

(مقاله پژوهشی)

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

### با استفاده از دستگاه اولتراسوند

الهام احمدی<sup>۱</sup>، رقیه دلیری<sup>۲\*</sup>، محمدرضا سعیدی اصل<sup>۲</sup>، نرگس رحیمی<sup>۳</sup>

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

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

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۹

### 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 ۸۰٪ 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 ۵ تکرار در نقطه مرکزی، استفاده شد. شدت صوت ۶۹٪، مش ۲۰ و نسبت نمونه به حلال ۰.۰۲۰ 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

## ۱- 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 (۲۳). 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 (۹). بنه یا پسته‌ی وحشی با نام علمی پستاسیا آتلانتیکا<sup>۱</sup> از خانواده‌ی آناکاردیاسه<sup>۲</sup> 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 موتیکا<sup>۳</sup>، پستاسیا آتلانتیکا زیر گونه کابولیکا<sup>۴</sup>، پستاسیا آتلانتیکا زیر گونه کردیکا<sup>۵</sup> (۱۰). 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 (۴). 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 (۱۹). با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک<sup>۶</sup> در عصاره‌های برگ بنه

ترکیبات فلاونولی<sup>۷</sup>، اسید فنولیکی<sup>۸</sup>، فلاونی<sup>۹</sup>، آنتوسیانین<sup>۱۰</sup>، اسید گالیک<sup>۱۱</sup> و اسید پاراکوماریک<sup>۱۲</sup> شناسایی شده و مشخص شد که عصاره این گونه دارای قدرت احیا کنندگی بالایی است (۷). 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 پاسخ<sup>۱۳</sup> 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 (۹). 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 ۲۵ میلی لیتر به حجم می‌رسانیم. در انتها با روش اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی میزان فنول کل اندازه می‌گیریم (۶).

### ۳-۲- روش اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی (روش فولین سیوکالتو)

۵۰۰ میکرولیتر از عصاره درون لوله آزمایش درب‌دار ریخته شده و پس از افزودن ۲.۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو (رقیق شده با آب به نسبت ۱:۱۰) بعد از ۵ دقیقه به آن ۲ میلی لیتر محلول بیکربنات سدیم ۷.۵٪ افزوده و در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. پس از گذشت زمان یک ساعت جذب نمونه در طول موج ۷۶۵ نانومتر در مقابل بلانک اندازه‌گیری شد (۱۳). جهت تهیه بلانک ۵۰۰ میکرولیتر عصاره را در لوله آزمایش می‌ریزیم بجای ۲.۵ میلی لیتر فولین سیوکالتو و ۲ میلی لیتر محلول بیکربنات سدیم ۷.۵٪ به عصاره ۴.۵ میلی لیتر حلال مورد نظر اضافه می‌کنیم. داده‌ها بر اساس میلی گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک گزارش شد.

### ۳-۳- رسم منحنی استاندارد برای رابطه جذب و غلظت اسید گالیک

محلول‌های استاندارد در غلظت‌های مختلف اسید گالیک منوهیدراته (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر در متانول ۸۰ درصد) تهیه شد. ۵۰۰ 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 (۵).

### ۴- 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 (۲۲). 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 بحرانی<sup>۱</sup> (SCF) تجهیزات بسیار ساده‌تری را نیاز دارد (۲۱). 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.

### ۲- مواد و روش‌ها

#### ۲-۱- 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 ۶۰°C- خشک شد. سپس برگ‌های خشک شده بوسیله آسیاب خانگی پودر و سه اندازه ذره با گذراندن از الک‌های با مش ۲۰، ۵۰ و ۸۰ 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.

#### ۲-۲- 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.

### ۳- روش کار

#### ۳-۱- استخراج با اولتراسوند

جهت تهیه عصاره از برگ درخت بنه از روش استخراج با دستگاه اولتراسوند و حلال متانول ۸۰٪ استفاده شد. مقدار مورد نظر از نمونه را وزن کرده و در داخل بشری می‌ریزیم با استوانه مدرج ۲۵ میلی لیتر از حلال متانول ۸۰٪ در آن می‌ریزیم و آن را در دستگاه فراصوت به مدت ۴۰ 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) (۴۰٪، ۶۹٪، ۹۸٪)، مش (۲۰، ۵۰، ۸۰) نسبت نمونه به حلال (۰/۰۲۰gr/ml، ۰/۰۱۱gr/m، ۰/۰۰۲gr/m) بر روی بازده استخراج ترکیبات فنولیک مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۴-۱۰). معنادار بودن آماری عبارت‌ها در معادله رگرسیونی در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $p < 0.05$ ) مورد بررسی قرار گرفت. میزان فنول کل به دست آمده از استخراج با روش امواج فراصوت و حلال متانول ۸۰٪ برحسب میلی گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک در جدول نشان داده شده است (جدول ۱).

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

### ۵- بحث و نتیجه گیری

۵-۱- 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 ۱- 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
۱	۰/۰۱۱	۴۰	۲۰	۶۰/۵۹
۲	۰/۰۱۱	۶۹	۵۰	۶۰/۳۵
۳	۰/۰۲۰	۶۹	۸۰	۴۹/۴۶
۴	۰/۰۱۱	۹۸	۸۰	۵۷/۸۵
۵	۰/۰۰۲	۴۰	۵۰	۵۰/۰۳
۶	۰/۰۰۲	۹۸	۵۰	۳۶/۶۴
۷	۰/۰۰۲	۶۹	۲۰	۳۷/۶۹
۸	۰/۰۱۱	۶۹	۵۰	۶۰/۵۹
۹	۰/۰۱۱	۴۰	۸۰	۵۸/۶۶
۱۰	۰/۰۱۱	۶۹	۵۰	۶۰/۹۱
۱۱	۰/۰۱۱	۶۹	۵۰	۵۹/۴۶
۱۲	۰/۰۱۱	۶۹	۵۰	۶۰/۲۷
۱۳	۰/۰۰۲	۶۹	۸۰	۴۷/۹۳
۱۴	۰/۰۲۰	۹۸	۵۰	۵۱/۱۶
۱۵	۰/۰۲۰	۴۰	۵۰	۵۸/۱۷
۱۶	۰/۰۲۰	۶۹	۲۰	۶۲/۶۱
۱۷	۰/۰۱۱	۹۸	۲۰	۵۸/۵

Linear, 2FI, Quadratic, cubic, Mean به جداول (۴-۱۰) (۴-۱۱) تجزیه واریانس، مدلی که مقدار Sum of squar آن دارای اختلاف معنی دار بوده و مقدار

### ۵-۲- 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

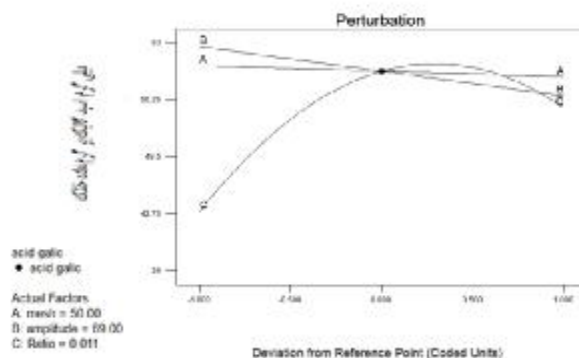
جدول ۲- Sum of squar (مجموع مربعات)

Source	Sum of Squares	Value F	Prob > F	P-Value
Mean vs Total	۵۰۹۷۱/۷۰			
Linear vs Mean	۳۷۳/۱۰	۲/۴۶	۰/۱۰۹۳	
2FI vs Linear	۱۴۷/۳۶	۰/۹۶	۰/۴۴۸۲	
<u>Quadratic vs 2FI</u>	<u>۴۶۹/۵۷</u>	<u>۲۶/۵۶</u>	<u>۰/۰۰۰۳</u>	<u>Suggested</u>
Cubic vs Quadrati	۴۰/۰۹	۴۵/۹۳	۰/۰۰۱۵	Aliased
Residual	۱/۱۶			
Total	۵۲۰۰۲/۹۹			

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 (۱) 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.

### ۳-۵- 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 ۹۵ درصد ارائه شده است. عدد ثابت داده شده، ضریب ثابت مدل می‌باشد.  $\gamma$  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 (۱) دیده می‌شود، از بین سه متغیر مستقل، به طور کلی تنها نسبت نمونه به حلال بکار رفته



شکل ۱- 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 (۹۵٪) بودند در مدل نگهداری شد (جدول ۳). 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 ۹۵ درصد معنی دار بودند (جدول ۳).

$$X1 = \text{نسبت نمونه به حلال}$$

$$X2 = \text{شدت صوت امواج فراصوت}$$

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

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

#### ۵-۴- بررسی پارامترهای اثرگذار در مطالعه

پس از انتخاب بهترین مدل در سطح آماری مورد نظر (۹۵٪)، جهت بررسی پارامترهای اثرگذار در مطالعه با توجه

جدول ۳- جدول واریانس نتایج حاصل از تاثیر متغیرها بر استخراج ترکیبات فنولی

Source	Sum of Squares	Value F	P-Value Prob > F	
Model	۹۹۰/۰۳	۱۸/۶۷	۰/۰۰۰۴	Significant
A-mesh	۳/۷۷	۰/۶۴	۰/۴۵۰۳	
B-amplitude	۶۷/۸۶	۱۱/۵۱	۰/۰۱۱۵	
C-Ratio	۳۰۱/۴۷	۵۱/۱۵	۰/۰۰۰۲	
AB	۰/۴۱	۰/۰۷۰	۰/۷۹۹۷	
AC	۱۳۶/۷۷	۲۳/۲۱	۰/۰۰۱۹	
BC	۱۰/۱۸	۱/۷۳	۰/۲۳۰۳	
A2	۱/۰۴	۰/۱۸	۰/۶۸۷۲	
B2	۳/۵۶	۰/۶۰	۰/۴۶۲۶	
C2	۴۵۵/۱۳	۷۷/۲۳	< ۰/۰۰۰۱	
R-Squared	۰/۹۶۰۰			
Adj R-Squared	۰/۹۰۸۶			
C.V. %	۴/۴۳			

صحت مدل است اگر از ۱۰٪ بالاتر می رفت طرح نیاز به بازنگری دارد.

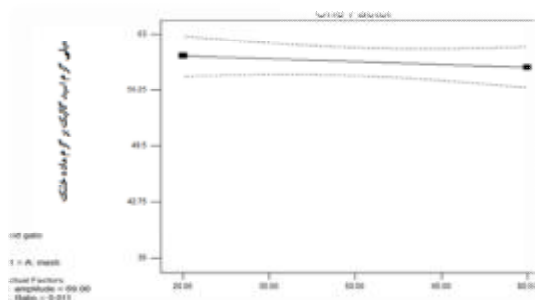
۵-۵- تاثیر متغیر مش (اندازه ذره نمونه) بر استخراج ترکیبات فنولی کل (mg GAE/g dw)  
بر اساس شکل (۲) اندازه ذره تاثیر زیادی بر استخراج ترکیبات فنولی با روش فراصوت ندارد و بیانگر این موضوع است که مش نسبت به متغیرهای دیگر بر استخراج ترکیبات فنولی تاثیر کمتری دارد. چون استخراج در زمان ۴۰ دقیقه انجام شد، لذا باعث نفوذ خوب حلال در نمونه شده است.

#### ۵-۴-۱- آنالیز جداول

با توجه به جدول (۳) نزدیکی Adj R-Squared و Pred R-Squared نشان دهنده مناسب بودن و صحت مدل است. ضریب تبیین برابر ۰/۹۶، نزدیک شدن ضریب تبیین به مقدار واحد به معنی برازش مناسب مدل تجربی با داده های واقعی است و صحت مدل می باشد (۱۴). بنابراین صحت مدل پیش بینی شده بر مبنای این دو فاکتور تأیید می شود. CV یا ضریب تغییرات مدل ۴/۴۳ 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 (۱۴).

زمان دارای اثر معنی دار بر استخراج ترکیبات فنولی است (۳). 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

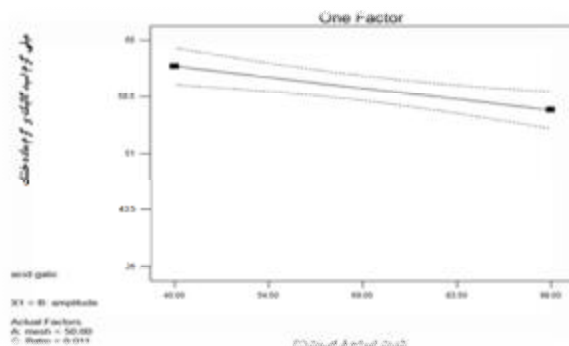


شکل ۲- روند تغییرات محتوای فنول کل با تغییر میزان مش

(۱۷، ۱۱). 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 (۱۸، ۱۶). 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 (۱). لذا زمان زیاد فرآیند باعث شده میزان استخراج ترکیبات فنولی با افزایش شدت سیر نزولی داشت داشته باشد.

#### ۵-۶- تأثیر متغی‌شدت صوت بر استخراج ترکیبات فنولی کل (mg GAE/g dw)

با توجه به نمودار (۳) 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

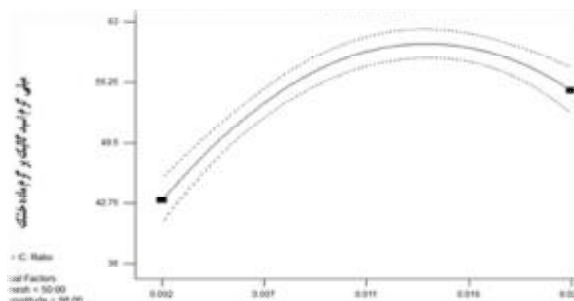


شکل ۳- روند تغییرات محتوای فنول کل با تغییر میزان شدت صوت دستگاه فراصوت

#### ۷-۵- تاثیر متغیر نسبت نمونه به حلال بر استخراج ترکیبات فنولی کل (mg GAE/g dw)

بر اساس شکل (۴) تغییرات نسبت نمونه به حلال بر استخراج ترکیبات فنولی (mg GAE/g dw) تا نسبت نمونه به حلال ۰/۰۱۳ 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

در بهینه‌سازی استخراج محسوب می‌شود. افزایش نسبت حلال به ماده خشک در استخراج ترکیبات فنولی تفاله انگور باعث افزایش میزان عصاره استخراج شده است (۲۰). در استخراج عصاره‌های اتانولی برگ با لم نیز با افزایش میزان حلال ترکیبات فنولی بیشتری استخراج شد (۱۲). محققین دیگر نیز نسبت ماده خشک بر حلال را در میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی استخراج شده در توت موثر دانستن (۸) 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 (۱۵). حاجی مهدی‌پور (۱۳۸۸) نیز روند مشابهی گزارش کرده است.



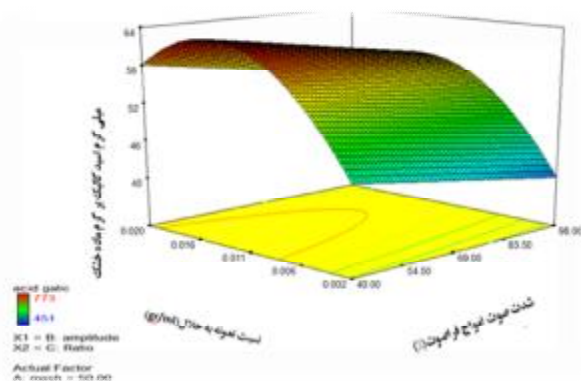
شکل ۴- روند تغییرات محتوای فنول کل با تغییر میزان نسبت نمونه به حلال (gr/ml)

#### ۸-۵- نمودار سه‌بعدی اثر دو متغیر نسبت نمونه به حلال و شدت صوت امواج فراصوت بر روی استخراج ترکیبات فنولیک

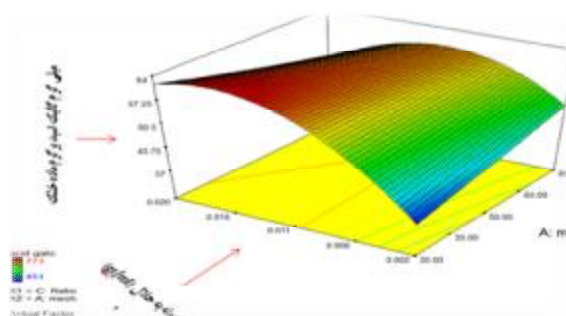
اثر متقابل دو فاکتور نسبت نمونه به حلال به شدت صوت در نمودار (۴-۹) نشان داده شده است. همان طور که در شکل مشخص است افزایش نسبت نمونه به حلال تا حدود ۰/۰۱۳ باعث افزایش در مقدار استخراج ترکیبات فنولی شده است ولی بعد از آن روند نزولی با افزایش نسبت نمونه

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 (۵) 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).





شکل ۵- اثرات متقابل نسبت نمونه به حلال و شدت صوت بر استخراج ترکیبات فنولی کل در نمای سه بعدی



شکل ۶- اثرات متقابل نسبت نمونه به حلال و مش بر استخراج ترکیبات فنولی کل در نمای سه بعدی

## ۶- نتیجه‌گیری

در این مطالعه برگ بنه 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 تاثیرگذارترین متغیر انتخاب شد و شدت صوت ۶۹٪، مش ۲۰ و نسبت نمونه به حلال ۰.۰۲۰ 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 ۰.۰۱۳ 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 بنه به عنوان یک منبع طبیعی آنتی‌اکسیدانی استفاده نمود.

## ۷- منابع

۱. 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 ۵، پاییز ۱۳۹۳
۲. 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 ۱۳۸۸
۳. روحانی، ر.، عین افشار، س.، احمدزاده، ر. استخراج ترکیبات آنتوسیانینی و آنتی‌اکسیدانی پرچم گل زعفران به کمک فناوری امواج، ۱۳۹۳

- extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry*, 80: 275-282.
13. Jaradat, N. Hussen, F., Al Ali, A. 2015. Preliminary Phytochemical Screening, Quantitative Estimation of Total Flavonoids, Total Phenols and Antioxidant Activity of *Ephedra alata* Decne. *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (6) : 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.
۴. زرگری، ع. ۱۳۶۸، گیاهان داروئی، ج ۱، تهران: انتشارات دانشگاه تهران، ص ۵۷۲-۵۷۳
  ۵. 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 ۱۳۹۳
  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.
  12. Herodez, S.S., Hadolinb, M., Skergeta, M., Kneza, Z., 2003. Solvent

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. 2006. Recent advance in extraction of nutraceuticals from Plants. *Trends in Food Sci and Technol* . 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 Chemistry*. 97: 705-711

(Original Research Paper)

## Optimization of the Extraction Process of Phenolic Compounds From the Pistacia Atlantica leaves (Sub Sp Mutica Pistacia Atlantica) Using Ultrasound

Elham Ahmadi<sup>1</sup>, Roghayyeh Daliri<sup>2\*</sup>, Mohammad Reza Saeidi Asl<sup>2</sup>, Narges Rahimi<sup>3</sup>

1- Young Researchers and Elite Club, sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

2- Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

3- Department of Food Science And Technology, Birjand Branch, Islamic Azad University, Birjand, Iran.

Received:09/01/2018

Accepted:03/09/2018

### Abstract

With the advent of science and the food industry, the tendency towards replacing natural additives with traditional food additives has developed. Regarding the adverse effects of synthetic antioxidants, the use of natural antioxidants is considered as a logical solution. In this research, three factors of ultrasound amplitude, particle size, sample to solvent ratio were used to optimize the process for determining the optimum extraction points by ultrasound and 80% methanol solvent extraction. The scheme was implemented through Box-Behnken on three factors and at three levels, including 17 tests. amplitude 69%, mesh 20 and sample ratio to solvent 0.020 gr / ml had the highest extraction among Response Surface. The results of the studies showed that the ratio of the sample to the solvent had the greatest effect on the model, and the particle size had no significant effect on the extraction process. Also, the results indicated that the amount of extraction of phenolic compounds increased with decreasing amplitude.

**Keywords:** Pistacia Atlantica, Phenolic Compounds, Ultrasound, Response Surface Method, Optimization

---

\*Corresponding Author: [r.daliri1371@yahoo.com](mailto:r.daliri1371@yahoo.com)

