/64
7	0/002	69	20	37/69
8	0/011	69	50	60/59
9	0/011	40	80	58/66
10	0/011	69	50	60/91
11	0/011	69	50	59/46
12	0/011	69	50	60/27
13	0/002	69	80	47/93
14	0/020	98	50	51/16
15	0/020	40	50	58.17
16	0/020	69	20	62.61
17	0/011	98	20	58/5

Linear, 2FI, Quadratic, cubic, Mean به جداول (4-10)(4-11) تجزیه واریانس، مدلی که مقدار Sum of squar آن دارای اختلاف معنی دار بوده و مقدار

5-2- انتخاب بهترین مدل

پس از آنالیز داده‌ها توسط برنامه Design Expert جهت تعیین بهترین مدل پیشنهادی از میان پنج مدل موجود

نتایج حاکی از آن بود که مدل Quadratic برای تمامی آزمون‌های اندازه‌گیری شده در این مطالعه، دارای اختلاف معنی‌دار با سایر مدل‌ها و مدل مناسب جهت برازش داده‌ها به دست آمد بود.

Lack of fit آن معنی‌دار نشود به عنوان بهترین مدل انتخاب می‌شود. با توجه به این موضوع و پس از بررسی نتایج بدست آمده و مقایسه میان مدل‌های رگرسیونی و پس از تحلیل واریانس داده‌ها و بر اساس مقادیر P و F مدل

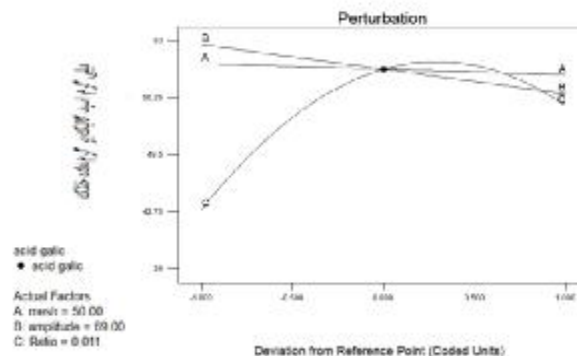
جدول 2- Sum of squar (مجموع مربعات)

Source	Sum of Squares	Value F	Prob > F	P-Value
Mean vs Total	50971/70			
Linear vs Mean	373/10	2/46	0/1093	
2FI vs Linear	147/36	0/96	0/4482	
<u>Quadratic vs 2FI</u>	<u>469/57</u>	<u>26/56</u>	<u>0/0003</u>	<u>Suggested</u>
Cubic vs Quadrati	40/09	45/93	0/0015	Aliased
Residual	1/16			
Total	52002/99			

دارای اثر مثبت و دیگر متغیرهای مستقل دارای اثر عکس بر میزان استخراج ترکیبات فنولی استخراج شده در شرایط آزمون بودند. همچنین در بین فاکتورهای مذکور نسبت نمونه به حلال و مش به ترتیب دارای بالاترین و پایین‌ترین اثر بر راندمان استخراج بودند. همچنین شکل (1) با مطالب بالا هم‌خوانی دارد. با توجه به نمودار بیشترین تاثیر در استخراج ترکیبات فنولی نمودار C دارد چون شیب تندتری نسبت به دو معادله دیگر دارد و نسبت نمونه به حلال رابطه غیر خطی با استخراج ترکیبات فنولی دارد. نمودار B چون شیب تندتری از A دارد تاثیر بیشتری بر روی استخراج دارد، هر دو نمودار تاثیر خطی بر استخراج دارند.

3-5- بررسی معادله مدل

معادله مدل ارائه شده عبارت از معادله درجه دو چند جمله‌ای (رگرسیونی) است که پس از حذف ضرایب بی‌معنی و در سطح اطمینان 95 درصد ارائه شده است. عدد ثابت داده شده، ضریب ثابت مدل می‌باشد. γ نشانگر میزان فنول کل بر حسب میلی گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک است. بزرگی ضرایب متغیرها در این چندجمله‌ای صرف نظر از مثبت یا منفی بودنشان بیانگر اهمیت ضرایب مربوطه در تغییرات پاسخ (میزان فنول کل) می‌باشند. همان طور که در معادله (1) دیده می‌شود، از بین سه متغیر مستقل، به طور کلی تنها نسبت نمونه به حلال بکار رفته



شکل 1- منحنی آشفتنی سه متغیر

به جدول Anova، پارامتری که آزمون F برای آن معنی دار نباشد از مدل حذف می شود و سایر پارامترها که دارای اختلاف معنی دار در سطح (95%) بودند در مدل نگهداری شد (جدول 3). همچنین، داده های حاصل از تحلیل واریانس نشان داد دو متغیر شدت صوت و نسبت نمونه به حلال دارای اثر معنی دار در مدل بودند. عبارات درجه دو نسبت نمونه به حلال و اثر متقابل دو متغیر، شدت صوت و مش با ضریب اطمینان 95 درصد معنی دار بودند (جدول 3).

$$X1 = \text{نسبت نمونه به حلال}$$

$$X2 = \text{شدت صوت امواج فراصوت}$$

$$X3 = \text{اندازه ذرات نمونه معادله درجه دو مدل}$$

$$\text{acidgall} = -10.48X1^2 - 6.88X2X1 + 6.14X1 - 2.91X2 - 0.69X3 + 89.69$$

4-5- بررسی پارامترهای اثرگذار در مطالعه

پس از انتخاب بهترین مدل در سطح آماری مورد نظر (95%)، جهت بررسی پارامترهای اثرگذار در مطالعه با توجه

جدول 3- جدول واریانس نتایج حاصل از تاثیر متغیرها بر استخراج ترکیبات فنولی

Source	Sum of Squares	Value F	P-Value Prob > F	
Model	990/03	18/67	0/0004	Significant
A-mesh	3/77	0/64	0/4503	
B-amplitude	67/86	11/51	0/0115	
C-Ratio	301/47	51/15	0/0002	
AB	0/41	0/070	0/7997	
AC	136/77	23/21	0/0019	
BC	10/18	1/73	0/2303	
A2	1/04	0/18	0/6872	
B2	3/56	0/60	0/4626	
C2	455.13	77.23	< 0/0001	
R-Squared	0/9600			
Adj R-Squared	0/9086			
C.V. %	4/43			

صحت مدل است اگر از 10% بالاتر می رفت طرح نیاز به بازنگری دارد.

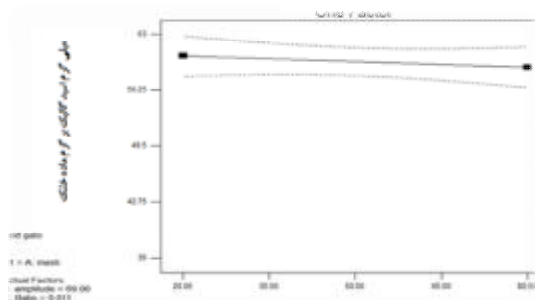
5-5- تاثیر متغیر مش (اندازه ذره نمونه) بر استخراج ترکیبات فنولی کل (mg GAE/g dw)
بر اساس شکل (2) اندازه ذره تاثیر زیادی بر استخراج ترکیبات فنولی با روش فراصوت ندارد و بیانگر این موضوع است که مش نسبت به متغیرهای دیگر بر استخراج ترکیبات فنولی تاثیر کمتری دارد. چون استخراج در زمان 40 دقیقه انجام شد، لذا باعث نفوذ خوب حلال در نمونه شده است.

5-4-1- آنالیز جداول

با توجه به جدول (3) نزدیکی Adj R-Squared و Pred R-Squared نشان دهنده مناسب بودن و صحت مدل است. ضریب تبیین برابر 0/96، نزدیک شدن ضریب تبیین به مقدار واحد به معنی برازش مناسب مدل تجربی با داده های واقعی است و صحت مدل می باشد (14). بنابراین صحت مدل پیش بینی شده بر مبنای این دو فاکتور تأیید می شود. CV یا ضریب تغییرات مدل 4.43 شده که نشان دهنده

می‌یابد. همچنین نیروی برشی ایجاد شده توسط امواج فراصوت، سبب کاهش اندازه ذرات می‌شوند که سطح تماس را افزایش داده و در نتیجه انتشار حلال افزایش می‌یابد (14).

زمان دارای اثر معنی دار بر استخراج ترکیبات فنولی است (3). در این روش به دلیل نیروی برشی ایجاد شده توسط امواج فراصوت و محتوای انرژی بالای این امواج و تأثیر آنها در شکستن و متلاشی کردن دیواره‌های سلولی و احتمال رهایش محتویات آنها به محیط، استخراج افزایش

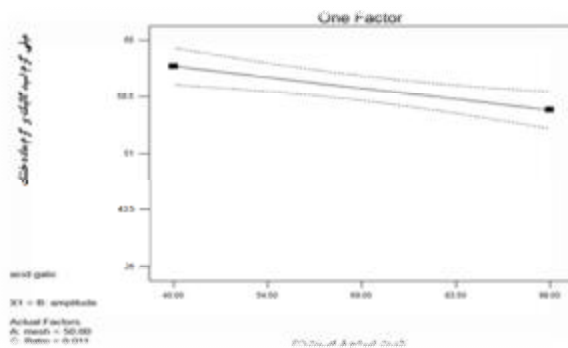


شکل 2- روند تغییرات محتوای فنول کل با تغییر میزان مش

(17، 11). سازوکار اساسی که کاهش محتوای فنول کل را شرح می‌دهد آزاد شدن ترکیبات فنولی پیوند شده، تجزیه جزئی لیگنین و آزاد شدن مشتقات فنولیک اسید و شروع تجزیه حرارتی ترکیبات فنولی می‌باشد، که تجزیه لیگنین در اثر حرارت و آزاد شدن ترکیبات فنولی، مرحله آغازی تجزیه ترکیبات فنولی می‌باشد (18، 16). به علاوه شدت و زمان بر هم اثر هم‌افزایی دارند و با افزایش شدت امواج، اثر زمان جهت کاهش دادن مقدار ترکیبات فنول کل، افزایش می‌یابد (1). لذا زمان زیاد فرآیند باعث شده میزان استخراج ترکیبات فنولی با افزایش شدت سیر نزولی داشت داشته باشد.

5-6- تأثیر متغی‌رشدت صوت بر استخراج ترکیبات فنولی کل (mg GAE/g dw)

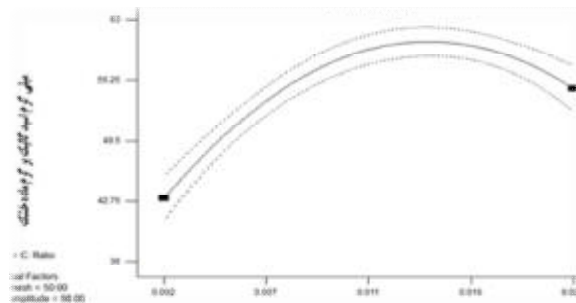
با توجه به نمودار (3) با افزایش شدت صوت مقدار استخراج ترکیبات فنولی نمونه کاهش می‌یابد، شدت صوت با میزان استخراج ترکیبات فنولی رابطه خطی دارد که در طی استخراج با افزایش شدت صوت میزان ترکیبات فنولی با شیب ملایمی کاهش می‌یابد. که دلیل آن را می‌توان چنین بیان کرد که با افزایش شدت امواج فراصوت دمای محلول شروع به افزایش قابل توجهی می‌کند در نتیجه با افزایش دما محتوای فنول کل محلول کاهش یافته که آن را مرتبط با شکسته شدن ترکیبات فنولی بسیاری دانسته‌اند



شکل 3- روند تغییرات محتوای فنول کل با تغییر میزان شدت صوت دستگاه فراصوت

در بهینه‌سازی استخراج محسوب می‌شود. افزایش نسبت حلال به ماده خشک در استخراج ترکیبات فنولی تفاله انگور باعث افزایش میزان عصاره استخراج شده است (20). در استخراج عصاره‌های اتانولی برگ بلم نیز با افزایش میزان حلال ترکیبات فنولی بیشتری استخراج شد (12). محققین دیگر نیز نسبت ماده خشک بر حلال را در میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی استخراج شده در توت موثر دانستن (8) در مطالعه‌ای که روی بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولی دانه انگور با استفاده از مایکروویو انجام شد، نسبت ماده خشک به حلال از مهم‌ترین فاکتورهایی تاثیرگذار در میزان ترکیبات فنولی بودند (15). حاجی مهدی‌پور (1388) نیز روند مشابهی گزارش کرده است.

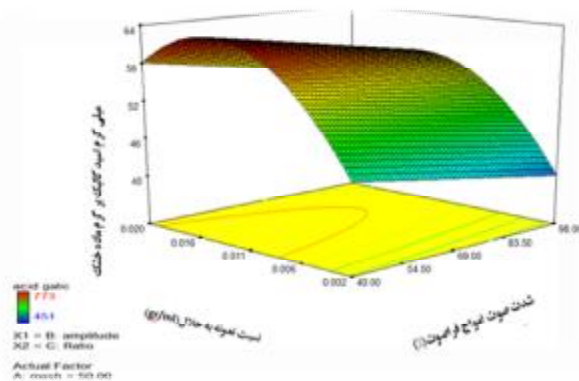
5-7- تاثیر متغیر نسبت نمونه به حلال بر استخراج ترکیبات فنولی کل (mg GAE/g dw)
بر اساس شکل (4) تغییرات نسبت نمونه به حلال بر استخراج ترکیبات فنولی (mg GAE/g dw) تا نسبت نمونه به حلال 0/013 gr/ml روند صعودی دارد ولی بعد از آن میزان استخراج ترکیبات فنولی روند نزولی پیدا کرده است. در واقع شانس حضور ترکیبات زیست فعال در حلال با افزوده شدن حلال به سبب افزایش تراوش بالاتر می‌رود. با افزایش میزان نمونه به حلال، میزان نمونه بالاتر از توان حلال می‌رود و تا اندازه‌ای اثر منفی بر عملکرد استخراج گذاشته و لذا میزان کمتری از ترکیبات فنولی از ماده خشک به سمت حلال حرکت می‌کنند. نسبت ماده خشک به حلال یک نسبت مهم



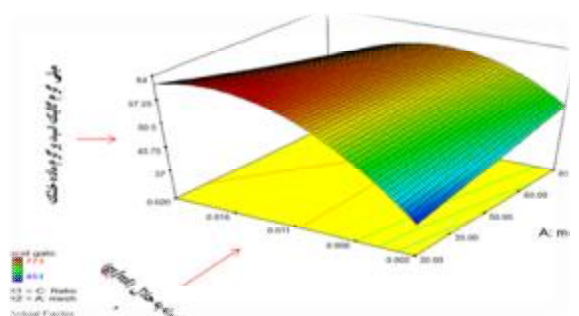
شکل 4- روند تغییرات محتوای فنول کل با تغییر میزان نسبت نمونه به حلال (gr/ml)

به حلال داریم. با افزایش میزان شدت صوت استخراج ترکیبات فنولی روند نزولی داشته و کاهش پیدا کرده است. نقاط قرمز نشان دهنده بیشینه استخراج و نقاط آبی بیانگر کمترین استخراج ترکیبات فنولی هستند. شکل (5) نیز اثر دو متغیر نسبت نمونه به حلال و مش را نشان داده است (در تمام شکل‌ها متغیر مستقل سوم در نقطه‌ی مرکزی خود قرار دارد).

5-8- نمودار سه‌بعدی اثر دو متغیر نسبت نمونه به حلال و شدت صوت امواج فراصوت بر روی استخراج ترکیبات فنولیک
اثر متقابل دو فاکتور نسبت نمونه به حلال به شدت صوت در نمودار (4-9) نشان داده شده است. همان طور که در شکل مشخص است افزایش نسبت نمونه به حلال تا حدود 0/013 باعث افزایش در مقدار استخراج ترکیبات فنولی شده است ولی بعد از آن روند نزولی با افزایش نسبت نمونه



شکل 5- اثرات متقابل نسبت نمونه به حلال و شدت صوت بر استخراج ترکیبات فنولی کل در نمای سه بعدی



شکل 6- اثرات متقابل نسبت نمونه به حلال و مش بر استخراج ترکیبات فنولی کل در نمای سه بعدی

6- نتیجه گیری

در این مطالعه برگ بانه به عنوان یک منبع طبیعی ترکیبات فنولیک مورد ارزیابی قرار گرفت. بر این اساس انتخاب نوع حلال و روش استخراج تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر راندمان عصاره‌گیری و میزان ترکیبات فنولیک استخراج شده دارد. در این نمونه نسبت نمونه به حلال به عنوان تاثیر گذارترین متغیر انتخاب شد و شدت صوت 69%، مش 20 و نسبت نمونه به حلال 0.020 gr/ml بیشترین استخراج را در بین تیمارهای روش سطح پاسخ داشت. نتایج حاکی از آن بود که با افزایش نسبت نمونه به حلال تا حدود 0.013 میزان استخراج ترکیبات فنولی افزایش می‌یابد ولی بعد از آن روند نزولی داشت و با افزایش شدت صوت امواج فراصوت روند استخراج ترکیبات فنولیک کاهش یافته ولی مش در این پژوهش تاثیری زیادی نداشت. این نتایج نشان می‌دهد که می‌توان از عصاره برگ بانه به عنوان یک منبع طبیعی آنتی‌اکسیدانی استفاده نمود.

7- منابع

1. توکلی دخرآبادی، م.، حمیدی اصفهانی، ز. عباسی، س. تاثیر امواج فراصوت بر برخی خواص کیفی آب هویج با استفاده از روش سطح پاسخ، فصلنامه علوم و فناوری‌های نوین غذایی، سال دوم، شماره 5، پاییز 1393
2. حاجی مهدی‌پور، ه.، خانوی، م.، شکرچی، م.، عابدی، ز.، پیرعلی همدانی، م. بررسی بهترین روش استخراج ترکیبات فنولی موجود در گیاه سرخارگل، فصلنامه گیاهان دارویی، سال هشتم، دوره چهارم، شماره مسلسل سی و دوم، پاییز 1388
3. روحانی، ر.، عین افشار، س.، احمدزاده، ر. استخراج ترکیبات آنتوسیانینی و آنتی‌اکسیدانی پرچم گل زعفران به کمک فناوری امواج، 1393

12. Herodez, S.S., Hadolinb, M., Skergeta, M., Kneza, Z., 2003. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry*, 80, 275-282.
13. Jaradat, N. Hussen,F., Al Ali,A. Preliminary Phytochemical Screening, Quantitative Estimation of Total Flavonoids, Total Phenols and Antioxidant Activity of *Ephedra alata* Decne. *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (6) (2015) 1771-1778
14. Lee, E., Wylie, E., Metcalf, C. 2007. Ultrasound imaging features of radial scars of the breast, *J Australasian Radiology*, 51(3): 240-245.
15. Li, Y., Skouroumounis, G.K., Elsey, G.M. and Taylor, D. 2011. Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chemistry* 129: 570-576.
16. Maillard, M.-N., and Berset, C. (1995). Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(7): 1789-1793.
17. Mena, P., Martí, N., Saura, D., Valero, M., and García-Viguera, C. (2012). Combinatory effect of thermal treatment and blending on the quality of pomegranate juices. *Food and Bioprocess Technology*, 8: 10-14.
18. Paul, M. (2009). Effects of supercritical carbon dioxide and thermal processing conditions on phenolics, antioxidant activity, and yeast inactivation in muscadine and pomegranate juice, M. Sc. Thesis. University of Georgia, Athens, Georgia.
19. Peksel, A. 2008. Antioxidative properties of decoction of *Pistacia atlantica* Desf. Leaves. *Asian Journal of Chemistry*, 20: 681-693.
20. Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sinerio, J., Josea, N.M., 2005. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2111-2117.
4. زرگری، ع. 1368، گیاهان داروئی، ج 1، تهران: انتشارات دانشگاه تهران، ص 572-573
5. محمدی، م.، مسکوکی، ع.، مرتضوی، س.، کوچکی، آ. بررسی ترکیبات فنولی عصاره های استخراج شده از میوه زرشک بی دانه (*Berberis vulgaris*) با استفاده از دو روش خیساندن و سیال مادون بحرانی آب، مجله ی نوآوری در علوم و فناوری غذایی، سال ششم، شماره ی اول، بهار 1393
6. Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, P., and Mason, J. 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11, 261-265.
7. Benhammou, N., Bekkara, F.A., and Anovska, P. 2008. Antioxidant and antimicrobial of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2: 22-28.
8. Cacace, J.E., Mazza, G., 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59, 379-389
9. Fang,CH. ,Sun,Y.,Zhao,G. ,Liao,X. ,Hu,X. , Wu,J. ,and Wang,ZH. ,2007,Optimization of ultrasound – assisted extraction of anthocyanins an red raspberries and identification of anthocyanin in extract using HPLC-mass spectrometry, ultrasonics sonochemistry,vol.14-16:767-778
10. Ghasemi pirbalouti. A, Jahanbakhsh.P, Enteshari.SH, Malekpoor.F, Hamedi.B (2010), Antimicrobial activity of some Iranian medical plants, *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 62 (3), 633-642.
11. Hager, A., Howard, L. R., Prior, R. L., and Brownmiller, C. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed black raspberry products. *Journal of Food Science*, 73(6): H134-H140.

21. Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303-313.
22. Wang, L., Weller, CL. Recent advance in extraction of nutraceuticals from Plants. *Trends in Food Sci and Technol* 2006; 17(6):300-312.
23. Wong, C., Li, H., Cheng, K and Chen, F. 2006. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay, *Food Chem.*97: 705-711