مجله الکترونیک فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد دوم، شماره چهارم، زمستان ۸۹
۵۵-۳۳
http://ejfpp.gau.ac.ir

مدل‌سازی و بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولیک از ریشه شیرین‌بیان به کمک امواج مایکروویو

زهره کرمی[۱]، حبیب‌اله میرزائی[۲]، زهرا امام جمعه[۳]، *علیرضا صادقی ماهونک[۲]، مرتضی خمیری[۴] و عماد آیدانی[۵]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و 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 صنایع غذایی، دانشگاه تهران، [۴]دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۵]دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه صنایع غذایی، دانشگاه سبزوار

تاریخ دریافت:۹۰/۱۲/۱۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۲۸

چکیده

در این پژوهش از روش سطح پاسخ جهت بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولیک و بازدهی عصاره از ریشه شیرین‌بیان با استفاده از امواج مایکروویو استفاده شد. فاکتورهای مورد بررسی در این روش، حلال (متانول ۸۰ درصد، اتانول ۸۰ درصد و آب)، زمان (۲، ٤ و ٦ دقیقه) و نسبت حلال به نمونه (۱ :۱۰، ۱ :۱۷/۵ و ۱ :۲۵) بودند. آزمایش‌ها بر اساس طرح کامپوزیت مرکزی انجام شد. نتیجه‌های نشان داد شرایط استخراج تاثیر معنی‌داری بر استخراج ترکیبات فنولیک و بازدهی عصاره داشته است. شرایط بهینه در این روش با حلال اتانول ۸۰ درصد، زمان ٦-۵ دقیقه و نسبت حلال به نمونه ۱: ۱٦/۵ به‌دست آمد و مقادیر ترکیبات فنولیک و بازدهی عصاره در این شرایط به‌ترتیب ٤۷/٤۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک ریشه شیرین‌بیان و ۱٦/۳۸ درصد تعیین شد. همچنین در این پژوهش فعایت آنتی‌اکسیدانی عصاره بهینه به‌دست آمده با روش‌های DPPH، قدرت احیاکنندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل محاسبه شد و با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT مقایسه شد.

واژه‌های کلیدی: مدل‌سازی، بهینه‌سازی، استخراج به کمک مایکروویو، شیرین‌بیان، RSM

*مسئول مکاتبه: sadeghiaz@yahoo.com

مقدمه

شیرین‌بیان یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی از لحاظ اقتصادی است که به‌صورت گسترده مورد پژوهش قرار گرفته است [۳]. این گیاه متعلق به تیره اصلی بقولات[۱] و تیره فرعی پروانه‌واران[۲] و از راسته گل‌سرخیان[۳] است. بیش از ۳۰۰ فلاونوئید تاکنون از گونه‌های شیرین‌بیان جداسازی شده است. این فلاونوئیدها انواع مختلف دارند که شامل: فلاوانون‌ها[٤] یا فلاوانونول‌ها[٥]، کلکون‌ها[٦]، ایزوفلاوان‌ها[۷] و ایزوفلاوانون‌ها[۸] می‌باشند. از میان آن‌ها فلاوانون‌ها و کلکون‌ها از انواع اصلی هستند. روش‌های مختلف استخراج به‌طور وسیع به‌منظور به‌دست آوردن چنین ترکیب‌های طبیعی باارزش مورد بررسی قرار گرفته‌اند. روش‌های سنتی استخراج مانند روش غرقابی و سوکسله نیاز به‌صرف زمان طولانی ومقدارحلال زیادی دارند، همچنین ازلحاظ دمایی ایمن نبوده و باعث تجزیه تعدادی از ترکیبات موجود می‌گردند بنابراین نیاز به روش‌های استخراج جدید با زمان استخراج کوتاه‌تر، مصرف حلال آلی کم‌تر و ایجاد آلودگی کم‌تر، افزایش یافته است. روش‌های استخراج جدید مانند استخراج به کمک اولتراسونیک و مایکروویو روش‌های سریع و مؤثری برای استخراج ترکیب‌های موثره ازبافت‌های گیاهی می‌باشند [٢٤].

در سال‌های اخیر استفاده از امواج مایکروویو در استخراج نتیجه‌های ارزنده‌ای را ارائه داده است. این روش باعث افزایش بازده استخراج در زمان کم‌تر و با استفاده از حلال کم‌تر، افزایش مقدار ترکیبات استخراج شده و آسیب کم‌تری به محیط زیست می‌گردد [۵، ۱۷، ۱]. اصول استخراج با مایکروویو به‌این گونه است که یک نمونه و حلال مناسب آن (یا مخلوطی از حلال‌ها) در یک ظرف قرار داده شد. سپس به‌وسیله امواج مایکروویو گرم می‌شوند. بعد از حدود ۵ تا ۲۰ دقیقه استخراج به اتمام می‌رسد و اجازه داده می‌شود تا مخلوط سرد گردد. سپس مخلوط نمونه و حلال برداشته شده و فیلتر می‌گردد. ظرفیت گرم‌شدن نیز بستگی به خصوصیات حلال در جذب امواج مایکرویو دارد.

1- Leguminoseae
2- Fabaceae
3- Rosales
4- Flavanones
5- Flavanonols
6- Chalcones
7- Isoflavones
8- Isoflavanones

حلال‌های قطبی انرژی مایکروویو را بهتر جذب می‌کنند زیرا آن‌ها ملکول‌هایی با دوقطبی ثابت دارند اما حلال‌های غیرقطبی مانند هگزان وقتی در معرض مایکروویو قرار می‌گیرند گرم نمی‌شوند اما می‌توانند در ترکیب با حلال‌های قطبی به‌کار روند تا ویژگی گرم شدن آن‌ها بهبود یابد. مخلوطی از حلال‌ها که در استخراج با مایکروویو (MAE)[1] استفاده می‌گردند شامل استونیتریل/ متانول، هگزان/ استن، اتیل استات/ سیکلوهگزان و ایزواکتان/ استن می‌باشند [۲۱].

دست‌یابی به حداکثر راندمان استخراج دارای اهمیت بسیاری است که این نیز بستگی به بهینه‌سازی شرایط استخراج دارد. هدف از این پژوهش بررسی عوامل مختلف بر استخراج ترکیبات فنولیک ریشه شیرین‌بیان با استفاده از امواج مایکروویو و در ادامه بهینه‌سازی شرایط استخراج با استفاده از روش RSM می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش: ریشه شیرین‌بیان در فصل پاییز ۱۳۸۹ (۲۰ مهر) از ایستگاه تحقیقات کشاورزی گرگان تهیه شد. مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش کربنات سدیم، متانول، اتانول، اسید گالیک، DPPH، فولین سیوکالته، اسیدسولفوریک، پتاسیم‌فری سیانید، تری کلرواستیک، فسفات سدیم، آمونیوم مولیبدات و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بودند. تمامی مواد مورد استفاده دارای خلوص بالایی بوده و از شرکت‌های معتبر (مرک و سیگما) خریداری شدند.

آماده‌سازی ریشه شیرین‌بیان: ریشه‌های مرطوب شیرین‌بیان پس از تمیز شدن و گرفتن گل و لای آن، با قیچی باغبانی به قطعات کوچک‌تری بریده و در آون (ممرت[2] مدل ۸۰۰-۱۰۰-آلمان) با دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ هفته خشک شدند. ریشه‌های خشک‌شده با آسیاب چکشی پودر و در کیسه‌های پلی‌اتیلن در فریزر (دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

استخراج به کمک مایکروویو: در این روش از مایکروویو خانگی (CE3260F CE3260FS) طبق روش میرزاپور و همکاران [۸]. استفاده گردید. در این روش ۵ گرم نمونه با نسبت‌های مختلف نمونه به حلال (۱:۱۰، ۱ :۱۷/۵ و ۱:۲۵) و حلال (آب، متانول ۸۰ درصد، اتانول ۸۰ درصد) مخلوط گردید. مخلوط سپس با امواج مایکروویو در زمان‌های مختلف (۲، ٤، ٦ دقیقه) و توان ۱۵۰ وات اشعه‌دهی

1- Microwave assisted extraction
2- Memert 100-800

شد (برای کنترل دما، زمان به‌صورت متناوب اعمال شد؛ به‌این ترتیب که بعد از هر دقیقه تابش امواج مایکرویو نمونه تا رسیدن به دمای کم‌تر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد دریخچال قرارداده شد). در این روش برای استخراج بهتر توسط امواج مایکروویو نمونه به‌مدت ۹۰ دقیقه درحلال مربوطه بدون هم‌زدن خیسانده شد. عصاره‌های به‌دست آمده با استفاده از کاغذ صافی از موادگیاهی جدا گردیدند [۱۰].

محاسبه بازده استخراج: حلال موجود در عصاره حاصل از روش‌های مختلف استخراج توسط دستگاه تبخیر در خلا چرخشی (هایدولف، مدل لابوراتا [1] ٤۰۰۰) تبخیر و در آون تحت خلا (هریوس، M-۳۰۰۱، آلمان) خشک گردید. با محاسبه وزن اولیه بالن و وزن نهایی آن که حاوی ماده خشک بر جای مانده است، مقدار کل ماده خشک استخراج شده در مرحله استخراج محاسبه شد و به‌صورت درصد (گرم به صد گرم نمونه خشک) بیان گردید.

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل: مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره ریشه شیرین‌بیان توسط رنگ‌سنجی به روش فولین- سیوکالته [2] مورد بررسی قرار گرفت. در این روش مقدار کل ترکیبات فنولی بر اساس یک ترکیب فنولی انتخاب شده، بیان می‌گردد و در اغلب مواقع این ترکیب اسید گالیک بوده و نتیجه‌های آن به‌صورت اکی‌والانت اسید گالیک بیان می‌گردد. پس از تهیه عصاره، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره در لوله آزمایش ریخته، سپس ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به عصاره اضافه کرده و با ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین- سیوکالته (که به‌نسبت ۱۰:۱با آب مقطر رقیق شده بود) و ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۲ درصد به خوبی مخلوط شد. نمونه‌ها به‌مدت نیم ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس مقدار جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (سسیل [3] (CE 2502) در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. مقدار کل ترکیبات فنولی با استفاده از معادله خط رسم شده برای اسید گالیک [4] بر مبنای اسید گالیک و به‌صورت میلی‌گرم در گرم نمونه خشک بیان گردید [٦]. معادله خط رگرسیونی که رابطه غلظت اسیدگالیک را با میزان جذب محلول‌ها در ۷۵۰ نانومتر نشان می‌دهد به‌صورت زیر به‌دست آمد. در این معادله Y مقدار جذب و X مقدار ترکیبات فنولی بر اساس اکی والانت اسید گالیک را نشان می‌دهد.

$Y=۰/۰۰۰۸x+۰/۰٦٤۹$ $R^2=۰/۹۹۷٦$

1- Heidolph LABOROTA 4000
2- Folin-Ciocalteu
3- Cecil
4- Gallic acid

ارزیابی میزان مهار رادیکال‌های آزاد[1]: میزان مهار رادیکال‌های دی پی‌پی‌اچ (DPPH)، با روش شیمادا و همکاران [۱٦] مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، محلول‌هائی با غلظت‌های ۵۰۰-۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از تمامی عصاره‌ها و نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در حلال متانول آماده شدند. روش آزمایش به‌این صورت بود که یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار) به ۳ میلی‌لیتر از عصاره افزوده و مخلوط به‌دست آمده به‌شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به‌مدت 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 میلی‌لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (درصد)} = \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100$$

که در این رابطه A_c و A_s به‌ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند.

قدرت احیاکنندگی[2]: توانایی عصاره‌ها برای احیاء یون‌های آهن سه ظرفیتی با روش یلدریم و همکاران [۲٦] اندازه‌گیری شد. برای این منظور، محلول‌هایی با غلظت ۲۰۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های پودر شده در حلال‌های مربوطه و نیز BHT تهیه گردید. ۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره یا آنتی‌اکسیدان سنتزی با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=٦/٦) و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید (۱۰ گرم در لیتر) مخلوط شد و به‌مدت نیم ساعت در حمام آب با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد (وزنی: حجمی) نمونه‌ها ۱۰ دقیقه با دور g ×۱٦۵۰ سانتریفوژ (سنتوریون مدل کا ۲۰٤۲[3]) شدند پس از سانتریفوژ از محلول بالائی ۲/۵ میلی‌لیتر به‌دقت برداشته و پس از افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید.

1- Free Radical scavenging activity
2- Reducing power
3- Centurion K2042

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل[1]: برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ها از روش پرایتو و همکاران [١٤] استفاده شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT با غلظت‌های مختلف (۲۰۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر از معرف (اسید سولفوریک ۰/٦ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ٤ میلی‌مولار) در لوله آزمایش مخلوط شد و به‌مدت ۱/۵ ساعت در حمام آب با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد کردن، جذب نمونه‌ها در طول موج ٦۹۵ نانومتر قرائت گردید. در نمونه شاهد به‌جای عصاره از ۰/۱ میلی‌لیتر متانول استفاده شد. نحوه آماده‌سازی معرف به‌این صورت بود که پس از آماده‌سازی محلول اسید سولفوریک ۰/٦ مولار، مقادیر محاسبه شده از فسفات سدیم و آمونیوم مولیبدات برای رسیدن به غلظت موردنظر در یک لیتر معرف، به‌صورت جداگانه در اسید سولفوریک حل شدند. سپس این دو محلول با هم ادغام و مخلوط به‌دست آمده با باقی‌مانده اسید سولفوریک به حجم یک لیتر رسانده شد.

طرح آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری: روش سطح پاسخ مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری است که در بهینه‌سازی فرآیندهایی به‌کار می‌رود که پاسخ موردنظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تاثیر قرار می‌گیرد. شمای گرافیکی مدل ریاضی سبب تعریف واژه‌ی روش سطح پاسخ شده است. با کمک این طرح آماری، تعداد آزمایش‌ها کاهش یافته و کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و اثر متقابل فاکتورها، قابل برآورد هستند. مهم‌ترین مسئله این پژوهش بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورها بود، از این‌رو طرح آماری سطح پاسخ انتخاب شد [۹]. در این مطالعه اثر متغیر های مستقل شامل: زمان (X_1)، نسبت حلال به نمونه (X_2) و حلال (X_3) در سه سطح مورد ارزیابی قرار گرفت.

مدل مورد استفاده در روش سطح پاسخ عموما رابطه‌ی درجه دوم می‌باشد. در روش سطح پاسخ برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می‌نماید، مدل چند متغیره به‌صورت معادله سه می‌باشد. در معادله یادشده، Y پاسخ پیش بینی‌شده، β_0 ضریب ثابت، β_1، β_2، β_3 ضرایب خطی، β_{33}، β_{22}، β_{11} اثرات مربعی و β_{23}، β_{13}، β_{12} اثرات متقابل می‌باشند.

$$Y= \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_1X_{12} + \beta_2X_{22} + \beta_3X_{32} + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3$$

1- Total antioxidant capacity

در این پژوهش از طرح مرکب مرکزی با سه متغیر مستقل شامل زمان، نسبت حلال به نمونه و حلال، در سه سطح، یک بلوک و شش تکرار در نقطه مرکزی طرح (برای محاسبه تکرار پذیری فرآیند) جهت بررسی تاثیر شرایط استخراج ترکیبات فنولیک، بازدهی عصاره و بهینه‌سازی فرآیند یادشده استفاده شد. آنالیز سایر داده‌ها با نرم‌افزار SAS و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

نتیجه و بحث

بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولیک و بازدهی عصاره از ریشه شیرین‌بیان با روش مایکروویو: بررسی داده‌ها توسط روش سطح پاسخ: با توجه به نقاط تعریف شده در طرح RSM، آزمون‌های مربوطه انجام شد. در جدول‌های ۱، ۲ و ۳ نتایج انجام آزمون‌های تعیین میزان ترکیبات فنولیک و بازدهی عصاره ریشه شیرین‌بیان ارائه شده است. در مرحله‌ی بعدی داده‌های به‌دست آمده از آزمون‌های مختلف توسط روش سطح پاسخ آنالیز گردیدند. ضرایب رگرسیونی تخمین زده شده و جدول تجزیه‌ی واریانس برای هر یک از پاسخ‌ها مطابق جدول‌های ٤، ٥ و ٦ بود.

جدول ۱- نتیجه‌های آزمون‌ها در نقاط مشخص شده با طرح کامپوزیت مرکزی با حلال متانول.

تیمار	زمان (دقیقه) x_1	نسبت حلال به نمونه (X_2)	ترکیبات فنولی کل(میلی‌گرم)	بازدهی‌عصاره(درصد)
۱	٦	۱۷/٥	٤۳/٥٥	۱٤/٥۰
۲	٤	۱۰	۳۷/٦	۱۲/٥۲
۳	۲	۱۰	۳۲/۸	۱۲/۸۱
٤	٤	۱۷/٥	٤۲/۹۹	۱٤/۳۱
٥	۲	۲٥	۳۳/۱۹	۱۲/۹٦
٦	٤	۱۷/٥	٤۲	۱۳/۹۸
۷	٤	۱۷/٥	٤۲/٤۳	۱٤/۱۰
۸	٤	۱۷/٥	٤۳/۱٥	۱٤/۳۰
۹	٤	۱۷/٥	٤۳	۱٤/۳٥
۱۰	٦	۲٥	۳۷/٤۱	۱٤/٦۱
۱۱	٤	۲٥	۳٦/۸۸	۱۳/۸٥
۱۲	۲	۱۷/٥	۳۸/٦٤	۱۲/۸٦
۱۳	٦	۱۰	٤۱/۸۹	۱٦/۳٦

جدول ۲- نتیجه‌های آزمون‌ها در نقاط مشخص‌شده با طرح کامپوزیت مرکزی با حلال اتانول.

تیمار	زمان (دقیقه) x_1	نسبت حلال به نمونه	ترکیبات فنولی کل (میلی‌گرم بر گرم)	بازدهی عصاره(درصد)
۱	٦	۱۷/٥	٤۷/٤۳	۱٦/٥۰
۲	٤	۱۰	٤۱/۷۳	۱٤/۳٥
۳	۲	۱۰	۳٦/٤۸	۱۱/۸۳
٤	٤	۱۷/٥	٤٦/۱٥	۱٥/۳
٥	۲	۲٥	۳٥/۹٥	۱۳/۷
٦	٤	۱۷/٥	٤٦/۱۷	۱٥/۷۸
۷	٤	۱۷/٥	٤٦	۱٥/٥
۸	٤	۱۷/٥	٤٥/۹٥	۱٥/۸۱
۹	٤	۱۷/٥	٤٦/۱۸	۱٥/٥۸
۱۰	٦	۲٥	٤۰/۸۳	۱٥
۱۱	٤	۲٥	۳۹/۸۸	۱٤/۹۸
۱۲	۲	۱۷/٥	٤۱/۰۷	۱۳/۸۷
۱۳	٦	۱۰	٤۳/٥۳	۱٥/٥۰

جدول ۳- نتیجه‌های آزمون‌ها در نقاط مشخص‌شده با طرح کامپوزیت مرکزی با حلال آب.

تیمار	زمان (دقیقه) x_1	نسبت حلال به نمونه	ترکیبات فنولی کل (میلی‌گرم بر گرم)	بازدهی‌عصاره (درصد)
۱	٦	۱۷/٥	۱۹/٦۸	۸/۳
۲	٤	۱۰	۱۷/۸۸	۷/٥۲
۳	۲	۱۰	۱٦/٥	٦/۸۳
٤	٤	۱۷/٥	۱۸/٥	۷/۹٦
٥	۲	۲٥	۱٦/٦۱	٦/٥
٦	٤	۱۷/٥	۱۸/٥۲	۷/۹
۷	٤	۱۷/٥	۱۸/٥٤	۷/۸۸
۸	٤	۱۷/٥	۱۸/٥٥	۷/۸۷
۹	٤	۱۷/٥	۱۸/۳	۷/۹۳
۱۰	٦	۲٥	۱۹	۸
۱۱	٤	۲٥	۱۸/۲	۷/۱۲
۱۲	۲	۱۷/٥	۱٦/۸٤	۷/۰۹
۱۳	٦	۱۰	۱۸/۸٥	۷/۸٥

آنالیز سطح پاسخ ترکیبات فنولی کل (TPC): آنالیز سطح پاسخ داده‌ها در جدول‌های ٤، ٥ و ٦ نشان داد که روابط بین TPC و پارامترهای استخراج از نوع درجه دوم با ضریب رگرسیون مناسب (R^2) می‌باشد. رابطه‌های ١ (مربوط به حلال متانول)، ٢ (مربوط به حلال اتانول) و ٣ (مربوط به حلال آب)روابط بین TPC و پارامترهای استخراج را نشان می‌دهد.

رابطه ١ $Y_1=42/61+3/03X_1-0/801X_2-1/28X_1^2-5/13X_2^2-1/21X_1X_2$

رابطه ٢ $Y_1=46/05+3/04X_1-0/8X_2-1/72X_1^2-5/17X_2^2-0/54X_1X_2$

رابطه ٣ $Y_1=12/79+1/18X_1-0/22X_2-0/006X_2^2$

جدول ٤- جدول تجزیه واریانس برای ترکیبات فنولی کل و بازدهی عصاره ریشه شیرین‌بیان با حلال متانول.

	درجه آزادی	ترکیبات فنولی کل		بازدهی	
		ضریب رگرسیون	عدد P	ضریب رگرسیون	عدد p
مدل	٥	٤٢/٦١	٠/٠٠٠	١٤/١٩	٠/٠٠٠
X_1	١	٣/٠٦	٠/٠٠٠	١/٠١	٠/٠٠٠
X_2	١	−٠/٨٠	٠/٠١٨	−٠/٢٦٦	٠/٠٢
X_1^2	١	−١/٢٨	٠/٠١٣	−٠/٤٣١	٠/٠١٣
X_2^2	١	−٥/١٣	٠/٠٠٠	−١/٧١	٠/٠٠٠
X_1X_2	١	−١/٢١	٠/٠٠٧	−٠/٤٠٥	٠/٠٠٨
Lack of fitness	٥		٠/١٧٦		٠/١٨٦
R^2		٠/٩٨٤		٠/٩٨٣	
Adj-R^2		٠/٩٧٢		٠/٩٧١	
CV		٠/٦٤١		٠/٢١٨	

جدول ٥- جدول تجزیه واریانس برای ترکیبات فنولی کل و بازدهی عصاره ریشه شیرین‌بیان با حلال اتانول.

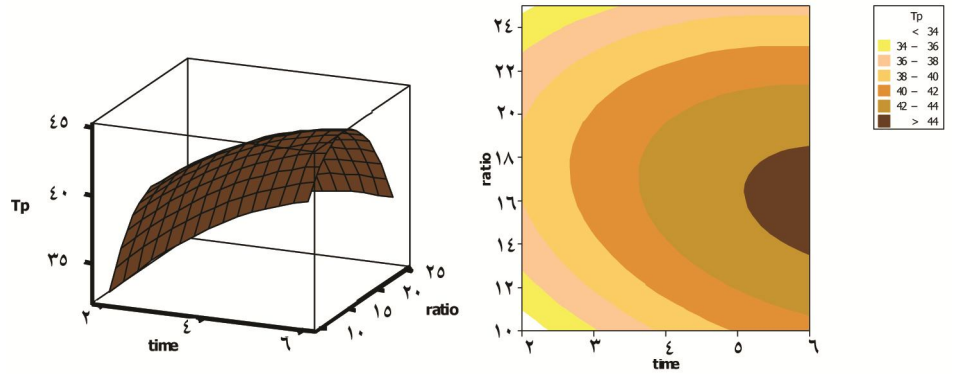
	درجه آزادی	ترکیبات فنولی کل		بازدهی	
		ضریب رگرسیون	عدد P	ضریب رگرسیون	عدد p
مدل	٥	٤٦/٠٥	٠/٠٠٠	١٥/٦٢	٠/٠٠٠
X_1	١	٣/٠٤	٠/٠٠٠	١/٢٦٦	٠/٠٠٠
X_2	١	−٠/٨٠	٠/٠٠٠	٠/٣٣٣	٠/٠٠٣
X_1^2	١	−١/٧٢	٠/٠٠٠	−٠/٥٢٩	٠/٠٠٢
X_2^2	١	−٥/١٧	٠/٠٠٠	−١/٧١	٠/٠٠٠
X_1X_2	١	−٠/٥٤	٠/٠٠٠	−٠/٤٠٥	٠/٠٠٨
Lack of fitness	٥		٠/١٤٩		٠/٧٧٢
R^2		٠/٩٩٩		٠/٩٨٧	
Adj-R^2		٠/٩٩٩		٠/٩٧٨	
CV		٠/١٤٨١		٠/١٨٤	

جدول ٦- جدول تجزیه واریانس برای ترکیبات فنولی کل و بازدهی عصاره ریشه شیرین‌بیان در روش مایکروویو با حلال آب.

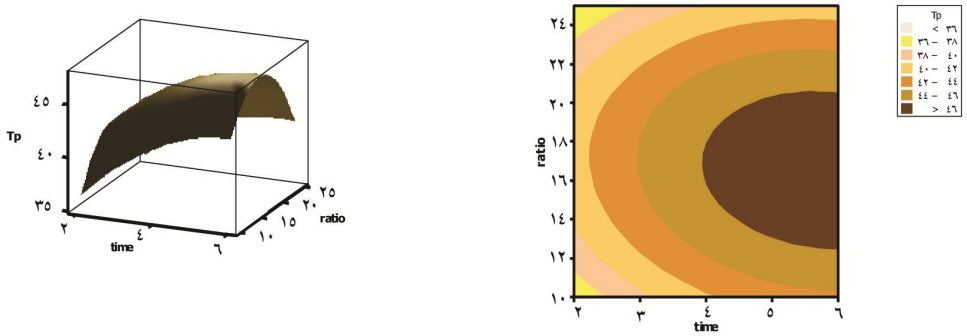
	درجه آزادی	ترکیبات فنولی کل		بازدهی	
		ضریب رگرسیون	عدد P	ضریب رگرسیون	عدد p
مدل	٥	١٢/٧٩	٠/٠٠٠	٤/٢٢	٠/٠٠٠
X_1	١	١/١٨٤	٠/٠٠٦	٠/٤١٥	٠/٠١٤
X_2	١	٠/٢٢٢	٠/٠٤١	٠/٢٦٤	٠/٠٠٠
X_1^2	١	−٠/٠٦٥	٠/٠٨٩	−٠/٠٣	٠/٠٦
X_2^2	١	−٠/٠٠٦	٠/٠٣٧	−٠/٠٠٨	٠/٠٠٠
X_1X_2	١	−٠/٠٠١	٠/٨٩٦	٠/٠٠٨	٠/٠٣٩
Lack of fitness	٥		٠/٥٩٨		٠/٠١٤
R^2		٠/٩٦٩		٠/٩٨	
Adj-R^2		٠/٩٤٧		٠/٩٤	
CV		٠/٢٢١٥		٠/٠١٤	

شکل‌های ۱ و ۲ نمودار فضایی و سطحی اثر زمان استخراج و نسبت حلال به نمونه، بر روی میزان ترکیبات فنولی کل با حلال متانول و اتانول را نشان می‌دهد. در هر دو حلال نسبت حلال به نمونه، اثر معنی‌دار درجه اول و دوم به‌صورت نزولی در حالی که زمان استخراج اثر معنی‌دار درجه اول را به‌صورت صعودی ولی اثر درجه دوم را به‌صورت نزولی بر روی میزان استخراج ترکیبات فنولی کل (TPC) نشان داد. به‌طور کلی با افزایش زمان استخراج، مقدار ترکیبات استخراجی افزایش یافت. البته قرار گرفتن بیش‌تر در معرض امواج منجر به تجزیه حرارتی ترکیبات موثره می‌شود. میزان استخراج ترکیبات فنولی با افزایش نسبت مایع به جامد ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. نسبت حلال به نمونه در حدود مقدار متوسط (۱۷/۵:۱)، نسبت مناسبی برای استخراج ترکیبات فنولیک از ریشه شیرین‌بیان بود. در مقادیر پایین حلال به نمونه جامد، حلالیت ترکیبات فنولیک با افزایش نسبت بهبود می‌یابد. گزارش شده است که میزان شکستن غشای سلولی مواد جامد با افزایش حلال افزایش می‌یابد [۲۲]. نسبت حلال به جامد به‌وسیله تاثیر بر شیب غلظت، سرعت استخراج را تغییر می‌دهد. افزایش نسبت حلال به مواد جامد، شیب غلظت و به تبع آن سرعت نفوذ ترکیبات از فاز جامد به مایع را افزایش می‌دهد [۱۲]. به‌طور معمول در روش‌های استخراج سنتی میزان بیش‌تر حلال، بازدهی ترکیبات موثره را افزایش می‌دهد اما در روش استخراج به کمک مایکروویو میزان حلال بیش‌تر، بازدهی پایین‌تری را نتیجه می‌دهد [۱۵، ٤، ۲]. یافته‌ها نشان داد که حجم حلال باید تا حدی باشد که بافت گیاهی به‌طور کامل در حلال تا اتمام زمان اشعه‌دهی غوطه‌ور باشد. حجم حلال با توجه به مقدار نمونه انتخاب می‌شود. به‌طور کلی، نسبت‌های بالای حجم حلال به ماده جامد ممکن است در روش‌های استخراج معمولی مؤثر باشد اما در روش استخراج به کمک مایکروویو، نسبت‌های بالاتر ممکن است بازیابی‌های کم‌تری را به‌دلیل همزنی نامناسب و ناکافی حلال توسط مایکروویو داشته باشد [۷].

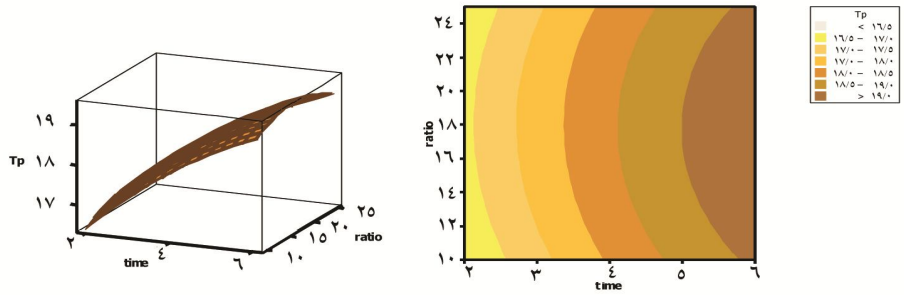
شکل ۳ نمودار فضایی و سطحی اثر زمان استخراج و نسبت حلال به نمونه، بر روی میزان ترکیبات فنولی کل با حلال آب را نشان می‌دهد. نسبت حلال به نمونه، اثر معنی‌داری درجه اول و دوم به‌صورت نزولی در حالی که زمان استخراج اثر خطی مثبت را بر روی میزان استخراج ترکیبات فنولی کل (TPC) نشان داد. به‌طورکلی با افزایش زمان استخراج، مقدار ترکیبات استخراجی افزایش یافت و افزایش نسبت حلال تا حدودی منجر به افزایش استخراج ترکیبات فنولیک شد.



شکل ۱- نمودار فضایی و سطحی میزان ترکیبات فنولی کل (mg/g) در برابر زمان (دقیقه) و نسبت حلال به نمونه (حلال متانول).



شکل ۲- نمودار فضایی و سطحی میزان ترکیبات فنولی کل (mg/g) در برابر زمان (دقیقه) و نسبت حلال به‌نمونه (حلال اتانول).



شکل ۳- نمودارفضایی وسطحی میزان ترکیبات فنولی کل (mg/g) دربرابرزمان (دقیقه) ونسبت حلال به نمونه (حلال آب).

آنالیز سطح پاسخ بازدهی عصاره ریشه شیرین‌بیان: آنالیز سطح پاسخ در جدول‌های ٤، ٥ و ٦ ضرایب رگرسیون بالا را نشان می‌دهد و معادله‌های ٤، ٥ و ٦ روابط بین بازدهی استخراج عصاره ریشه شیرین‌بیان و پارامترهای استخراج شامل نسبت حلال به نمونه، زمان استخراج و حلال را نشان می‌دهد.

$$Y_۲=۱٤/۱۹+۱/۰۱X_۱-۰/۲٦٦X_۲-۰/٤۳۱X_۱^۲-۱/۷۱X_۲^۲-۰/٤X_۱X_۲$$ رابطه ٤

$$Y_۲=۱٥/٦۲+۱۱/۲٦X_۱+۰/۳۳X_۲-۰/٥۲X_۱^۲-۱/۰٤X_۲^۲-۰/٥۹X_۱X_۲$$ رابطه ٥

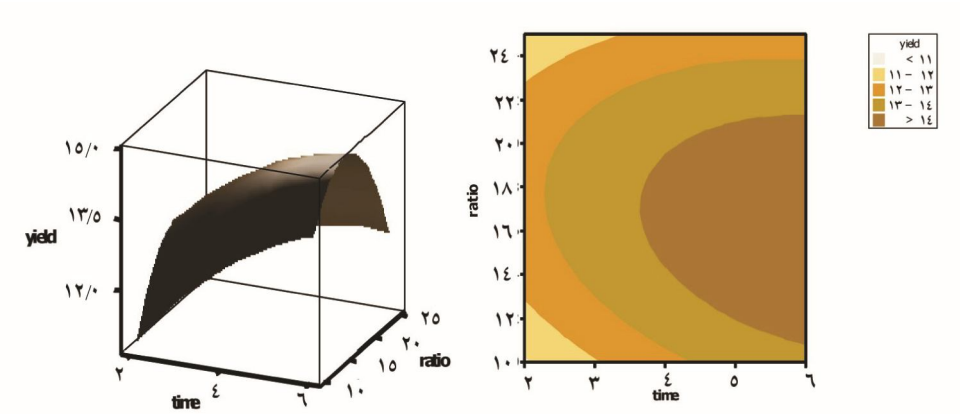
$$Y_۲=٤/۲۲+۰/٤۱٥X_۱+۰/۲٦X_۲-۰/۰۰۸X_۲^۲+۰/۰۰۸X_۱X_۲$$ رابطه ٦

اثر زمان استخراج و نسبت حلال به نمونه بر روی بازدهی عصاره ریشه شیرین‌بیان با حلال‌های متانول، اتانول در شکل‌های ٤ و٥ ارائه شده است. نتیجه‌های اثر نسبت حلال را به‌صورت درجه دوم و نزولی در حالی که اثر زمان را به‌صورت خطی و مثبت و درجه دوم را به‌صورت نزولی بر روی بازدهی عصاره ریشه شیرین‌بیان نشان داد. در نسبت‌های پایین، بازدهی عصاره ریشه شیرین‌بیان در آغاز افزایش سریعی را نشان داد اما سپس با افزایش بیش‌تر نسبت، کاهش اتفاق می‌افتد. نتیجه‌های یکسان توسط پن و همکاران [١٠]. برای استخراج اسید گلیسیریزیک از عصاره ریشه شیرین‌بیان با استفاده از مایکروویو گزارش شده است.

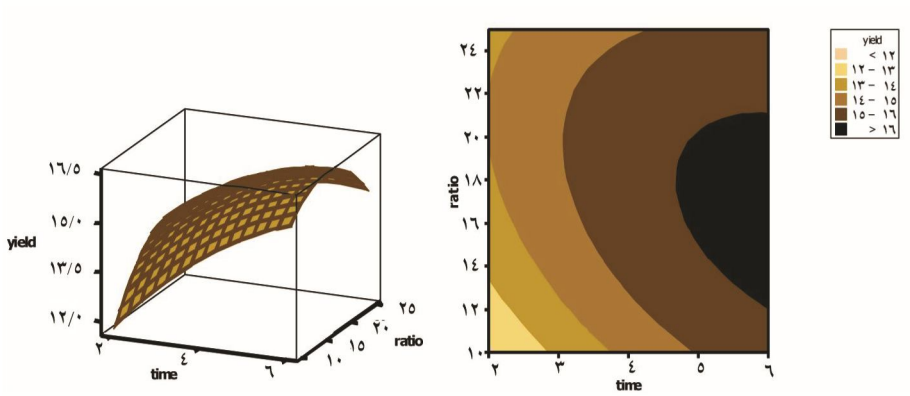
در شکل ٦ اثر زمان استخراج و نسبت حلال به نمونه بر روی بازدهی عصاره ریشه شیرین‌بیان با حلال آب نشان داده شده است. نتیجه‌های اثر نسبت حلال به نمونه را به‌صورت خطی و صعودی و درجه دوم را به‌صورت نزولی بر روی بازدهی عصاره ریشه شیرین‌بیان نشان داد ولی زمان اثر معناداری را به‌صورت خطی مثبت بر روی بازدهی عصاره ریشه شیرین‌بیان نشان داد.

پن و همکاران [١٠] در بررسی زمان‌های مختلف استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین‌بیان به کمک امواج مایکروویو، در بازه زمانی ١ تا ١٠ دقیقه گزارش کردند که زمان ٤-٥ دقیقه اشعه‌دهی امواج مایکروویو با حلال اتانول ٥٠ درصد بیش‌ترین میزان استخراج را داشت که در مقایسه با روش سنتی استخراج به‌مدت ٢٤-٢٠ ساعت در دمای اتاق، بیش‌تر بود. همچنین در بررسی زمان‌های مختلف اشعه‌دهی امواج مایکروویو (١ تا ١٠ دقیقه) برای استخراج پلی فنل‌ها و کافئین از برگ‌های چای سبز، زمان ٤ دقیقه بیش‌ترین میزان استخراج را برای هر دو ترکیب داشت. با افزایش زمان از ٤ تا ١٠ دقیقه میزان استخراج پلی‌فنل‌ها تقریبا ثابت بود ولی میزان استخراج کافئین چای کاهش یافته بود [١١]. در یک پژوهش جهت

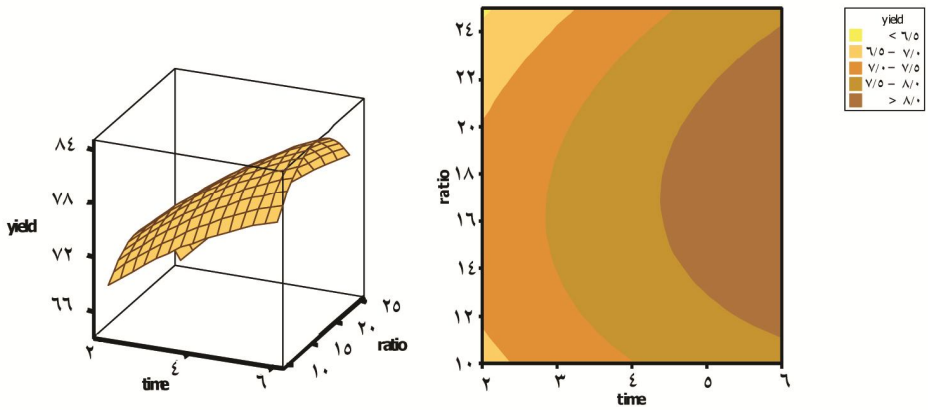
بهینه‌سازی توان مایکروویو متغیرهای (۱۰ درصد، ۵۰ درصد، ۹۰ درصد)، زمان اشعه‌دهی (۳۰s، ۹۰s،۱۵۰s) و وزن نمونه (۱/۵ گرم، ۲/۵ گرم، ۳/۵ گرم) بر استخراج ترکیبات فنولیک از پوست بادام‌زمینی به کمک امواج مایکروویو، گزارش شد که ماکزیمم TPC تحت شرایط بهینه (۹۰ درصد توان مایکروویو، ۳۰ s زمان اشعه‌دهی و ۱/۵ گرم پوست) به‌میزان ۱٤۳/٦میلی‌گرم معادل اسید گالیک به گرم پوست به‌دست آمد [۲۰]. سانگ و همکاران [۱۹] به‌منظور بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولی به کمک مایکروویو از برگ‌های Ipomoea batatas از نرم‌افزار آماری RSM با متغیرهای زمان استخراج، توان مایکروویو و نسبت اتانول استفاده نمودند. آنالیز آماری RSM نشان داد که شرایط بهینه جهت به‌دست آوردن ماکزیمم ترکیبات فنولی به‌این صورت می‌باشد: توان مایکروویو ۳۰۲ W، زمان ۱۲۳ S، نسبت اتانول ۵۳ درصد (v/v). همچنین بعد از بهینه‌سازی، طی بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بهینه، برتری روش MAE در افزایش کارایی استخراج و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره را در زمان کوتاه آشکار کرد.



شکل ٤- نمودار فضایی و سطحی بازدهی عصاره ریشه شیرین‌بیان در برابر زمان (دقیقه) و نسبت حلال به نمونه (حلال متانول).



شکل٥- نمودار فضایی وسطحی بازدهی عصاره ریشه شیرین‌بیان در برابر زمان (دقیقه) و نسبت حلال به نمونه(حلال اتانول).

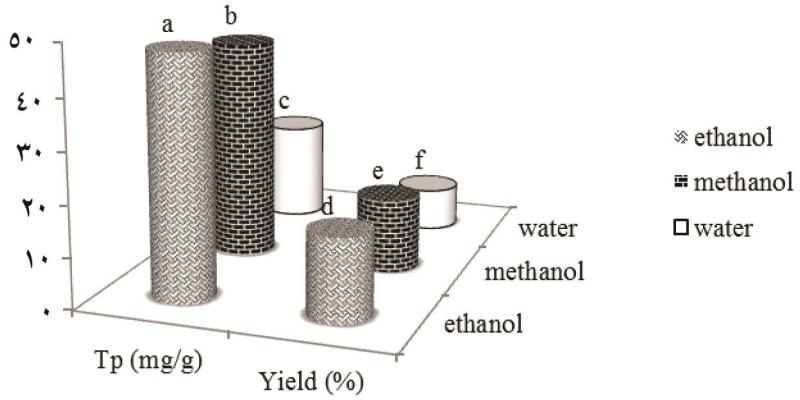


شکل ٦- نمودار فضایی و سطحی بازدهی عصاره ریشه شیرین‌بیان در برابر زمان (دقیقه) و نسبت حلال به نمونه و (حلال آب).

بهینه‌سازی استخراج با مایکروویو: بهینه‌سازی متغیرهای وابسته با استفاده از جدول‌های ٤، ٥ و ٦ انجام شد و نقاط اُپتیمم به‌دست آمدند. این مقادیر بهینه در زمان ٦ دقیقه و نسبت حلال به نمونه ١: ١٢/٧ با حلال متانول ٨٠ درصد، زمان ٦ دقیقه و نسبت حلال به نمونه ١: ١٦/٥ با حلال اتانول ٨٠ درصد و زمان ٢ دقیقه و نسبت حلال به نمونه ١: ١٨/١٥ با حلال آب به‌دست آمد که با بررسی آن‌ها به‌این نکته می‌رسیم که مقادیر به‌دست آمده طی آزمایشات تجربی با دانسته‌های پیشین به‌دست آمده در مورد عوامل مؤثر بر میزان ترکیبات فنولی کل هماهنگی دارد. عمل استخراج در شرایط بهینه ارائه شده توسط مدل در سه تکرار انجام گردید و نتیجه با مقدار پیش‌بینی شده توسط آن مقایسه گردید. میزان

راندمان تولید پیش‌بینی شده مدل برای ترکیبات فنولیک ٤٣/٥، ٤٧/٤٣ و ١٩/٤ میلی‌گرم معادل اسید گالک به گرم وزن خشک و بازدهی عصاره ١٤/٥ درصد، ١٦/٣٨ درصد و ٨/٣٦ درصد به‌ترتیب با حلال‌های متانول ٨٠ درصد، اتانول ٨٠ درصد و آب بود که نتیجه‌های به‌دست آمده از آزمایش‌های انجام شده در این شرایط برای ترکیبات فنولیک ٠/١٥± ٤٣/٠٦، ٠/١٥± ٤٧/١ و ١٩/٣±٠/٢٦ میلی‌گرم معادل اسید گالیک به گرم وزن خشک و بازدهی عصاره ١٤/٢٣±٠/٢٢، ٠/٠٦± ١٦/٢٤ و ٠/١١± ٨/٢٧ به‌ترتیب با حلال‌های متانول ٨٠ درصد، اتانول ٨٠ درصد و آب بود. این نتیجه‌های نشان می‌دهد که مدل توانسته تا حدود زیادی اثر ٣ متغیر حلال، زمان و نسبت حلال به نمونه را در استخراج ترکیبات فنولیک و بازدهی عصاره را نشان دهد.

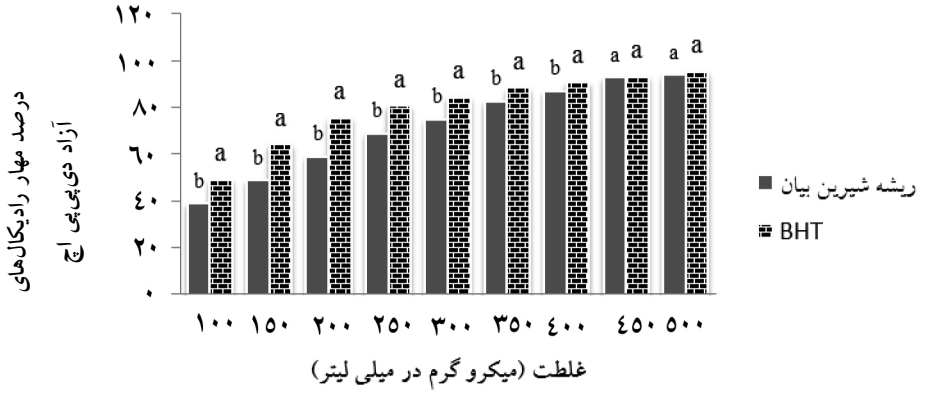
مقایسه بین حلال‌های متفاوت در استخراج ترکیبات فنولیک به کمک مایکروویو: زمان اشعه‌دهی در استخراج به کمک مایکروویو تحت تاثیر خصوصیات دی‌الکتریک حلال است. در حلال‌هایی مانند آب، اتانول و متانول ممکن است با افزایش زمان اشعه‌دهی، حرارت بالا رود از این رو برای اجزای حساس به حرارت خطرناک است [١]. در این روش، استخراج با آب مقدار پایین‌تری از ترکیبات فنولیک قابل استخراج را نسبت به حلال اتانول ٨٠ درصد و متانول ٨٠ درصد به همراه داشت (شکل ٧). آب بیش‌ترین ثابت دی‌الکتریک را نسبت به حلال‌های معمول دارد اگرچه فاکتور اتلاف آب از حلال‌های دیگر پایین‌تر است. بنابراین میزان جذب مایکروویو برای آب بیش‌تر از حلال‌های متانول و اتانول می‌باشد اما ضریب حرارت‌دهی کلی برای هر دو حلال بیش‌تر از آب می‌باشد بنابراین میزان استخراج ترکیبات فنولیک توسط حلال آب کم‌تر می‌باشد [١٥]. همچنین نتیجه‌های نشان داد که ماکزیمم استخراج ترکیبات فنولی با حلال اتانول ٨٠ درصد می‌باشد. اصول حرارت‌دهی با مایکروویو، بر اساس تاثیر مستقیم امواج با حلال و مواد قطبی می‌باشد و به‌وسیله دو پدیده انتقال یونی و چرخش دو قطبی اثر می‌گذارد که در بیش‌تر موارد هم‌زمان اتفاق می‌افتد. مولکول‌های قطبی (مثل پلی‌فنل‌ها) و محلول‌های یونی انرژی مایکروویو را به شدت جذب می‌کنند و به‌علت این که آن‌ها دارای چرخش دوقطبی دائمی می‌باشند این موضوع سبب افزایش سریع دما و تکمیل سریع واکنش می‌شود [٢٣].



شکل ۷- مقایسه بین استخراج ترکیبات فنولیک و بازدهی عصاره ریشه شیرین‌بیان با حلال‌های متفاوت حروف غیرمشابه بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

ارزیابی مهار رادیکال‌های آزاد: ارزیابی مهار رادیکال‌های DPPH، که در واقع اندازه‌گیری توانایی ترکیبات احیاکننده مانند فنول‌ها جهت انتقال اتم هیدروژن به رادیکال می‌باشد، معمول‌ترین روش برای محاسبه فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در این روش نتیجه‌های بر حسب درصد کاهش در میزان جذب محلول‌های DPPH در حضور عصاره نسبت به محلول DPPH فاقد عصاره بیان می‌گردد. نتیجه‌های آنالیز واریانس نشان داد غلظت‌های عصاره بهینه ریشه شیرین‌بیان و آنتی‌اکسیدان سنتزی تاثیر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد دارد. همچنین نتیجه‌های بیان‌گر آن بود که توانایی عصاره‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت فعالیت ضد رادیکالی آن‌ها افزایش می‌یابد. شکل ۸ نشان می‌دهد که کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) در غلظت رادیکال‌های DPPH به‌علت توانایی در مهار رادیکال‌ها توسط عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان و استاندارد می‌باشد. اثر مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان و استاندارد به‌این ترتیب به‌دست آمد: عصاره ریشه شیرین‌بیان <BHT. با توجه به نتیجه‌های در محدوده غلظت ۴۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری بین عصاره‌ها و BHT وجود داشت ولی در غلظت‌های بالاتر تفاوت معناداری در مهار رادیکال‌های آزاد بین عصاره‌ها و BHT وجود نداشت. این نتیجه‌ها نشان می‌دهد که در محدوده غلظت ۳۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیش‌ترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد متعلق به BHT بود اما در غلظت‌های بالا (۴۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) عصاره ریشه شیرین‌بیان در مهار

رادیکال‌های آزاد با آنتی‌اکسیدان سنتزی رقابت می‌کند. در بررسی سایر گیاهان، محققان نتیجه‌هایی را گزارش کردند که نتیجه‌های این پژوهش با آن‌ها هم‌خوانی داشت. یانیش لیوا[1] و مارینوا[2] [۲۵] گزارش کردند که افزودن عصاره مرزه به روغن آفتاب‌گردان روند اکسیداسیون را کند می‌کند. این عصاره در غلظت ppm ۵۰۰۰ دارای اثر بهتری نسبت به BHT در غلظت ppm ۲۰۰ بود. در مطالعه‌ای توسط سینگ و همکاران [۱۷] فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره شبت با استفاده از آزمون آون در روغن کلزا بررسی شد. اسانس و عصاره با غلظت ppm ۲۰۰ به روغن افزوده شد و تغییرات عدد پراکسید و تیوباربیتوریک اسید در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۸ روز بررسی شد. ترتیب قدرت فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌این صورت بود: BHT>BHA>عصاره>اسانس. حضور ترکیبات فنولیکی مانند دیل‌آپیول و آنتول سبب اثرات آنتی‌اکسیدانی ذکر گردید.



شکل ۸- مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH غلظت‌های مختلف عصاره‌های ریشه شیرین بیان و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT. حروف غیرمشابه در هر غلظت بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

قدرت احیاکنندگی: در این مطالعه ، قدرت احیاکنندگی عصاره بهینه ریشه شیرین‌بیان بر اساس احیا آهن ۳ ظرفیتی و تبدیل آن به آهن ۲ ظرفیتی سنجیده شد و با استاندارد BHT به‌عنوان عامل احیاکننده قوی مقایسه شد. حضور عوامل احیاء کننده (آنتی اکسیدان‌ها) منجر به احیاء کمپلکس‌های فری سیانید و تبدیل آن‌ها به شکل فروس می‌گردد که بسته به ظرفیت احیاءکنندگی عصاره‌های مورد بررسی با

1- Yanishlieva
2- Marianova

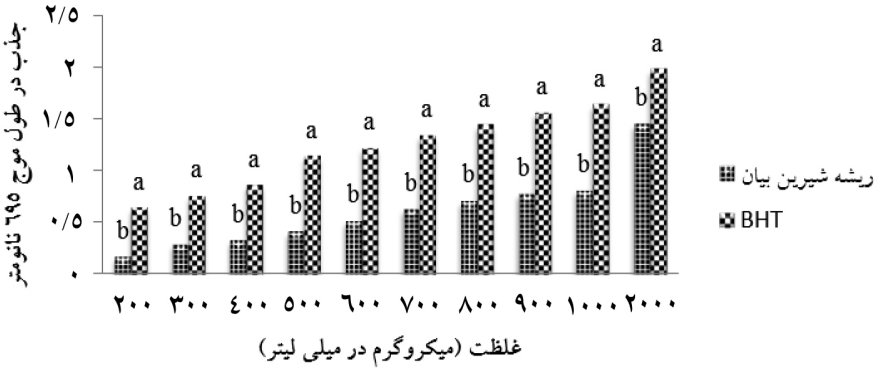
تغییر رنگ محلول از زرد به درجات مختلفی از رنگ‌های سبز و آبی همراه است. از آن‌جایی‌که این کمپلکس در طول موج ۷۰۰ نانومتر دارای حداکثر میزان جذب می‌باشد، بنابراین می‌توان غلظت یون‌های آهن دو ظرفیتی را با اندازه‌گیری میزان جذب محلول تعیین نمود [۱۸]. نتیجه‌های آنالیز واریانس بیان‌گر آن بود که عصاره‌های مختلف از نظر قدرت احیاءکنندگی اختلاف معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) با BHT دارند. هم‌چنین با افزایش غلظت میزان جذب محلول‌های حاوی عصاره به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت.

شکل ۹ مقایسه میانگین میزان جذب غلظت‌های مختلف عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان وBHT را نشان می‌دهد. نتیجه‌های نشان داد در تمامی غلظت‌های مورد بررسی (۲۰۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT دارای بیش‌ترین قدرت احیاءکنندگی است. البته در غلظت‌های پایین تفاوت معنی‌داری بیش‌تری بین عصاره‌ها وBHT وجود داشت ولی در غلظت‌های بالاتر (حدود ۲ mg/ml)، این تفاوت کم‌تر بود.قدرت احیاءکنندگی عصاره‌ها وابسته به غلظت افزایش پیدا می‌کند.

شکل ۹- مقایسه میانگین قدرت احیاءکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان و BHT.
حروف غیرمشابه در هر غلظت بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: اساس کار در این روش احیاء مولیبدن ٦ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی در محیط اسیدی و دمای بالا است. این واکنش با تشکیل کمپلکس‌های سبز رنگ فسفو مولیبدن همراه بوده که در طول موج ٦۹۵ نانومتر دارای حداکثر میزان جذب می‌باشند. عصاره‌هائی که شدت جذب بالاتری در این طول موج دارند، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری از خود نشان می‌دهند [١٤]. نتیجه‌های

آنالیز واریانس نشان داد، اختلاف معنی‌داری بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌هاو آنتی اکسیدان سنتزی BHT در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ها و آنتی اکسیدان سنتزی BHT در شکل ۱۰ نشان داده شده است. با افزایش غلظت عصاره‌ها ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) افزایش یافت.



شکل ۱۰- مقایسه میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان و BHT .

حروف غیر مشابه در هر غلظت بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

همان‌طور که در شکل۱۰ نیز دیده می‌شود، میزان جذب عصاره‌های اتانولی در غلظت‌های بالا (حدود ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تفاوت کم‌تری نسبت به.غلظت‌های پایین مشاهده شد وآنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بیش‌ترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را به خود اختصاص داد.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش از روش سطح پاسخ برای مدل‌سازی و بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولیک و بازدهی عصاره در روش‌های متفاوت حلال، زمان و نسبت حلال به نمونه استفاده شد. نتیجه‌های نشان می‌دهد که مدل توانسته تا حدود زیادی اثر ۳ متغیر حلال، زمان و نسبت حلال به نمونه را در استخراج ترکیبات فنولیک و بازدهی عصاره را نشان دهد. بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ریشه شیرین‌بیان نشان داد که عصاره ریشه شیرین‌بیان در غلظت‌های بالا با آنتی‌اکسیدان سنتزی قابل رقابت است.

منابع

1.Barbero, G.F., Palma, M., & Barroso, C.G. (2001). Determination of capsacinoids in peppers by microwave assisted extraction high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 578, 227-233.

2.Chen, Y., Xie, M.Y., & Gong, X.F. (2007). Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. *Journal Food Engineering*, 81, 162–170.

3.Fenwick, G.R., Lutomski, J., & Nieman, C. (1990). Liquorice, composition, uses and analysis. *Food Chemistry*, 38, 119-143.

4.Guo, Z., Jin, Q., Fan, G., Duan, Y., Qin, C., & Wen, M. (2001). Microwave-assisted extraction of effective constituents from a Chinese herbal medicine *Radix puerariae*. *Analytica Chimica Acta*, 436, 41–47.

5.Kaufman, B., Christen, P., Veuthey, J.L. (2001). Parameters affecting microwave-assisted extraction of withanolides. *Phytochemical Analysis*, 12, 327-331.

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

7.Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2007). Microwave-assisted extraction an innovative & promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, 1, 7–18.

8.Mirzapour, M., Hamedi, M., & Rahimipanah, M. (2010). Sunflower Oil Stabilization by Persian Walnut Leaves Extract During Oven Storage Test. *Food Scince & Technology Resaerch*, 16, 443-446.

9.Myers R.H., & Montgomery D.C. (2002). Response surface methodology: process & product optimization using designed experiments. 2nd Ed. Wiley Pub Inc, NewYork. Pp. 51-83.

10.Pan, X., Liu, H., Jia, G., & Shu, Y. (2000). Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. *Journal of Biochemical Engineering*, 5, 173–177.

11.Pan, X., Niu, G., & Liu, H. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols, tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering & processing*, 42, 129-133.

12.Pifferi, P.G., & Vaccari, A. (1983). The anthocyanins of sunflower. II. A study of the extraction process. *Journal of Food Technology*, 18, 629-638.

13.Ping, S., Jinzhe, H., Peilong, S., & Peicheng, Z. (2010). Analysis of conditions for microwave-assisted extraction of total water-soluble flavonoids from *Perilla Frutescen*s leaves. *Journal of Food science & Technology* DOI: 10.1007/s 13197-011-0265-8Online First™.

14.Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.
15.Proestos, C., & Komaitis, M. (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. LWT, 41, 652–659.
16.Shimada, K., ujikawa, F.K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 945-948.
17.Singh, G., Maurya, S., & Catalan, C. (2005). Chemical constituents antimicrobial investigations & antioxidant potentials of *Anethum graveolens* essential oil & acetone extract. *Journal of Food Science*, 70, 208-215.
18.Soares, A.A., Souza, C.G.M., Daniel, F.M., Ferrari, G.P., Costa, S.M.G., & Peralta, R.M. (2009). Antioxidant activity & total phenolic content of Agaricus brasiliensis (*Agaricus blazei Murril*) in two stages of maturity. *Food Chemistry*, 112, 775-781.
19.Song, J., Li, D., Liu, C., & Zhang, Y. (2011). Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from Ipomoea batatas leaves & its antioxidant activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 282–287.
20.Tameshia, S., Ballard, A., Mallikarjunan, P., Zhou, Kequan., & O'Keefe, S. (2010). Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry*, 120, 1185–1192.
21.Turner, C. (2006). Modern extraction techniques Food & Agriculture. p. 4-20.
22.Vatai, T., Škerget, M., & Knez, Ž. (2009). Extraction of phenolic compounds from elder berry & different grape marc varieties using organic solvents &/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 90, 246–254.
23.Venkatesh, M.S., & Raghavan, G.S.V. (2004). An overview of microwave processing & dielectric properties of agri-food materials. *Biosystems Engineering*, 88, 1–18.
24.Wang, L., & Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Science & Technology*, 17, 300-312.
25.Yanishlieva, N.V., & Marinova, E.M. (1996). Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A. 203, 220-223.
26.Yildirim, A., Mavi, A., & Kara, A.A. (2001). Determination of antioxidant & antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 49, 4083–4089.

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

EJFPP, Vol. 2 (4): 33-56
http://ejfpp.gau.ac.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Modeling and Optimization of phenolic compound extraction from licorice root by microwave assisted method

Z. Karami[1], H.A. Mirzaee[2], Z. Emam-Djomeh[3], *M. Khomeiri[2], A.R. Sadeghi Mahoonak[4] and E. Aydani[5]

[1]M.Sc. Graduated, Dept. of Food Sciences and Technology, GUASR, [2]Assistant Prof. Dept. of Food Sciences and Technology, GUASR, [3]Associate Prof., Dept. of Food Sciences, Tehran University, [4]Associate Prof., Dept. of Food Sciences and Technology, GUASR, [5]M.Sc. Graduated, Dept. of Food Sciences and Technology, Sabzevar University

Received: 2012-03-01; Accepted: 2012-05-17

Abstract

In present study, response surface methodology was used to optimize extraction condition of phenolic compounds from licorice root by microwave application. Investigated factors were solvent (ethanol 80%, methanol 80% and water), liquid/solid ratio (10:1, 17.5:1, 25:1) and time (2, 4 and 6min). Experiments were designed according to the central composite rotatable design. The results showed that extraction conditions had significant effect on the extraction yield of phenolic compounds and antioxidant capacities. Optimal condition in microwave assisted method were ethanol80% as solvent, extraction time of 5-6 min and liquid/solid ratio of 16.5/1. Amount of phenolic compounds and extraction yield of licorice root in microwave assisted (MAE), were 47.43 mg/g and 16.38%, respectively. The antioxidant activity of optimal extract was assessed by DPPH, reducing power and total antioxidant capacity assay and results were compared with synthetic antioxidant BHT.

Keyword: Modeling; Optimization; Microwave assisted extraction; Licorice root; RSM

*Corresponding Author; Email: sadeghiaz@yahoo.com