بررسی و مقایسه روش های استخراج ترکیبات فنولیک به کمک اولتراسونیک و سیستم برگشت حلال از ریشه شیرین بیان

زهره کرمی[۱]، حبیب الله میرزایی[۲]، زهرا امام جمعه[۳]، مرتضی خمیری[۴]، علیرضا صادقی ماهونک[۲]، عماد ایدانی[۵]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تهران

چکیده

امروزه افزایش تمایل مصرف کنندگان جهت کاربرد آنتی اکسیدان هایی با منشا طبیعی جهت غنی سازی روغن ها و کاهش اکسیداسیون لیپیدها وجود دارد. در این پژوهش به منظور تعیین شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنولی که منبع تامین کننده آنتی اکسیدان های طبیعی می باشد به روش فولین سیوکالتو از ریشه شیرین بیان در استخراج با کمک اولتراسونیک اثر ۳ متغیر فرکانس (۰-۱۳۰Hz)، دما (۲۰-۵۰°C) و زمان (۳۰-۶۰ min) و در استخراج با سیستم برگشت حلال اثر ۲ متغیر زمان (۶h-۲h) و حلال (اتانول ۸۰ درصد، متانول ۸۰ درصد، آب) بر روی راندمان استخراج ترکیبات فنولی مورد بررسی قرار گرفت . نتایج طرح آزمایشی مرکب مرکزی انجام شده به روش رگرسیون سطح پاسخ تجزیه و تحلیل شد. نتایج نشان داد که اثر هر ۳ متغیر دما، زمان و فرکانس در روش اولتراسونیک و ۲ متغیر زمان و حلال در روش برگشت حلال بر روی استخراج ترکیبات فنولیک معنی دار بود شرایط اپتیمم در استخراج برای حداکثر راندمان در روش اول در دمای ۵۰ °C و فرکانس ۱۳۰ Hz و زمان ۶۰ min و در روش دوم در زمان ۶h و اتانول ۸۰ درصد تعیین گردید در مرحله بعد فعالی آنتی اکسیدانی بهترین عصاره های دو روش با آزمون به دام اندازی رادیکال DPPH بررسی گردید. ملاحظه شد که راندمان استحصال ترکیبات فنولیک در هر دو روش یکسان می باشد اما استخراج به کمک اولتراسونیک و افزایش فرکانس آن منجر به کاهش زمان مورد نیاز جهت تکمیل استخراج و کاهش حلال مصرفی گردیده است و همچنین عصاره استخراجی با کمک اولتراسونیک فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری را نشان داد بنابراین استخراج به کمک اولتراسونیک باعث اقتصادی تر شدن استخراج ترکیبات فنولیکی از ریشه شیرین بیان می گردد.

کلیدواژه: شیرین بیان، اولتراسونیک،برگشت حلال، ترکیبات فنولیک،پاسخ سطح

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد z_karami_gua @yahoo.com ۰۹۳۷۴۷۰۰۱۶۵
[۲] استادیار habibmirzaei@yahoo.ca ۰۹۱۱۱۷۱۹۲۳۲
[۳] دانشیار emamj@ut.ac.ir ۰۹۱۲۳۰۰۰۰۸۵
[۴] دانشیار mkhomeiri@yahoo.com
[۵] کارشناسی ارشد e_aidani@yahoo.com

۱- مقدمه

شیرین بیان گیاهی پایا است که در نواحی مدیترانه، جنوب مرکزی روسیه و آسیا از جمله ایران می روید و در حال حاضر به طور وسیعی در اروپا، شرق میانه و آسیا کشت می شود. نام لاتین آن Glycyrrhiza glabra می باشد. این گیاه یکی از داروهایی است که در فرمول های سنتی متعددی پیدا می شود ریشه شیرین بیان به شکل قطعاتی به ضخامت ۱ سانتی متر با پوسته ای به رنگ قهوه ای تیره بوده که شیارهای طولی نامنظم دارد و قسمت داخلی آن (ریشه) به رنگ زرد طلایی است و طعم آن بسیار شیرین است که به نام های مجو، مهو، اصل سوس، متکی و ملو نیز معروف می باشد (۳). زمان مناسب برای بهره برداری از ریشه شیرین بیان (تنها اندام قابل استفاده این گیاه) از اول پاییز تا ماه دوم بهار (با توجه به منطقه رویش) می باشد. خارج کردن ریشه و ریزوم گیاه از زمین، در سال سوم، هنگامی که برگ ها در شرف سقوط است انجام می شود. در این هنگام اعضای مفید گیاه حداکثر گلیسیریزین را در خود ذخیره نموده اند. ارزش و اهمیت ریشه شیرین بیان به دلیل تنوع مواد شیمیایی موجود در آن است که از بین این ترکیبات، گلیسیریزیک اسید از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد (۱). سایر منابع ترکیبات شیرین بیان (w/w%) عبارت است از: قندها (شامل ۱/٤ درصد گلوکز، ۲/۵ درصد ساکارز و ۱۵-۵ درصد مانیتول)، ۳۰-۲۰ درصد نشاسته، ٤-۲ درصد آسپارژین، ۵ درصد رزین، ۱۸ درصد لیگنین، ۳۰ درصد سلولز، ۵-۱ درصد چربی و اسید آلی نظیر اسید مالیک، مقادیری مواد تلخ، مواد پروتئینی و آلبومینی، مقادیری صمغ و قدری مواد رنگی و اندکی اسانس قرار است. ترکیبات شیمیایی موجود در ریشه شیرین بیان به ۳ گروه تقسیم می شود:

الف- تری ترپن ها[6] (۲).

ب- فلاونوئید ها[7]، کومارین ها[8] و کالکون ها[9] (٤).

ج- فرلیک اسید[10]، اولئیک اسید[11]، پالمیتیک اسید[12]، کولین[13]، بتائین[14]، نونا کوزان[15]، تتراکوزانول[16]، اکتاکوزانول (۱).

استخراج اولین مرحله اساسی را در تحقیقات گیاهان دارویی تشکیل می دهد و آماده سازی عصاره ها از گیاهان،نقطه شروعی برای جداسازی و خالص سازی اجزای شیمیایی حاضر در گیاهان هستند (۵) عصاره های گیاهی به طور وسیعی در صنایع غذایی، داروسازی و صنایع آرایشی -بهداشتی استفاده میشوند .روشهای مختلف استخراج به طور وسیعی به منظور به دست آوردن چنین ترکیبهای طبیعی با ارزش بررسی شدند .روشهای سنتی استخراج همچون روش غرقابی نیاز به صرف زمان طولانی و مقدار حلال زیادی دارند، بنابراین نیاز به روش های استخراج جدید با زمان استخراج کوتاه تر، مصرف حلال آلی کمتر و ایجاد آلودگی کمتر، افزایش یافته است .روش های استخراج جدید همچون استخراج به کمک اولتراسونیک روش سریع و مؤثر برای استخراج ترکیبهای موثره از بافت های گیاهی می باشد (٦).

نوع روش استخراج ترکیبات موثره از گیاهان دارویی از جمله شیرین بیان نقش مهمی را در عملکرد دارویی این گیاهان نشان می دهند. هدف از این تحقیق بررسی کیفیت و کمیت استخراج سنتی از جمله سوکسله و روش های جدید همچون اولنراسوند می باشد.

---

[6] Three-terpene
[7] Flavonoids
[8] Coumarins
[9] Chalcones
[10] Ferelic acid
[11] Oleic acid
[12] Palmetic acid
[13] Cholin
[14] Betaine
[15] Nonacosan
[16] Tetracosanol
[17] Octacosanol

۲- مواد و روش ها

۲-۱- تهیه و آماده سازی گیاه

گیاه شیرین بیان در اواخر تابستان مورد شناسایی گیاه شناسی قرار گرفت پس از آن که برگ های گیاه شروع به زرد شدن نمود در ۲۷ مهر ماه از خاک خارج شدند و پس از تمیز کردن به قطعات کوچک تقسیم شدند و به مدت یک هفته در آون و در دمای ٤٠ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. ریشه های خشک شده توسط آسیاب چکشی پودر گردیدند و از مش ۲۰ عبور داده شدند سپس در کیسه های پلی اتیلنی تا زمان آزمون نگهداری شدند.

مواد و وسایل مورد نیاز در این تحقیق:

محلول DPPH (۱و۱ دی فنیل۲-پیکریل هیدرازیل)، مرک آلمان.متانول، مرک آلمان.اتانول، مرک آلمان. کربنات سدیم، مرک آلمان.فولین، مرک آلمان.اسید گالیک، مرک آلمان.

حمام اولتراسوند ، الما ، (D-78224 Singen/Htw)، آلمان ؛ سوکسله

در حمام اولتراسوند نسبت حلال به نمونه ۱:۱۰، فرکانس khz ۱۳۰-۰ ، دمای ۵۰-۲۰ درجه سانتی گراد، زمان ۹۰-۳۰ دقیقه و در سوکسله ۳ حلال (متانول، اتانول و آب)؛ زمان های (٦h-۲h) در نظر گرفته شد.

۲-۲- اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنولی :

مقدار کل ترکیبات فنولی با روش فولین سیوکالته اندازه گیری شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول های عصاره در یک لوله آزمایش با ۸/۲ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالته ۵۰ ٪ مخلوط شدند و پس از ۱-۸ دقیقه، ۲ میلی لیتر کربنات سدیم ۲٪ (حجمی:حجمی) به آنها اضافه شد. نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. بعد از این مدت، جذب آنها در طول موج ۷۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد جهت رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک استفاده شد. مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره بر حسب معادل اسید گالیک و با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر حسب mg اسید گالیک در هر گرم ماده خشک ریشه شیرین بیان، بیان گردید(۷).

۲-۳- میزان به دام اندازی رادیکال DPPH

برای این منظور، محلول های با غلظت های مختلف از عصاره ها در حلال متانول آماده شدند یک میلی لیتر از محلول های متانولی DPPH (با غلظت ۱ میلی مولار) به ۳ میلی لیتر از عصاره افزوده و مخلوط حاصله به شدت هم زده می شود. لوله های آزمایش ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرا گرفتند بعد از این مدت میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. لازم به ذکر است در نمونه کنترل عصاره با ۳ میلی لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکال DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید(۸):

جذب کنترل / جذب کنترل-جذب نمونه =درصد مهار رادیکال DPPH

۳-روش آماری تحلیل داده ها

در این تحقیق، از نرم افزار آماری minitab 15 برای اعمال RSM بر روی داده ها استفاده شد. متغیرهای مستقل که برای استفاده در RSM مورد استفاده قرار گرفتند عبارتند از: زمان اولتراسوند در ۳ سطح (۳۰،٦٠و۹۰ دقیقه)، دما در سه سطح(

۵۰ و۲۰،۳۵ درجه سانتی گراد)، فرکانس (۰، Hz ۱۳۰ و Hz ۳۵) در استخراج با اولتراسوند و زمان در ۳ سطح (۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه) و ۳ حلال متانول، اتانول و آب در استخراج با سوکسله..

طرح آماری مورد نظر با انتخاب طرح کامپوزیت میانی، تعداد فاکتور چهار، بدون بلوک و تکرار، آلفا= یک و تعداد RUN=20 جهت استخراج با اولتراسوند و RUN=13 جهت سوکسله ریخته شد. سطوح بالا (۱+) و میانی (۰) و پائینی (۱-) برای فاکتورها مطابق جدول زیر انتخاب گردید.

جدول ۱-۳- سطوح انتخاب شده برای فاکتورها در استخراج با اولتراسوند

فاکتورها/ سطوح	پایین (۱-)	میانی (۰)	بالا (۱+)
زمان (دقیقه)	۳۰	۶۰	۹۰
فرکانس	۰	۳۵	۱۳۰
دما	۲۰	۳۵	۵۰

جدول ۲-۳- سطوح انتخاب شده برای فاکتورها در استخراج با سوکسله

فاکتورها/ سطوح	پایین (۱-)	میانی (۰)	بالا (۱+)
زمان (ساعت)	۲	٤	٦
حلال	آب	متانول	اتانول

جدول Error! No text of specified style in document.-۳- نقاط انتخاب شده برای اُپتیمم سازی در استخراج با اولتراسونیک (**mg/g**)

اهمیت	حد بالا	هدف	حد پایین	مقصود	پاسخ
۱	٤۲	-	۲۲/۵	بیشترین	**Tf**

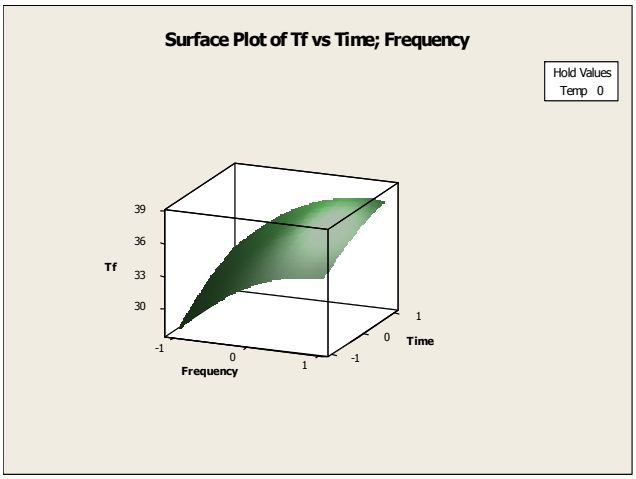
جدول ٤-۳- نقاط انتخاب شده برای اُپتیمم سازی در استخراج با سوکسله(**mg/g**)

اهمیت	حد بالا	هدف	حد پایین	مقصود	پاسخ
۱	٤۱	-	۳/۵	بیشترین	**Tf**

٤- نتیجه و بحث

۱-٤- اثر فرکانس بر استخراج ترکیبات فنولیک در روش اولتراسوند

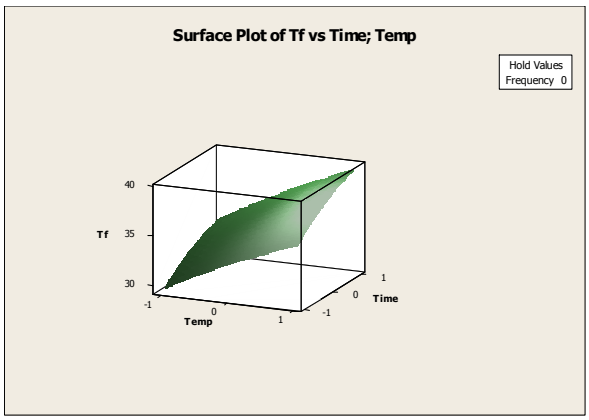
همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود فرکانس اثر معنی دار بر استخراج ترکیبات فنولیک داشت و با افزایش فرکانس به دلیل تخریب بیشتر دیواره سلولی، ترکیبات فنولیک بیشتری استخراج شده است و با افزایش زمان میزان استخراج ترکیبات فنولیک افزایش یافته است و در زمان های بیشتر از ٦٠ دقیقه میزان استخراج ثابت شده و تغییر نکرده است.



شکل۱- پلات سطحی میزان ترکیبات فنولیک در برابر فرکانس و زمان

۲-٤- اثر زمان و دما بر استخراج ترکیبات فنولیک در روش اولتراسوند

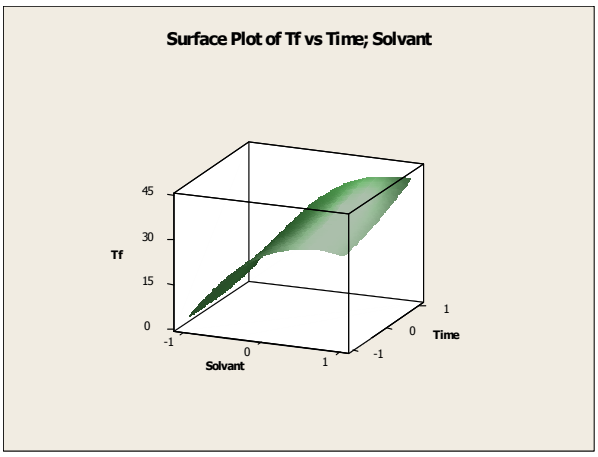
همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود زمان و دما بر استخراج ترکیبات فنولیک دارای اثر معنی دار می باشد و با افزایش دما و زمان تا ۵۰ درجه سانتی گراد میزان استخراج ترکیبات فنولیک افزایش یافته است. تاثیرات مکانیکی اولتراسوند، باعث نفوذ بیشتری از حلال به درون مواد سلولی شده و انتقال جرم را بهبود می دهند. اولتراسوند در طی استخراج می تواند همچنین دیواره های سلولی را تخریب کند و باعث تسهیل آزاد سازی محتوای آن شود. بنابراین، تخریب سلولی کارآمد و انتقال جرم موثر، دو فاکتور اصلی هستند که باعث افزایش استخراج با اولتراسوند می شود. بر خلاف استخراج کننده های معمولی، عصاره های گیاهی در اثر اولتراسوند، از عرض دیواره های سلولی انتشار پیدا کرده و باعث پاره شدن دیواره سلولی در زمانی کوتاه تر می شود (۹)



شکل۲-پلات سطحی میزان ترکیبات فنولیک در برابر زمان و دما

۳-٤- اثر حلال و زمان بر استخراج ترکیبات فنولیک در روش برگشت حلال (سوکسله)

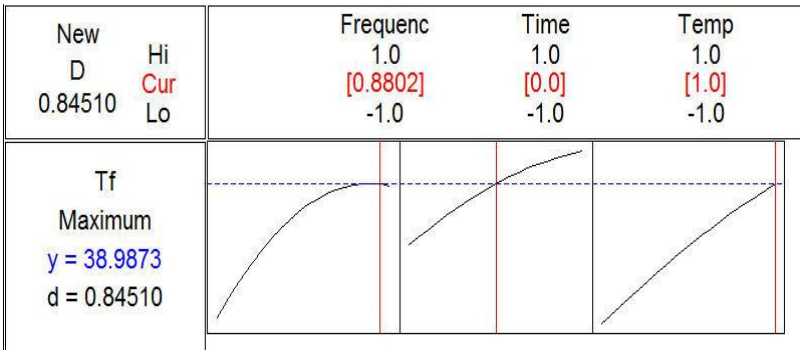
همان طور که در شکل ۳ مشاهده می شود میزان استخراج ترکیبات فنولیک با حلال آب بسیار پایین می باشد و با حلال اتانول بیشترین میزان استخراج وجود دارد و با توجه به پایین بودن نقطه جوش حلال متانول، میزان استخراج ترکیبات فنولیک با حلال متانول در روش سوکسله نسبت به اتانول پایین است. زمان نیز دارای اثر معنی داری بر استخراج ترکیبات فنولیک می باشد و با افزایش زمان میزان استخراج ترکیبات فنولیک افزایش یافته است .



شکل۳- پلات سطحی میزان ترکیبات فنولیک در برابر حلال و زمان

٤-٤- بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیکی در روش استخراج با اولتراسوند

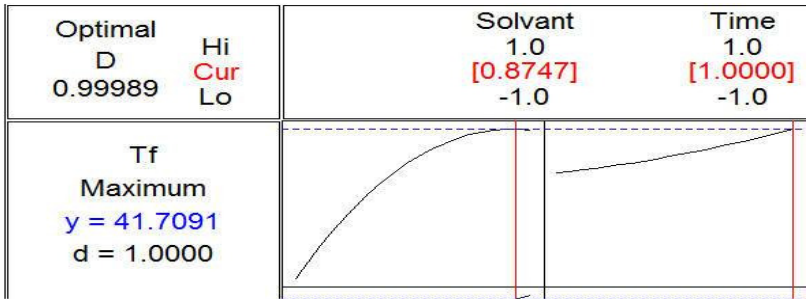
با توجه به شکل ٤ مشاهده می شود میزان مطلوبیت استخراج با استفاده از شرایط بهینه برابر با ٨٤ ٪ می باشد. این مقادیر بهینه در دمای ٥٠°C، زمان ٦٠ دقیقه و فرکانسی مابین ٣٥ Hz و١٣٠Hz بدست آمده است. با توجه به اینکه در مورد اقتصادی کردن استخراج، زمان های پایین و درجه حرارت مناسب مد نظر می باشد و همچنین دماهای بالا اثرات سوئی بر روی ترکیبات فنولیک دارد، نقاط بهینه ی بدست آمده در این حالت را به عنوان نقاط بهینه ی فرایند در نظر می گیریم.



شکل ٥- بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک در روش استخراج با اولتراسونیک

٥-٤- بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک در روش برگشت حلال

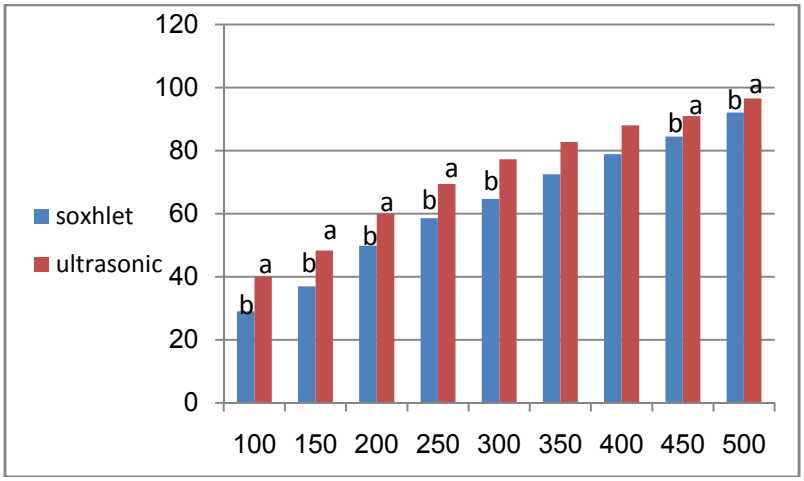
با توجه به شکل ٦مشاهده می شود میزان مطلوبیت استخراج با استفاده از شرایط بهینه برابر با ١٠٠ درصد می باشد. این مقادیر بهینه در زمان ٦ ساعت و حلال اتانول ٨٠ درصد بدست آمده است.



شکل ٦- بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک در روش استخراج با سیستم برگشت حلال

٦-٤- بررسی و مقایسه میزان مهار رادیکال های آزاد DPPH عصاره های بهینه در روش اسخراج با اولتراسوند و سوکسله

همان طور که در شکل ۷ مشاهده می شود تفاوت معنی داری در مهار رادیکال های آزاد در دو روش استخراج با اولتراسونیک و سوکسله وجود دارد و این می تواند به دلیل وجود فرآیند حرارتی بالا در روش سنتی برگشت حلال (سوکسله) و حساس بودن ترکیبات فنولی به دمای بالا باشد که فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره حاصل از استخراج با اولتراسوند نسبت به عصاره حاصل از استخراج با سوکسله بالاتر می باشد.



شکل ۷- میزان مهار رادیکال آزاد عصاره های استخراجی اولتراسونیک و سوکسله

٥- نتیجه گیری کلی

استخراج به کمک اولتراسوند یک روش ساده بوده و جایگزین مناسبی برای روش های سنتی استخراج است. فواید اصلی استفاده از اولتراسوند در استخراج جامد-مایع شامل افزایش بازده استخراج و سرعت استخراج است. اولتراسوند می تواند دمای عملیاتی را کاهش دهد و امکان استخراج ترکیبات حساس به حرارت را فراهم سازد. در مقایسه با تکنیک های استخراج جدید دیگر همچون استخراج با مایکروویو، دستگاه اولتراسوند ارزان تر است و اجرای آن راحتر می باشد. استخراج به کمک اولتراسوند مشابه استخراج با سوکسله می تواند با هر حلالی برای استخراج دامنه وسیعی از ترکیبات طبیعی استفاده شود.

منابع

۱- کمالی سروستانی، ح. ۱۳۷۰. شیرین بیان یکی از شگفتی های طبیعت، سازمان برنامه و بودجه استان فارس، شیراز.

۲- طوعی زاده، خ. ۱۳۲۰. بررسی فرآورده های شیرین بیان ایران، پایان نامه دانشکده دانشگاه داروسازی تهران.

3.Larsan R P, Kronenberg H M, Melmed S, Polonsky Kenneth WS Textbook of Endocrinology. 10th ed Volume 2, Saunders. 2003.

4.Zhang, Y., Meng, T., and Lou, c (1990). Determination of nine flavonoids and coumarins in licorice root by high-perfomance liquid chromatography. J.Chromatog. A, 513, 247-254.

5.Mandal, V., Mohan, Y. and Hemalatha, S. 2007. Microwave Assisted Extraction –An Innovative & Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. Pharmacognosy Reviews. 1: 8-14.

6.Wang, L. and Weller, C.L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends Food Sci. Technol. 17: 300-12.

7- Lin, J.Y., Tang, C.Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101, 140-147.

8.Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., and Nakamura, T .1992 . Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion .Journal of Agricultural and Food Chemistry .40 :945-948.

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