بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولیک از ریشه شیرین بیان به کمک مایکروویو با روش آماری سطح پاسخ

زهره کرمی[۱]، حبیب الله میرزایی[۲]، زهرا امام جمعه[۳]، مرتضی خمیری[٤]، علیرضا صادقی ماهونک[۲]، عماد ایدانی[٥]

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

شیرین بیان (Glycrrhizaglabra) از گیاهان خانواده پروانه آسا می باشد که در گذشته ، هم به عنوان دارو و هم به عنوان غذا مورد استفاده مردم بوده است . اخیراً در مطالعات انجام گرفته اثرات مختلفی از جمله خواص آنتی اکسیدان - ضدمیکروبی - ضد التهاب برای آن کشف شده است. هدف از این تحقیق بررسی تاثیر روش استخراج به کمک امواج مایکروویو بر میزان استخراج ترکیبات فنولیکی ریشه شیرین بیان با ترکیب های ۳ حلال متانول ۸۰ درصد، اتانول ۸۰ درصد و آب، نسبت نمونه به حلال (۲۵-۱) و زمان (min ٦-۲) با روش آماری سطح پاسخ بود. نتایج نشان داد بهترین استخراج ترکیبات فنولیکی در زمان ٤ دقیقه، نسبت ۱:۱۰ نمونه به حلال و اتانول ۸۰ درصد می باشد. سپس فعالیت آنتی اکسیدانی بهترین عصاره با آزمون به دام اندازی رادیکال های DPPH بررسی و با آنتی اکسیدان سنتزی BHT مقایسه گردید. بنابراین ملاحظه شد که روش استخراج به کمک مایکروویو به عنوان یک روش نوین استخراج، راندمان استخراج ترکیبات فنولی بالاتری را داشته و در مقایسه با روش های سنتی، زمان استخراج و میزان حلال کمتری مورد نیاز است.

کلیدواژه: شیرین بیان، ترکیبات فنولیکی، استخراج به کمک ماکروویو، سطح پاسخ

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد z_karami_gua @yahoo.com ، ۰۹۳۷٤۷۰۰۱٦٥
[۲] استادیار habibmirzaei@yahoo.ca ، ۰۹۱۱۱۷۱۹۲۳۲
[۳] دانشیار emamj@ut.ac.ir ، ۰۹۱۲۳۰۰۰۰۸۵
[٤] دانشیار mkhomeiri@yahoo.com ،
[٥] کارشناسی ارشد e_aidani@yaThoo.com ،

۱- مقدمه

شیرین بیان گیاهی چند ساله با نام علمی Glycyrrhiza glabra و از خانواده Leguminosae است که بومی نواحی مدیترانه، جنوب روسیه و آسیا بوده ولی امروزه در سراسر اروپا، خاورمیانه و آسیا کشت می شود. قسمت مورد استفاده این گیاه ریشه آن بوده است که به صورت تجاری از گیاهان خودرو و نیمه خودرو برداشت می شود. ریشه این گیاه حاوی ترکیبات متعددی از خانواده های تری ترپن ساپونین، فلاونوئید، ایزوفلاونوئید، هیدروکسی کومارین، استرول و به مقدار جزئی اسانس است که مهمترین ترکیب موثره آن ماده ای به نام گلیسیریزین می باشد که حدود ۵۰ برابر از شکر شیرین تر است به همین علت عصاره حاصل از این گیاه برای شیرین کردن و طعم دادن به بسیاری از فرآورده ها استفاده می شود. علاوه بر استفاده از این گیاه به عنوان شیرین کننده و طعم دهنده، ریشه شیرین بیان سال های متمادی است که در نقاط مختلف جهان در اختلالات ریوی، گوارشی، کبدی، صفراوی استفاده می شود(۱). همچنین اثرات ضد میکروبی و انتی اکسیدانی آن نیز اثبات شده است. آنتی اکسیدان ها به موادی گفته می شود که قادر به ایجاد تاخیر، کند کردن و حتی توقف فرآیندهای اکسیداسیون می باشند. این ترکیبات می تواند به نحو مطلوبی از تغییر در رنگ و طعم مواد غذایی در نتیجه واکنش های اکسیداسیون جلوگیری کنند(۲). در سال های اخیر استفاده از آنتی اکسیدان های سنتزی، همانند سایر افزودنی های شیمیایی به دلیل سمیت احتمالی و سرطان زایی آن ها، محدود شده است. امروزه بیشتر تحقیقات صورت گرفته در این زمینه بر استفاده از آنتی اکسیدان های جدید و بدون خطر از منابع گیاهی، حیوانی، میکروبی و غذایی تمرکز یافته اند. بیشتر آنتی اکسیدان های طبیعی قابل پذیرش، اجزای غذایی معمولی هستند که انسان همواره آنها را از طریق رژیم غذایی خود مصرف می کند. از مهمترین منابع آنتی اکسیدانی موجود در رژیم غذایی می توان به توکوفرول ها، گلوتاتیون ها، اسید آسکوربیک و نمک های آسکوربات، کارتنوئیدها و ترکیبات فنولی اشاره کرد(۳).با توجه به عوارض مختلف گزارش شده از آنتی اکسیدان های تجاری، در سال های اخیر، تحقیقات بر روی دستیابی به آنتی اکسیدان های سالمتر و موثرتر از منابع طبیعی متمرکز شده است. به همین دلیل در این پژوهش، بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک ریشه شیرین بیان که بیانگر فعالیت آنتی اکسیدانی این گیاه می باشد مورد بررسی قرار گرفته است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- تهیه و آماده سازی گیاه

گیاه شیرین بیان در اواخر تابستان مورد شناسایی گیاه شناسی قرار گرفت و مشخص گردید که از گونه Glycyrrhiza glabra است. پس از آن که برگ های گیاه شروع به زرد شدن نمود ریشه ها در ۲۷ مهر ماه از خاک خارج و پس از تمیز کردن به قطعات کوچک تقسیم شدند و به مدت یک هفته در آون و در دمای ٤٠ درجه سانتی گراد کاملا خشک گردیدند. 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 شیمیایی و وسایل مورد استفاده در این تحقیق عبارتند از:

محلول DPPH (۱و۱ دی فنیل۲-پیکریل هیدرازیل)،.متانول،.اتانول، کربنات سدیم،.فولین،.اسید گالیک. تمام مواد شیمیایی مذکور دارای خلوص بالا بوده و از شرکت مرک تهیه گردیدند.در این تحقیق از مایکروویو خانگی اصلاح شده استفاده و شرایط استخراج به صورت زیر در نظر گرفته شد: نسبت حلال به نمونه ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۲۵، دمای استخراج کمتر از ٤٠ درجه سانتی گراد، ۳ حلال متانول ۸۰ درصد، اتانول ۸۰ درصد و آب، زمان ۲، ٤ و ٦ دقیقه در نظر گرفته شد. در این روش برای

استخراج بهتر توسط امواج مایکروویو نمونه به مدت ۹۰ دقیقه در حلال های مورد نظر بدون هم زدن و در تاریکی خیسانده شدند(٤).

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 ۲/۸ 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(۵).

۲-۳- میزان به دام اندازی رادیکال DPPH

برای این منظور، محلول های با غلظت های مختلف از عصاره ها و نیز آنتی اکسیدان سنتزی BHT درحلال 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 قرار 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(٦):

DPPH ل ۱۰۰×(جذب کنترل–جذب نمونه/ جذب ؛

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 اشعه دادن در سه سطح (۲، ٤ و ٦ دقیقه)، نسبت حلال به نمونه در سه سطح(۱،۱:۱۰ :۱۷/۵، ۱:۲۵)، نوع حلال (اتانول ۸۰ درصد، متانول ۸۰ درصد و آب).

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

جدول ۱-Error! No text of specified style in document. سطوح انتخاب شده برای فاکتورها

فاکتورها/ سطوح	پایین (۱–)	میانی (۰)	بالا (۱+)
زمان (دقیقه)	۲	٤	٦
نسبت نمونه به حلال	۱/۱۰	۱/۱۷/۵	۱/۲۵
حلال	آب	متانول	اتانول

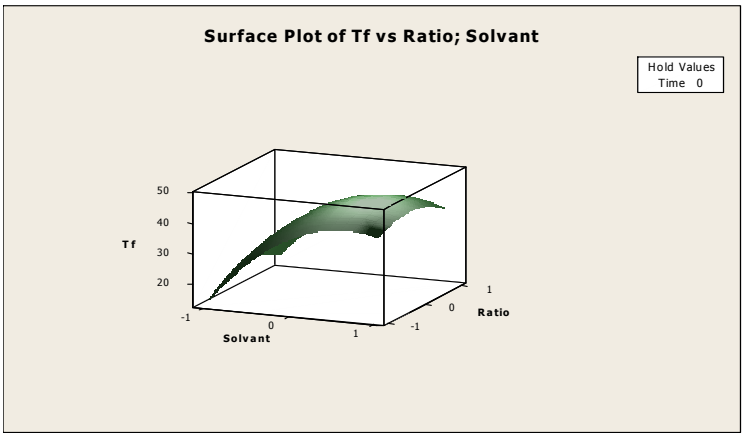
جدول ۲-Error! No text of specified style in document. نقاط انتخاب شده برای اُپتیمم سازی

اهمیت	حد بالا	هدف	حد پایین	مقصود	پاسخ
۱	٤٦	–	۹/۷	بیشترین	**Tf**

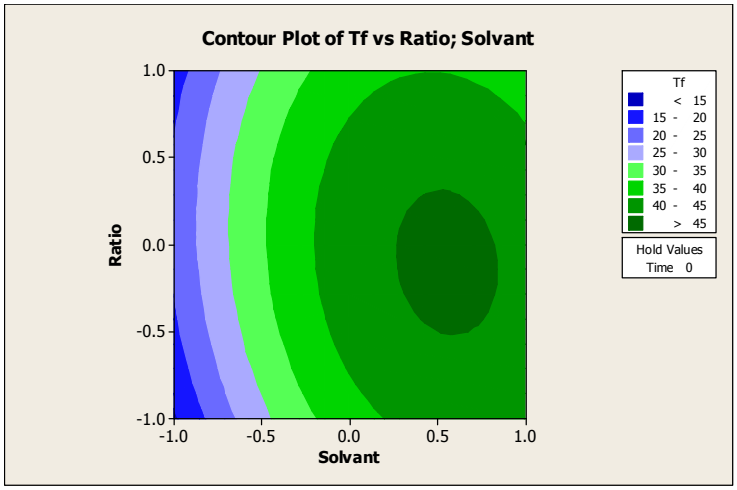
٤–نتایج و بحث

٤–۱– اثر نوع و نسبت حلال بر میزان ترکیبات فنولیک

همان طور که در شکل ۱ و ۲ مشاهده می شود اثر نوع حلال بر میزان استخراج ترکیبات فنولیک معنی دار است و بیشترین میزان استخراج مربوط به حلال های اتانول و متانول به میزان ٤٦ میلی گرم در هر گرم عصاره بود. نسبت حلال تاثیر معنی داری بر استخراج ترکیبات فنولیک نداشت.همچنین تحقیقات زیادی در زمینه استخراج ترکیبات فنولیک با سامانه های مختلف حلال از منابع گیاهی دیگر انجام شده است. یو و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند، مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده از پوسته بادام زمینی توسط اتانول (۸۰ درصد)، متانول (۸۰ درصد) و آب به ترتیب ۸۹/۹، ۹۰/۱ و ٥٦/۷ میلی گرم در هر گرم عصاره بود.



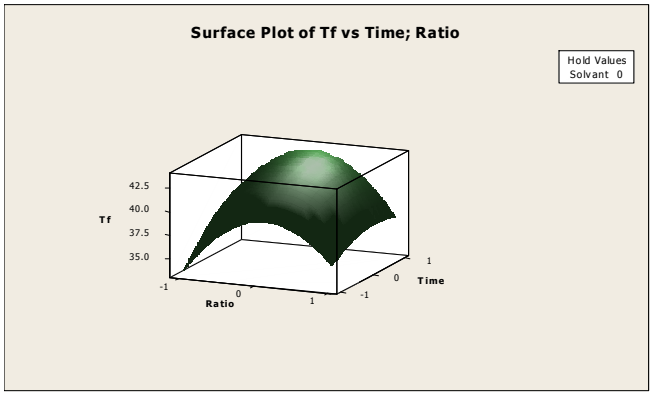
شکل ۱– پلات سطحی میزان ترکیبات فنولیک در برابر نسبت و نوع حلال



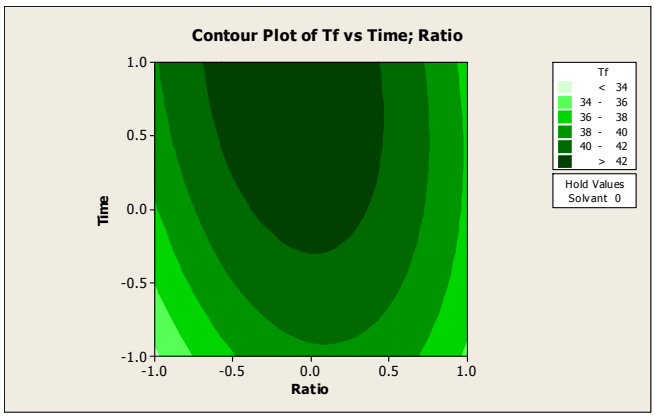
شکل ۲– پلات خطی میزان ترکیبات فنولیک در برابر نسبت و نوع حلال

٤ – ۲– اثر زمان و نسبت حلال به نمونه بر میزان استخراج ترکیبات فنولیک

همان طور که در شکل ۳و ٤ ملاحظه می شود زمان تاثیر معنی داری بر استخراج ترکیبات فنولیک داشته است و با افزایش زمان میزان استخراج ترکیبات فنولیک افزایش می یابد. همچنین نسبت حلال تاثیر معنی داری بر استخراج ترکیبات فنولیک نداشته است. در بررسی تحقیقات مشابه *Proestos & komaitis* (۲۰۰۸) میزان استخراج ترکیبات فنولی کل را به کمک امواج مایکروویو برای گیاهان *Rosmarinus officinalis*، *Origanum dictamnus*، *Styrax officinalis*، *Origanum majorana*، *Vitex agnus-cactus* و *Teucrium polium* به ترتیب ۱۸/٤، ۱٤/۱، ۲۰/۳، ۱۷/۲، ۱/۸، ۱۱/۱ میلی گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک با استفاده از حلال آب (حلال استخراجی) گزارش کردند. همچنین در بررسی زمان های مختلف اشعه دهی امواج مایکروویو (۱ تا ۱۰ دقیقه) برای استخراج پلی فنول ها و کافئین از برگ های چای سبز، زمان ٤ دقیقه بیشترین میزان استخراج را برای هر دو ترکیب داشت. همچنین پان و همکاران (۲۰۰۰) بهترین شرایط استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان به کمک مایکروویو را در زمان ٥–٤ دقیقه و نسبت حلال به نمونه ۱:۱۰ گزارش کردند (۹). اصول حرارت دهی با استفاده از انرژی مایکروویو به اثرات مستقیم امواج مایکروویو روی مولکول ها با مکانیسم های چرخش دوقطبی و انتقال یونی وابسته است .مولکول های قطبی(همچون پلی فنل ها) و محلول های یونی،انرژی مایکروویو را به دلیل داشتن گشتاور دوقطبی دائمی به میزان زیادی جذب می کنند که منجر به افزایش دما وتکمیل سریع واکنش می شود و این امر موجب انتقال سریع انرژی به حلال استخراجی و مواد گیاهی خام میشود. بنابراین بر هم کنش مستقیم امواج مایکروویو با حلال منجر به شکست دیواره های سلولی و آزاد سازی سریع مواد درون سلولی به حلال می شود .همچنین در زمان های بالاتر اشعه دهی امواج مایکروویو ممکن است به دلیل تخریب حرارتی، میزان استخراج ترکیبهای فنولی کاهش یابد(۷) .



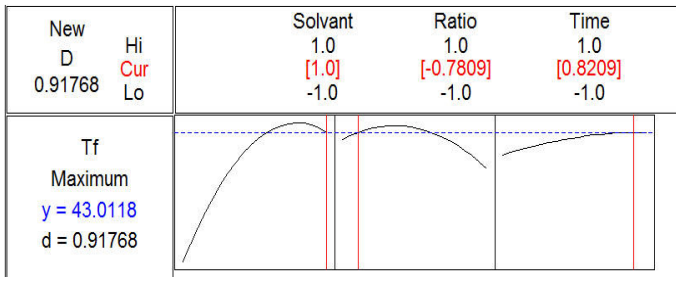
شکل۳– پلات سطحی میزان ترکیبات فنولیک در برابر زمان و نسبت حلال



شکل٤– پلات خطی میزان ترکیبات فنولیک در برابر زمان و نسبت حلال

٤-٣- بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیکی

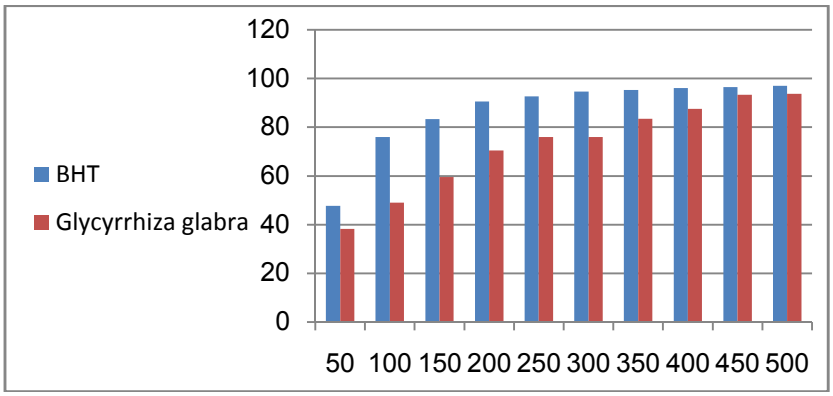
با توجه به شکل۵ مشاهده می شود میزان مطلوبیت استخراج با استفاده از شرایط بهینه برابر با ۹۱ ٪ می باشد. این مقادیر بهینه در دمای ٤-٥ دقیقه،نسبت ۱:۱۰ در رابطه با حلال اتانول و متانول مشاهده شد اما با توجه به غیر سمی بودن حلال اتانول نسبت به متانول، حلال اتانول به عنوان بهترین حلال در نظر گرفته شد. با توجه به اینکه در مورد اقتصادی کردن استخراج، زمان های پایین و و مصرف مواد شیمیایی پایین تر مناسب می باشد نقاط بهینه ی بدست آمده در این حالت را به عنوان نقاط بهینه ی فرایند در نظر گرفته می شود.



شکل۵-بهینه سازی ترکیبات فنولیک

٤-٤-میزان مهار رادیکال های آزاد

نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی با آزمون به دام اندازی رادیکال DPPH نشان داد (شکل ٦) که غلظت های ۵۰۰ پی پی ام و بالاتر عصاره شیرین بیان با فعالیت آنتی اکسیدانی BHT رقابت می کند و کارایی غلظت های پایین تر عصاره در فعالیت آنتی اکسیدانی نسبت به آنتی اکسیدان سنتزی کمتر بود. اثر مهار رادیکال های آزاد توسط عصاره های حاصل از گیاهان در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است (۱۰و۱۱).



منابع:

1.Blumenthal M, Goldberg A and Brinckmann J.Herbal Medicine, Expanded Commission E Monographs. 1st ed. Integrative Medicine Communications. USA. 2000, pp: 233 – 5.

2.Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J .and Arouma, O.I .1995 .The characterization of antioxidants .Food Chemistry and Toxicology .33 :601-617.

3.Pokorny, J .2007 .Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidant?.European Journal of Lipid Science and thechnology .109 :629-642.

4.Xuejun Pan, Guoguang Niu, Huizhou Liu. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. Chemical Engineering and Processing 42 (2003) 129_ 133.

5- 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.

6- 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.

7.Proestos, C. and Komaitis, M. 2008. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds.Lebensm.Wiss.u.Technol. 41: 652–659.

8.Yu, J., Ahmedna, M., and Goktepe, I. 2005. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. Food Chemistry, 90: 199-206.

9.Pan, X., Liu, H., Jia, G. and Shu, Y.Y. 2000. Microwave assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. Biochemical Engineering Journal. 5: 173-77.

10-Ahmadi, F., Kadivar, M., and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff in model and food systems. Food Chemistry, 105: 57-64.

11-Iqbal, S., and Bhanger, M.I. 2007. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. Food Chemistry, 100: 246-254.

Abstract

Licorice (*Glycyrrhiza glabra)* roots and rhizomes are extensively used in herbal medicines for their emollient, anti-inflammatory, anti-viral, anti-allergic, anti-oxidant, gastro-protective, and anticancerous properties. It is widely used worldwide in food, confectionery and pharmaceutical products, such as cough syrups, herbal supplements, chewing gums, drinks, and candy. It is a powerful natural sweetener, 50-170 times sweeter than sucrose. The effect of microwave- assisted extraction (MAE) methods on the content of phenolic compounds extracted from liquorice with 3 different solvents (water, methanol 80% and ethanol 80%), liquid/solid ratio (10:1, 17.5:1, 25:1) and time (2-6 min) has been investigated by the aim of Response surface method . The results showed that extraction of phenolic compounds at the time of 4 min, liquid/solid ratio of 10:1(ml/g) and ethanol 80% was the best extraction condition. Then the antioxidant activity of the best extract was investigated by the DPPH test and was compared with BHT. The highest antioxidant content was extracted with MAE method, and the rate of extraction was very high compared with traditional extraction methods.

Keywords: Glycyrrhiza glabra, Phenolic compounds, Microwave assisted extraction, RSM