

بهینه‌سازی و مقایسه اثر شرایط مختلف استخراج (فراصوت و خیساندن) بر ترکیبات شیمیایی عصاره میوه گیاه *Elaeagnus angustifolia* L.

مریم سردردیان^{۱*}، معصومه مهربان سنگ آتش^۲، اکرم آریان‌فر^۳

^۱باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران

^۲گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی، مشهد، ایران

^۳باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۲۰ : تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۰۲

چکیده

سنجد با نام علمی *Elaeagnus angustifolia* L.، به دلیل ترکیبات فلاونوئیدی، سیتوسترول‌ها، گلیکوزیدهای قلبی و ترپنوئیدها از مهمترین گیاهان دارویی و مغذی محسوب می‌شود. هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از عصاره متانولی میوه کامل سنجد (پوست، گوشت و دانه) توسط روش فراصوت و مقایسه آن با روش خیساندن بود. روش سطح پاسخ جهت بهینه‌سازی شرایط استخراج با هدف بالاترین میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی استفاده شد. آزمون‌ها بر مبنای طرح Box-Behnken با سه متغیر مستقل، شامل نسبت حلال به نمونه (۵۰-۲۰ میلی‌لیتر حلال بر گرم نمونه)، دما (۶۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان استخراج (۳۵-۵ دقیقه) طراحی شدند. اندازه‌گیری محتوای فنل کل عصاره‌ها با استفاده از معرف فولین سیو-کالچو و اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل عصاره‌ها بر اساس روش کلریمتری آلومینوم کلراید انجام شد. ضرایب واریانس به دست آمده نشان داد اثر دمای فراصوت بر راندمان استخراج نسبت به دیگر عوامل موثرتر بود ($p < 0.05$). شرایط بهینه استخراج به ترتیب: ۳۱/۷۹ (میلی‌لیتر حلال بر گرم نمونه)، ۵۲/۸۷ (درجه سانتی‌گراد) و ۲۵/۴۴ (دقیقه) بود. مقدار بازده استخراج، میزان ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدها در این شرایط به ترتیب ۲۱/۵۸ (میلی‌گرم عصاره به ازای گرم نمونه)، ۱۰۶/۳۱ (میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک) و ۳۲/۹۸ (میلی‌گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک) بود. مقایسه بین دو روش استخراج، نشان داد که بازده استخراج ترکیبات موثره گیاه در روش فراصوت نسبت به روش خیساندن بیشتر است. بنابراین استفاده از روش فراصوت جهت استخراج ترکیبات فنولیک از میوه سنجد پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌سازی روش‌های استخراج، خیساندن، سنجد، فراصوت.

مقدمه

آسیا و اروپا گسترده شده‌اند. بخشی از آن در آمریکای شمالی و تقریباً حدود ۵۵ گونه در چین می‌باشد. سنجد (*Elaeagnus angustifolia*) معمولاً درختچه یا درخت کوچک خاردار است که ارتفاع آن به ۱۰-۵ متر می‌رسد. شاخه‌های آن به رنگ سبز-نقره‌ای هستند. برگ‌ها تخم مرغی یا سرنیزه‌ای شکل، دارای حاشیه‌ای صاف، کامل که در طول ساقه به صورت متناوب هستند، گل‌ها به شکل زنگوله، بسیار معطرند، کرم رنگ، به صورت منفرد یا خوشه‌ای هستند. میوه‌ها بیضوی، به طول ۲-۱/۵ cm، به رنگ زرد قرمز می‌باشند (Wang et al., 2012). ترکیبات معدنی موجود در میوه شامل سدیم، پتاسیم، منیزیم، کلسیم، آهن، مس، روی و منگنز می‌باشد. ترکیبات غیر صابونی آن را کاروتن‌ها و توکوفرول‌ها تشکیل می‌دهند (et al., 2007). آکولات و همکاران (Akbolat et al., 2008)، دریافتند که میوه سنجد حاوی مقادیر زیادی پروتئین، مواد معدنی و اسید آسکوربیک است. مطالعات فارماکولوژیکی اخیر اثر شل‌کنندگی عضلات، اثرات آنتی‌باکتریال، ضدالتهابی و ضد درد را نشان داد (Ahmadiani et al., 2007). فلاونوئیدها یکی از مهارکننده‌های آنزیم سنتزکننده نیتریک اکساید به شمار می‌آیند (Yang et al., 2002). حسین‌زاده و همکاران (Hosseinzadeh et al., 2003) اثر شل‌کنندگی عضلانی هسته سنجد را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره میوه سنجد ۸۷/۵ درصد شلی عضلانی ایجاد کرد. اثر شل‌کنندگی میوه سنجد با دیازپام قابل مقایسه است. آنها دریافتند که احتمالاً عامل موثر در شل عضلانی فلاونوئیدها می‌باشند.

استخراج به کمک امواج فراصوت در مقایسه با سایر روش‌های استخراج با مایکروویو، ارزان‌تر بوده و کاربرد آن ساده‌تر است. مکانیسم اصلی استخراج با امواج فراصوت به پدیده کاویتاسیون مربوط می‌شود که طی آن

کشور ایران از نظر پوشش و منابع گیاهی دارای تنوع بی‌نظیری است و طب سنتی ایران نیز یکی از غنی‌ترین و پرسابقه‌ترین طب‌های سنتی دنیا به شمار می‌رود. عصاره‌های گیاهی به‌طور وسیعی در صنایع دارویی، بهداشتی و غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند، فناوری عصاره‌گیری مورد ارزیابی قرار گرفته تا بتواند این ترکیبات فعال ثانویه را از منابع گیاهی استخراج نماید (Zolfaghari and Yekdaneh, 2009). نیاز به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و کم‌خطر و اثر بخشی بیشتر، یک ضرورت اجتناب‌ناپذیر است. امروزه بسیاری از متخصصین تغذیه برای تامین آنتی‌اکسیدان‌های مورد نیاز بدن، مصرف گیاهان، میوه‌جات و سبزیجات را توصیه می‌کنند، زیرا مصرف این آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی عوارض جانبی کم‌تر و درمان بهتری را سبب می‌شوند (Franlel and Meyer, 2000). آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی باعث افزایش قدرت آنتی‌اکسیدان‌های پلاسما و کاهش ابتلا به بعضی بیماری‌ها مانند سرطان، بیماری‌های قلبی و سکتة مغزی می‌شوند. متابولیت‌های ثانویه مشتق از گیاهان مانند فنول و فلاونوئید تام مشتق از گیاهان دارای پتانسیل قوی برای پاکسازی رادیکال‌های آزاد می‌باشند که در تمام قسمت‌های مختلف گیاهی مانند برگ، میوه، دانه، ریشه و پوست وجود دارند (Mathew and Abraham, 2005). تحقیقات و مطالعه‌های انجام شده نشان می‌دهند عصاره‌های به دست آمده از منابع طبیعی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشند (Erkan et al., 2009).

گیاه سنجد با نام علمی *Elaeagnus angustifolia* درختچه یا درختی است از خانواده Elaeagnaceae از جنس *Elaeagnus* که مهمترین این خانواده است (Zargari, 1998). جنس *Elaeagnus* شامل بیشتر از ۸۰ گونه می‌باشد که به‌طور اساسی در

شهرستان درگز در استان خراسان رضوی با مختصات جغرافیایی طول شرقی ۵۹ درجه و ۶ دقیقه و عرض شمالی ۳۷ درجه و ۲۶ دقیقه و ارتفاع ۴۰۸ متر از سطح دریا در خرداد ماه سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری گردیدند. میوه کامل سنجد پس از جمع‌آوری از رویشگاه مورد مطالعه، در مکان سایه و تهویه مناسب خشک شد و سپس توسط آسیاب برقی پودر و از الکی با مش ۴۰ عبور داده شد و به جهت عصاره گیری به آزمایشگاه‌های آنالیز به مرکز تحقیقات سلامت فرآورده‌های طبیعی خراسان شمالی منتقل گردیدند.

استخراج عصاره با استفاده از روش خیساندن: ۵ گرم نمونه پودر شده گیاهی با ۱۷۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد (نسبت ۱:۳۵ حجمی / وزنی) طی مدت ۲۴ ساعت به وسیله دستگاه همزن مغناطیسی و در دمای محیط مخلوط شد. مخلوط بدست آمده با کاغذ واتمن شماره یک صاف گردید و عصاره صاف شده از این مرحله جهت حفظ ترکیبات در دمای ۵-۲ درجه سانتی‌گراد (یخچال) نگهداری شد. در مرحله بعدی میوه سنجد عصاره‌گیری شده در مرحله اول توزین شده و به نسبت (۱:۳۵ حجمی / وزنی) با حلال تازه (متانول ۸۰ درصد) مخلوط گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط مخلوط گردید. مخلوط به دست آمده از مرحله دوم نیز همانند مرحله اول با کاغذ واتمن شماره یک صاف گردید و عصاره حاصل از این مرحله به عصاره قبلی اضافه شد و در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد با دستگاه روتاری تغلیظ و سپس در آون تحت خلاء و در همان دما تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد (Ebrahimzadeh et al., 2008).

استخراج عصاره با استفاده از روش فراصوت: اثر دما، زمان و نسبت حلال به ماده جامد در سه سطح مختلف مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به استفاده از حمام فراصوت دما در سطح ۳۰، ۴۵ و ۶۰ درجه

حباب‌های بسیار ریزی در مایع تشکیل شده، به سرعت تا اندازه بحرانی رشد می‌کنند و منجر می‌گردند. از این رو استفاده از این امواج در استخراج ترکیبات مختلف از بافت‌های گیاهی، راندمان عمل و سرعت فرآیند استخراج را افزایش داده و مصرف حلال را کاهش می‌دهد (Basiri et al., 2011). هیو و همکاران (Hui et al., 1994) برای استخراج ساپونین از جینسنگ از فراصوت استفاده کردند که بازده کل و بازده ساپونین استخراجی به ترتیب ۱۵ و ۳۰ درصد افزایش یافت. فراصوت همچنین توانست سرعت استخراج را افزایش و کیفیت عصاره‌ها را بهبود دهد. چمات و همکاران (Chemat et al., 2004) در آزمایشی سرعت‌های استخراج کاروون و لیمونن با روش استخراج به کمک فراصوت با استفاده از هگزان بسته به دمای بکار رفته، ۱/۳ تا ۲ برابر سریع‌تر از روش‌های استخراج معمولی یافتند. آنها بیان کردند از فراصوت، زمان فراصوت را به حداقل نصف زمان مورد نیاز با روش‌های استخراجی معمولی کاهش می‌دهد در تحقیقی که ویناترو (Vinatoru, 2001) انجام داد، افزایش بازده استخراج با روش فراصوت در مقایسه با روش‌های کلاسیک در آب و اتانول برای رازیانه، رازک‌ها، گل جعفری و نعنای به ترتیب ۳، ۷، ۱۲ و ۳۴ درصد را به همراه داشت. راستانگو و همکاران (Rostagno et al., 2003) استخراج ایزوفلاوون‌ها را از سویا با فراصوت ارزیابی کردند که ضریب استخراج تا ۱۵ درصد بهبود یافته بود. هدف از این پژوهش بهینه سازی بازده استخراج، ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی عصاره متانولی میوه سنجد با استفاده از روش فراصوت بوده و در ادامه به مقایسه دو روش استخراج، یعنی خیساندن و فراصوت پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه گیاهی مورد نیاز: میوه سنجد (*Elaeagnus angustifolia* L.) از باغات سنجد

کاملاً مخلوط و به مدت ۲ ساعت در تاریکی نگهداری شده و سپس جذب محلول در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. آب مقطر نیز به‌عنوان شاهد استفاده شد. مقدار کل ترکیبات فنولیک از معادله خط رسم شده بر مبنای اسیدگالیک با غلظت‌های (۰، ۳۰، ۷۰، ۱۱۰، ۱۵۰، ۱۹۰ و ۲۲۰ پی‌پی‌ام در متانول ۸۰ درصد) به صورت میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره خشک شده بیان گردید. آزمون فولین، با سه تکرار انجام شد (Hayouni et al., 2007).

تعیین میزان فلاونوئید: محتوای فلاونوئید بر اساس روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید انجام شد (Chang et al., 2002). طبق این روش ۱/۵ میلی‌لیتر متانول و ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد با ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره و ۰/۱ میلی‌لیتر پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر از آب مقطر مخلوط گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب آن در ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروسکوپی خوانده شد. از غلظت‌های مختلف کوئرستین ۱۰۰-۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در متانول جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد و محتوای فلاونوئید به‌صورت اکی والان‌های کوئرستین بر گرم وزن عصاره خشک بیان شد.

آنالیز آماری

روش سطح پاسخ (RSM) مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری است که در بهینه‌سازی فرآیندهایی به کار می‌رود که پاسخ مورد نظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تأثیر 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

سانتی‌گراد، زمان در سطوح ۵، ۱۵ و ۳۵ دقیقه و نسبت حلال به ماده جامد ۲۰، ۳۵، ۵۰ میلی‌لیتر حلال متانول به ۱ گرم پودر گیاه انتخاب شد. پس از افزودن حلال به نمونه، سطح بشر حاوی نمونه و حلال جهت کاهش تبخیر حلال حین فرآیند با پارافیلیم پوشانده شد. پس از پایان تیمار فراصوت، نمونه در داخل سل‌های سانتریفوژ قرار گرفت و با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm و در دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه، سانتریفوژ شد. بعد از پایان سانتریفوژ، محلول شفاف رویی جدا شد و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه تبخیرگردان تحت خلاء تغلیظ گردید و سپس در دستگاه آن تحت خلاء (در شرایطی مشابه روش خیساندن) خشک شد (Bahman Abadi, 2012). مقدار کل ماده خشک استخراج شده محاسبه شد و بصورت درصد (میلی‌گرم بر گرم نمونه خشک) بیان گردید (Bahman Abadi, 2012).

محاسبه بازده استخراج: حلال موجود در عصاره حاصل از روش استخراج فراصوت و خیساندن در نهایت توسط بن ماری تبخیر شد. با محاسبه وزن اولیه پلیت و وزن نهایی آن که حاوی ماده خشک بر جای مانده است، مقدار کل ماده خشک استخراج شده محاسبه شد و به‌صورت درصد (میلی‌گرم بر گرم نمونه خشک) بیان گردید (Bahman Abadi, 2012).

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولیک: مقدار کل ترکیبات فنولیک در عصاره حاصل از دو روش استخراج خیساندن و فراصوت، براساس روش فولین سیوکالچو مورد بررسی قرار گرفت (Hayouni et al., 2007). جهت تعیین میزان ترکیبات فنولیک، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام را در لوله آزمایش ریخته و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده، معرف فولین سیوکالتیو را به نسبت (۱/۱۰) را اضافه گردید. بعد از فاصله زمانی ۱ دقیقه، در دمای اتاق، ۱/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد افزوده شد و

بین دو روش خیساندن و فراصوت با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ صورت گرفت (جدول ۷).

جدول ۲: تیمارهای مربوط به استخراج عصاره

تیمار	نسبت حلال به ماده جامد	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)
۱	۲۰	۶۰	۲۰
۲	۲۰	۳۰	۲۰
۳	۳۵	۴۵	۲۰
۴	۳۵	۳۰	۳۵
۵	۳۵	۴۵	۲۰
۶	۵۰	۴۵	۵
۷	۲۰	۴۵	۳۵
۸	۳۵	۶۰	۳۵
۹	۵۰	۴۵	۳۵
۱۰	۵۰	۳۰	۲۰
۱۱	۳۵	۴۵	۲۰
۱۲	۳۵	۴۵	۲۰
۱۳	۳۵	۴۵	۲۰
۱۴	۵۰	۶۰	۲۰
۱۵	۳۵	۳۰	۵
۱۶	۲۰	۴۵	۵
۱۷	۳۵	۶۰	۵

نتایج

نتایج آزمون پارامترهای وابسته فرآیند، شامل بازده استخراج، محتوای ترکیبات فلاونوئیدی و فنولیک در جدول ۳ نشان داده شده است که شامل پاسخ‌های مشاهده شده و مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل می‌باشد. با توجه به نتایج فوق، می‌توان دریافت که بین مقادیر حاصل از آزمایشات و مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل، شباهت بسیاری وجود دارد. معادله مربوط به منحنی استاندارد اسید گالیک برای محاسبه میزان ترکیبات فنولی به صورت $Y=0.0038X+0.0044$ ($R^2=0.9926$) است. معادله مربوط به منحنی استاندارد کوئرستین برای محاسبه محتوای فلاونوئید کل

فاکتورها بود، از این رو طرح آماری سطح پاسخ انتخاب شد (Myers and Montgomery., 2002; Atkinson and Donev., 1992). در این مطالعه اثر متغیرهای مستقل شامل: زمان (X_1)، دما (X_2) و نسبت حلال به ماده جامد (X_3) در سه سطح مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱: نمایش متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آن‌ها

متغیر مستقل	نماد ریاضی	کد و سطح مربوطه
دما	X_1	+۱, ۰, -۱
زمان	X_2	۳۰, ۴۵, ۶۰
نسبت حلال به ماده جامد	X_3	۵, ۲۰, ۳۵

مدل مورد استفاده در روش سطح پاسخ عموماً رابطه‌ی درجه دوم می‌باشد. در روش سطح پاسخ برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را روی هر متغیر جداگانه بیان می‌نماید، مدل چند متغیره به صورت معادله سه می‌باشد. در معادله یاد شده، Y پاسخ پیش‌بینی شده، β_0 ضریب ثابت، $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ ضرایب خطی، $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ اثرات مربعی و $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ اثرات متقابل می‌باشند.

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3$$

در این پژوهش از طرح مربع مرکزی با سه متغیر مستقل شامل زمان، دما و نسبت حلال به ماده جامد، در سه سطح، یک بلوک و پنج تکرار در نقطه مرکزی طرح (برای محاسبه تکرار پذیری فرآیند) جهت بررسی تأثیر شرایط استخراج عصاره و بهینه‌سازی فرآیند یاد شده استفاده شد (جدول ۲). همچنین بهینه‌سازی فرآیند استخراج از روش سطح پاسخ و نرم‌افزار Design Expert نسخه 6 استفاده شد. مقایسه میانگین

به صورت $Y=0.031X+0.0109$ ($R^2=0.9913$) است. در نقطه بهینه رسم شده که در شکل های ۲، ۱ و ۳ همچنین رویه پاسخ و نمودارهای کانتور برای نشان دادن اثر پارامترها بر پاسخ و برهمکنش بین پارامترها

جدول ۳: پاسخ های مشاهده شده و مقادیر پیش بینی شده توسط مدل برای بازده استخراج عصاره متانولی، ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی (میلی گرم کوئرستین به ازای ۱ گرم از پودر اولیه) میوه سنجد.

تیمارها	نسبت حلال به ماده جامد	دما (درجه سانتی گراد)	زمان (دقیقه)	بازده استخراج عصاره متانولی (میلی گرم عصاره به ازای یک گرم از پودر اولیه)		محتوای ترکیبات فنولیک (میلی گرم اسید گالیک به ازای یک گرم پودر اولیه)		محتوای فلاونوئید (میلی گرم کوئرستین به ازای یک گرم پودر اولیه)	
				مشاهده شده	پیش بینی شده	مشاهده شده	پیش بینی شده	مشاهده شده	پیش بینی شده
۱	۲۰	۶۰	۲۰	۱۰/۲۲	۱۰/۴۷	۷۶/۴۵	۷۶/۲۰	۱۸/۲۱	۱۸/۰۱
۲	۲۰	۳۰	۲۰	۱۸/۰۵	۱۷/۵۹	۸۰/۲۰	۸۲/۱۰	۲۰/۲۰	۲۱/۵۹
۳	۳۵	۴۵	۲۰	۱۹/۲۹	۱۹/۷۵	۸۶/۸۱	۸۴/۹۱	۲۴/۸۱	۲۳/۴۲
۴	۳۵	۳۰	۳۵	۲۱/۴۰	۲۱/۱۵	۹۶/۷۲	۹۶/۹۷	۳۰/۴۲	۳۰/۶۲
۵	۳۵	۴۵	۲۰	۱۴/۶۲	۱۴/۲۱	۸۷/۱۵	۸۷/۰۶	۲۵/۱۵	۲۵/۸۰
۶	۵۰	۴۵	۵	۱۸/۴۵	۱۸/۷۵	۱۰۱/۱۲	۹۹/۸۸	۳۱/۳۸	۳۰/۴۴
۷	۲۰	۴۵	۳۵	۱۶/۵۲	۱۶/۲۲	۷۸/۱۲	۷۹/۳۸	۱۸/۷۲	۱۹/۶۶
۸	۳۵	۶۰	۳۵	۱۹/۷۹	۲۰/۲۰	۸۷/۴۳	۸۷/۵۲	۲۶/۴۳	۲۵/۷۸
۹	۵۰	۴۵	۳۵	۱۳/۰۱	۱۳/۱۶	۸۳/۱۸	۸۲/۵۲	۲۱/۱۸	۲۰/۷۳
۱۰	۵۰	۳۰	۲۰	۲۰/۶۸	۲۰/۶۳	۱۰۰/۲۴	۱۰۱/۲۳	۳۰/۹۳	۳۱/۶۷
۱۱	۳۵	۴۵	۲۰	۱۵/۸۹	۱۵/۹۴	۷۸/۸۹	۷۷/۹۰	۱۹/۸۰	۱۹/۰۶
۱۲	۳۵	۴۵	۲۰	۲۱/۴۵	۲۱/۳۰	۸۴/۱۱	۸۴/۷۷	۲۲/۱۱	۲۲/۵۸
۱۳	۳۵	۴۵	۲۰	۲۰/۴۴	۲۰/۱۲	۱۰۳/۴۴	۱۰۳/۳۰	۳۱/۸۴	۳۰/۹۹
۱۴	۵۰	۶۰	۲۰	۱۹/۷۲	۲۰/۱۲	۱۰۰/۳۲	۱۰۳/۳۰	۳۱/۴۷	۳۰/۹۹
۱۵	۳۵	۳۰	۵	۱۹/۹۳	۲۰/۱۲	۱۰۲/۷۸	۱۰۳/۳۰	۳۰/۴۲	۳۰/۹۹
۱۶	۲۰	۴۵	۵	۱۹/۳۲	۲۰/۱۲	۱۰۵/۷۱	۱۰۳/۳۰	۳۰/۹۲	۳۰/۹۹
۱۷	۳۵	۶۰	۵	۲۱/۲۰	۲۰/۱۲	۱۰۴/۲۴	۱۰۳/۳۰	۳۰/۲۹	۳۰/۹۹

افزایش حلالیت است، به علاوه افزایش دمای استخراج می تواند سبب شتابدهی حلال و تقویت استخراج ناخالصی ها و مواد زاید گردد. روند استخراج عصاره در ارتباط با اثر متقابل زمان و نسبت حلال به ماده جامد در نمودار سطح پاسخ (شکل ۱-ب) نشان داده است. همان طور که مشاهده می شود افزایش مدت زمان تا ۲۰ دقیقه تاثیری در روند

بررسی اثر متغیرهای ثابت بر بازده استخراج عصاره سنجد با امواج فراصوت: در ارتباط با اثر متقابل زمان و دما در نمودار سطح پاسخ (شکل ۱-الف)، زمان های بالاتر از ۲۰ دقیقه تاثیر محسوسی بر راندمان داشته است چنان که با افزایش زمان تا ۳۵ دقیقه راندمان استخراج افزایش یافت. افزایش راندمان با افزایش دما احتمالاً به دلیل بهبود انتقال جرم در نتیجه

افزایش می‌دهد بنابراین روند صعودی استخراج عصاره از میوه سنجد با افزایش زمان و دما با توجه به نمودارهای سطح پاسخ کاملاً منطقی به نظر می‌رسد. افزایش دما سبب افزایش ضریب نفوذ حلال شده و افزایش زمان نیز مدت زمان انتقال جرم را افزایش می‌دهد. با توجه به جدول ۴، نتایج کلیه پارامترها دارای اثر معنی‌داری در مدل بودند ($P < 0.001$). بنابراین می‌توان با توجه به پارامترهای معنی دار شده معادله کلی مدل درجه دوم را به صورت زیر گزارش کرد:

$$Y = 20.12 + 2.13x_1 + 3.21x_2 + 0.86x_3 - 1.65x_1^2 - 1.23x_2^2 - 1.13x_3^2 - 1.43x_1x_2 - 0.14x_1x_3 - 0.53x_2x_3$$

معادله ۱:

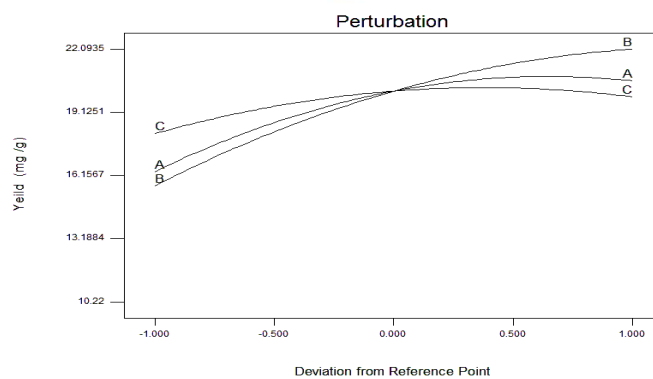
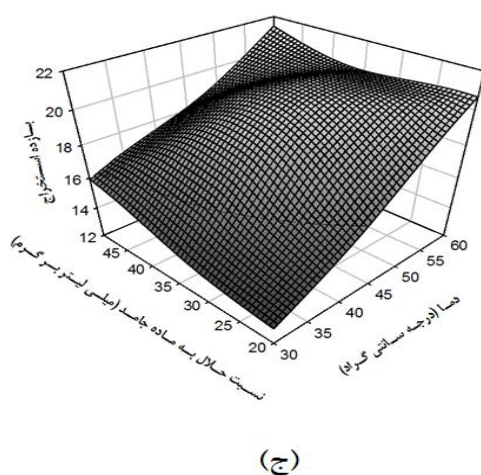
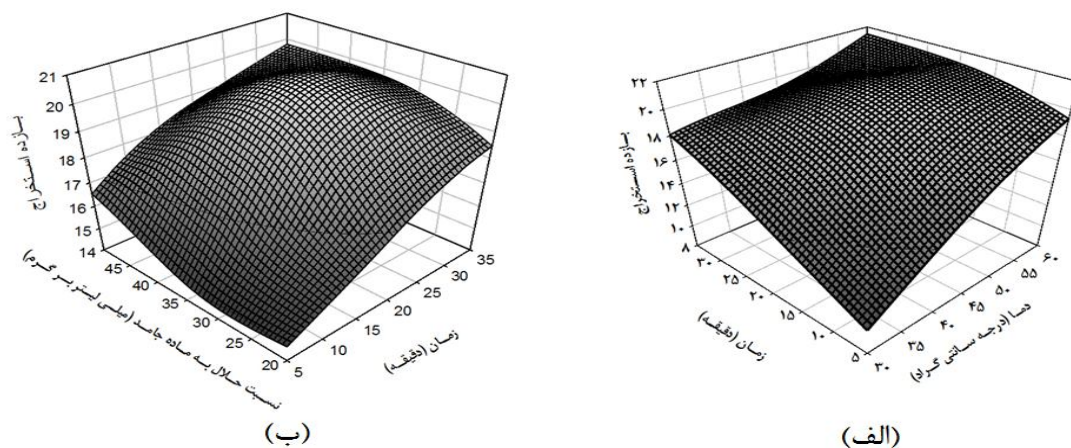
مقادیر نشان می‌دهد که مدل ارائه شده می‌تواند به خوبی پاسخ مورد نظر را پیش‌بینی نماید.

راندمان استخراج نداشت، اما پس از آن با افزایش مدت زمان استخراج، راندمان افزایش یافت. روند استخراج عصاره در ارتباط با اثر متقابل دما و نسبت حلال به ماده جامد در نمودار سطح پاسخ (شکل ۱-ج) نشان داده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود افزایش دما تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد تاثیر محسوسی بر راندمان داشته است چنانکه با افزایش دما تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد راندمان استخراج افزایش یافت. دما یکی از فاکتورهای مؤثر در میزان راندمان عصاره‌گیری بوده، به طوری که افزایش دما سبب افزایش ضریب نفوذ حلال شده و از طرفی زمان نیز مدت انتقال جرم را

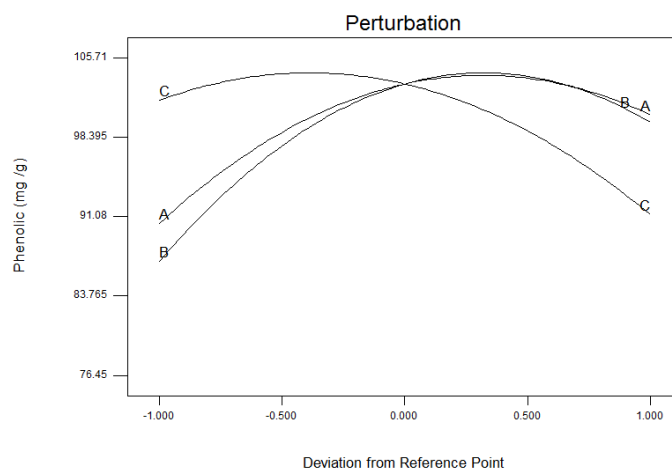
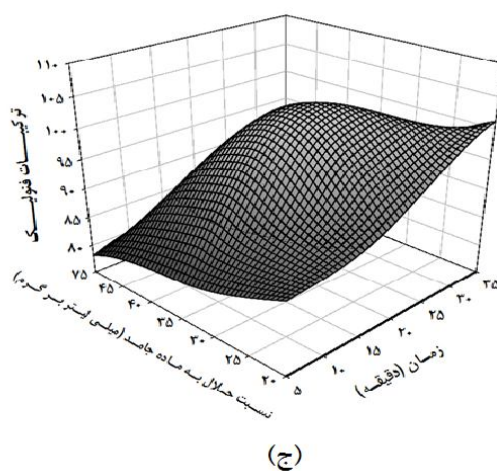
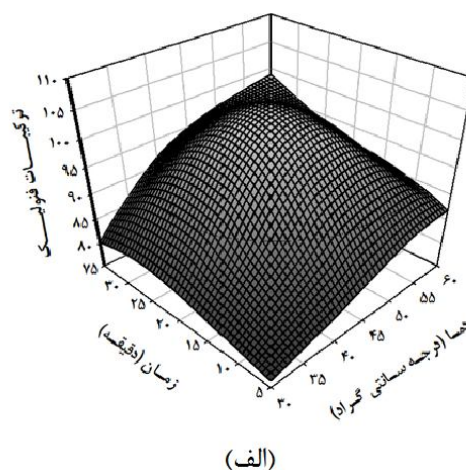
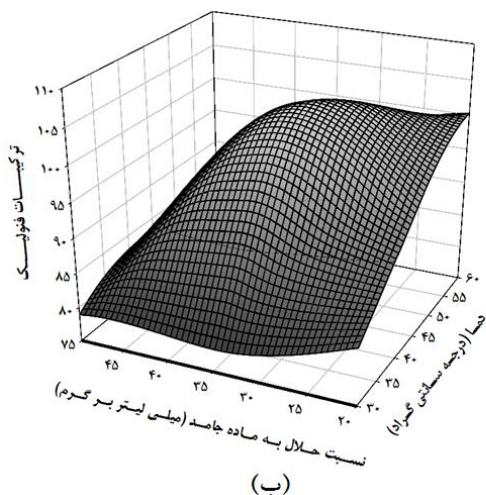
ضریب تبیین (R^2) برای مدل پیش‌بینی شده در مورد پاسخ بازده استخراج عصاره متانولی ۰/۹۸۲۳ و مقدار P برای آزمون فقدان برازش ۰/۵۹۷۵ بود. این

جدول ۴: تجزیه واریانس مدل چند جمله‌ای درجه دوم- پارامتر بازده استخراج

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	احتمال F	احتمال P	
مدل	۱۵۹/۶۸	۹	۸۲/۸۴	۳۸/۶۲	<۰/۰۰۰۱	Significant
A	۳۶/۳۰	۱	۵/۹۳	۷۹	<۰/۰۰۰۱	
B	۸۲/۲۴	۱	۱۱/۴۲	۱۷۹	<۰/۰۰۰۱	
C	۵/۹۳	۱	۶/۴۲	۱۲/۹۲	۰/۰۰۸۸	
A ²	۱۱/۴۲	۱	۵/۳۷	۲۴/۸۷	۰/۰۰۱۶	
B ²	۶/۴۲	۱	۸/۱۸	۱۳/۹۷	۰/۰۰۷۳	
C ²	۵/۳۷	۱	۰/۰۷۸	۱۱/۹۰	۰/۰۱۱۱	
AB	۸/۱۸	۱	۱/۱۱	۰/۱۷	۰/۰۰۸۳	
AC	۰/۰۷۸	۱	۰/۴۶	۲/۴۲	۰/۶۹۱۹	
BC	۱/۱۱	۱	۱/۱۱	۲/۴۲	۰/۱۶۳۶	
Residual	۲/۱۰	۷				
ضعف برازش	۱/۱۱	۳	۰/۳۷	۰/۷۰	۰/۵۹۷۵	not significant
خطا	۲/۱۰	۴				
کل	۱۶۲/۹۰	۱۶				
R-Squared	۰/۹۸۰۳					
Adj R-Squared	۰/۹۵۴۹					
C.V	۳/۷۲					



شکل ۱: نمایش سه بعدی، اثر همزمان دما- زمان (الف)، زمان- نسبت حلال به ماده جامد (ب) و دما - نسبت حلال به ماده جامد (ج) نمایش اثر متغیرهای مستقل روی میزان استخراج عصاره متانولی میوه سنجد بر میزان بازده استخراج (د)



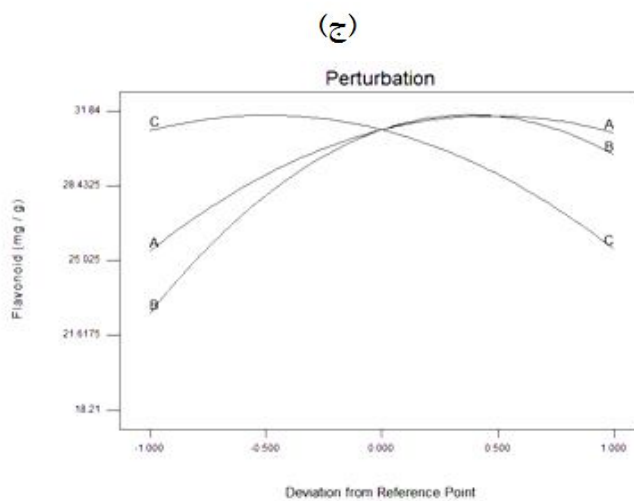
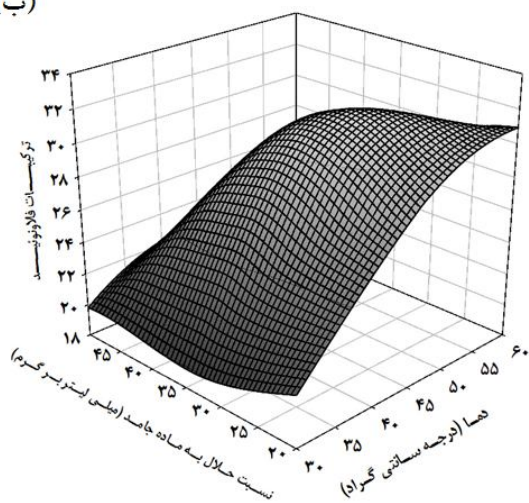
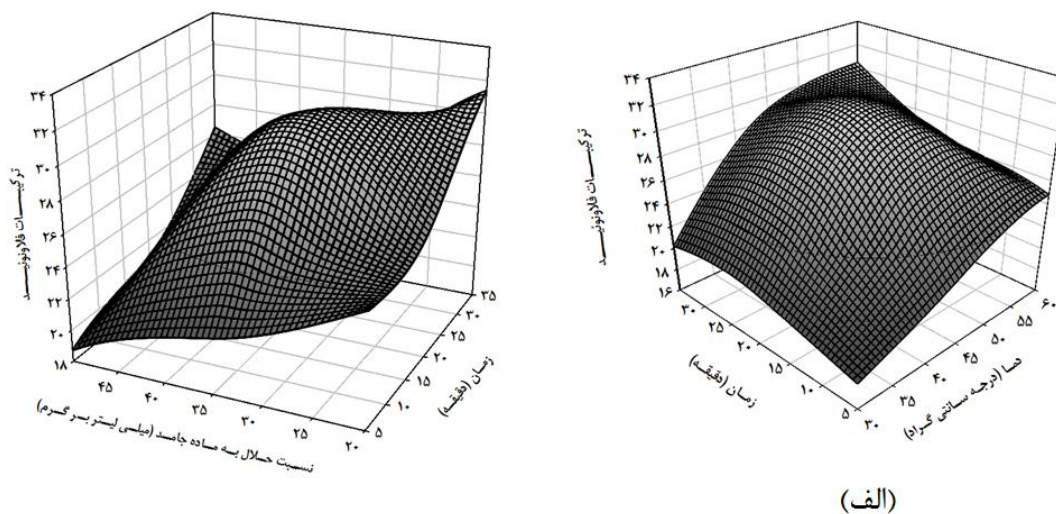
شکل ۲: نمایش سه بعدی، اثر همزمان دما- زمان (الف)، دما- نسبت حلال به ماده جامد (ب) زمان- نسبت حلال به ماده جامد (ج) نمایش اثر متغیرهای مستقل روی میزان استخراج عصاره متانولی میوه سنجد بر میزان ترکیبات فنولیک (د)

جدول ۵: تجزیه واریانس مدل چند جمله ای درجه دوم- پارامتر ترکیبات فنولیک

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	احتمال F	احتمال P	
مدل	۱۷۶۲/۳۴	۹	۱۹۶/۳۷	۴۴/۶۲	<۰/۰۰۰۱	Significant
A	۱۹۹/۴۰	۱	۱۹۹/۴۰	۴۵/۳۱	۰/۰۰۰۳	
B	۳۲۷/۱۷	۱	۳۲۷/۱۷	۷۴/۳۴	<۰/۰۰۰۱	
C	۲۲۱/۹۷	۱	۲۲۱/۹۷	۵۰/۴۲	۰/۰۰۰۲	
A ²	۲۵۷/۹۱	۱	۲۵۷/۹۱	۵۸/۶۰	۰/۰۰۰۱	
B ²	۴۱۴/۸۹	۱	۴۱۴/۸۹	۹۴/۲۷	<۰/۰۰۰۱	
C ²	۱۹۲/۷۸	۱	۱۹۲/۷۸	۴۳/۸۰	۰/۰۰۰۳	
AB	۱۶/۶۵	۱	۱۶/۶۵	۳/۷۸	۰/۰۹۲۹	
AC	۳/۳۵	۱	۳/۳۵	۰/۷۶	۰/۴۱۱۹	
BC	۳۵/۰۵	۱	۳۵/۰۵	۷/۹۶	۰/۰۲۵۷	
Residual	۳۰/۸۱	۷	۴/۴۰			not significant
ضعف برازش	۱۴/۴۹	۳	۴/۹۸	۱/۲۶	۰/۴۰۱۲	
خطا	۱۵/۸۶	۴	۳/۹۷			
کل	۱۷۹۸/۱۵	۱۶				
R-Squared	۰/۹۸۲۹					
Adj R-Squared C.V	۰/۹۶۰۸ ۲/۲۹					

جدول ۶: تجزیه واریانس مدل چند جمله ای درجه دوم- پارامتر بازده استخراج ترکیبات فلاونوئید

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	احتمال F	احتمال P	
مدل	۴۱۵/۳۰	۹	۴۶/۱۴	۳۲/۹۵	<۰/۰۰۰۱	Significant
A	۵۸/۰۰	۱	۵۸/۰۰	۴۱/۴۱	۰/۰۰۰۴	
B	۱۰۴/۲۶	۱	۱۰۴/۲۶	۷۴/۴۴	۰/۰۰۰۱	
C	۵۸/۲۱	۱	۵۸/۲۱	۴۱/۵۷	۰/۰۰۰۴	
A ²	۳۳/۷۶	۱	۳۳/۷۶	۲۴/۱۰	۰/۰۰۱۷	
B ²	۹۴/۸۶	۱	۹۴/۸۶	۶۷/۷۳	۰/۰۰۰۱	
C ²	۳۱/۵۳	۱	۳۱/۵۳	۲۲/۵۷	۰/۰۰۲۱	
AB	۳/۲۸	۱	۳/۲۸	۲/۳۴	۰/۱۷	
AC	۰/۵۵	۱	۰/۵۵	۰/۳۹	۰/۵۵۱۶	
BC	۱۳/۸۴	۱	۱۳/۸۴	۹/۸۸	۰/۰۱۶۳	
Residual	۹/۸۰	۷	۱/۴۰			not significant
ضعف برازش	۸/۰۳	۳	۲/۶۸	۶/۰۴	۰/۰۵۷۵	
خطا	۱/۷۷	۴	۰/۴۴			
کل	۴۲۵	۱۶				
R-Squared	۰/۹۷۶۹					
Adj R-Squared C.V	۰/۹۴۷۳ ۴/۵۳					



شکل ۳: نمایش سه بعدی، اثر همزمان دما- زمان (الف)، زمان- نسبت حلال به ماده جامد (ب)، دما- نسبت حلال به ماده جامد (ج) و نمایش اثر متغیرهای مستقل روی میزان استخراج عصاره متانولی میوه سنجد بر ترکیبات فلاونوئیدی (د)

جدول ۷: مقایسه‌ای تغییرات میزان بازده استخراج، فنل و فلاونوئید عصاره‌ها در شرایط مختلف استخراج (فراصوت و خیساندن)

روش استخراج		آزمون‌ها
خیساندن	فراصوت	میزان بازده استخراج (میلی گرم به ازای یک گرم از پودر اولیه)
۲۰/۱ ^a	۲۱/۵۸ ^a	فنل (میلی گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک)
۶۵/۳۳ ^b	۱۰۶/۳۱ ^a	فلاونوئید (میلی گرم کوئرستین به ازای ۱ گرم از پودر اولیه)
۲۸/۹۵ ^b	۳۲/۹۸ ^a	

بحث

بررسی اثر متغیرهای ثابت مطالعه روی استخراج

ترکیبات فنولیک: با توجه به نمودار سطح پاسخ (شکل ۲-الف) با افزایش دما تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد و زمان تا ۲۵ دقیقه مقدار استخراج ترکیبات فنولیک افزایش یافت اما در دما و زمان‌های بالاتر از آن روند استخراج کاهش یافته است. مطابق با شکل ۲-ب، با افزایش نسبت حلال به ماده جامد تا ۳۵ میلی‌لیتر حلال بر گرم نمونه در زمان تماس تا ۲۵ دقیقه، میزان ترکیبات فنولیک افزایش یافته در حالی که در زمان تماس زیاد، کاهش داشت. با افزایش نسبت حلال به ماده جامد بازدهی استخراج ترکیبات فنولیک افزایش می‌یابد ولی با طولانی شدن زمان تماس و افزایش نسبت حلال به نمونه عصاره رقیق شده و منجر می‌شود بازدهی استخراج ثابت بماند. در شکل ۲-ج، با افزایش دما در نسبت حلال به ماده جامد کم، میزان ترکیبات فنولیک افزایش یافته ولی در نسبت حلال به ماده جامد کاهش یافته است. علت کاهش ترکیبات فنولیک در نسبت زیاد حلال به نمونه اینطور بیان شده ؛ عصاره محلول خیلی رقیق شده که منجر به یکنواختی بازده استخراج یا کاهش اندک می‌شود.

افزایش دما سبب افزایش ضریب نفوذ حلال شده و افزایش زمان نیز مدت زمان انتقال جرم را افزایش

می‌دهد. با توجه به نمودار سطح پاسخ، به دلیل اشباع شدن حلال در دما و زمان‌های بالاتر و همچنین به دلیل حساسیت ترکیبات فنولی، در دماهای بالاتر می‌باشد. علت افزایش میزان استخراج ترکیبات فنولی با افزایش زمان فراصوت را می‌توان به پدیده حفره‌زایی نسبت داد در اثر انتشار امواج صوتی در فاز جامد-مایع و چرخه‌های انقباض و انبساطی در محیط ایجاد می‌شود که سبب تشکیل حباب شده و این حباب‌ها در ادامه رشد و در نهایت متلاشی می‌شوند. این عمل باعث نوسان ذرات جامد و مایع شده و تحت عمل فراصوت سرعت پیدا می‌کنند. در نتیجه مواد حل شونده سریعاً از فاز جامد به حلال انتشار پیدا می‌کنند. علاوه بر این، فرآیندهایی نظیر امولسیفیکاسیون، انتشار و صدمه به بافت نیز به افزایش استخراج اجزای مورد نظر از مواد خام کمک می‌کنند لازم به ذکر است که در زمان‌های بالاتر ممکن است به دلیل وقوع اکسیداسیون (به علت قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت) میزان استخراج کاهش یابد (Rostagno et al., 2003). با توجه به جدول ۵، نتایج کلیه پارامترها دارای اثر معنی‌داری در مدل بودند ($P < 0/001$) بنابراین می‌توان با توجه به پارامترهای معنی‌دار شده معادله کلی مدل درجه دوم را به صورت زیر گزارش کرد:

$$Y = 103/30 + 4/99x_1 + 6/40x_2 + 5/27x_3 - 7/83x_1^2 - 9/93x_2^2 - 6/77x_3^2 + 2/04x_1x_2 - 0/92x_1x_3 - 2/96x_2x_3$$

معادله ۲.

ضریب تبیین R^2 برای مدل پیش بینی شده در مورد پاسخ ترکیبات فنولیک عصاره متانولی ۰/۹۸۲۹ و مقدار P برای آزمون فقدان برازش ۰/۴۰۱۲ بود. این مقادیر نشان می‌دهد که مدل ارائه شده می‌تواند به خوبی پاسخ مورد نظر را پیش‌بینی نماید.

بررسی اثر متغیرهای ثابت مطالعه بر روی استخراج ترکیبات فلاونوئیدی میوه سنجد به روش فراصوت: با توجه به نمودار سطح پاسخ (شکل ۳- الف)، با افزایش دما و زمان مقدار استخراج ترکیبات فلاونوئید افزایش یافت، اما در دما و زمان‌های بالاتر درصد استخراج کاهش یافته است. با توجه به نمودارها می‌توان بیان کرد که دما و زمان به‌طور معنی‌داری بر میزان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی مؤثر است به

طوری که با افزایش دما و زمان، روند افزایشی در میزان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی مشاهده شده است. افزایش دما سبب افزایش ضریب نفوذ حلال و افزایش زمان نیز سبب افزایش مدت زمان انتقال جرم می‌شود. با توجه به نمودارهای سطح پاسخ (شکل ۳- ب و شکل ۳- ج) به دلیل اشباع شدن حلال در دما و زمان‌های بالاتر و همچنین به دلیل از هم پاشیدگی دمایی ترکیبات فلاونوئیدی، در دماهای بالاتر می‌باشد. با توجه به جدول ۶، نتایج کلیه پارامترها دارای اثر معنی‌داری در مدل بودند ($P < ۰/۰۰۱$) بنابراین می‌توان با توجه به پارامترهای معنی‌دار شده معادله کلی مدل درجه دوم را به صورت زیر گزارش کرد:

$$Y = 22/99 + 2/69x_1 + 3/61x_2 + 2/70x_3 - 2/83x_1^2 - 4/75x_2^2 - 2/74x_3^2 + 0/091x_1x_2 + 0/37x_1x_3 - 1/86x_2x_3 \quad \text{معادله (۳)}$$

ضریب تبیین R^2 مدل پیش‌بینی شده در مورد پاسخ فلاونوئید ۰/۹۷۶۹ و مقدار P برای آزمون فقدان برازش ۰/۰۵۷۵ بود. این مقادیر نشان می‌دهد که مدل ارائه شده می‌تواند به خوبی پاسخ مورد نظر را پیش‌بینی نماید.

اثر روش استخراج بر بازده استخراج، ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی میوه سنجد: همانگونه که در جدول ۷ مشاهده می‌شود، اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولیک عصاره‌های استخراجی با روش‌های خیساندن و فراصوت حاکی از آن بود که روش استخراج تاثیر به‌سزایی بر میزان کل ترکیبات فنولیک (بر حسب اسید گالیک) و فلاونوئید (بر حسب کوئرستین) دارد. روش فراصوت، ترکیبات فنولیک و فلاونوئید بیشتری را نسبت به روش خیساندن استخراج کرده است. می‌توان گفت استرس برشی حاصل از امواج فراصوت باعث شکسته شدن مولکول‌های پلیمری بزرگ و در نتیجه باعث استخراج

بهرتر ترکیبات فنولیک نسبت به روش خیساندن می‌شود. حفره‌سازی روش فراصوت، نیروهای برشی را ایجاد می‌کند که دیواره‌های سلول را به‌طور مکانیکی می‌شکند و انتقال مواد را بهبود می‌بخشد. از این اثر در استخراج مواد از سلول‌ها استفاده می‌شود. به‌همین دلیل روش فراصوت سریع‌تر و کامل‌تر از روش خیساندن است. فراصوت همچنین سبب کاهش اندازه ذرات می‌شود که سطح تماس را افزایش داده و در نتیجه انتشار حلال در بافت افزایش می‌یابد. بنابراین راندمان عصاره‌گیری در طی ۲۴ ساعت با روش خیساندن تقریباً برابر با ۱۵ دقیقه با روش فراصوت است. در هر حال، روش فراصوت به دلیل کاستن قابل توجه زمان عصاره‌گیری و افزایش کارایی نسبت به روش خیساندن ارجح می‌باشد. نتایج بدست آمده از این مقایسه با گزارش جکز و همکاران (et al., 2005) Jacques) در سال ۲۰۰۵ مطابقت دارد. وی راندمان عصاره‌گیری از برگ بلوط را توسط حلال‌های متانول و

دقیقه بود. در طرح نمودار سطح پاسخ فاکتور دما به عنوان تأثیرگذارترین فاکتور انتخاب شد. بهترین مدل انتخابی حاصل از تجزیه و تحلیل آماری در روش سطح پاسخ برای تمام آزمون‌ها، مدل درجه دوم بود. مقایسه بین دو روش استخراج، نشان داد که راندمان عصاره‌گیری با دو روش استخراج فراصوت و خیساندن تفاوت معنی داری ($P < 0/05$) وجود ندارد. بیشترین میزان استخراج عصاره در روش فراصوت و خیساندن به ترتیب ۲۱/۵۸ و ۲۰/۱ میلی‌گرم عصاره به ازای یک گرم از پودر اولیه بود. بالاترین قدرت استخراج کنندگی ترکیبات فنولیک در روش فراصوت و خیساندن به ترتیب ۱۰۶/۳۱ و ۶۵/۳۳ میلی‌گرم معادل اسید گالیک به گرم نمونه خشک و همچنین ترکیبات فلاونوئیدی در روش فراصوت و خیساندن به ترتیب ۳۲/۹۸ و ۲۸/۹۵ میلی‌گرم کوئرستین به ازای ۱ گرم از پودر اولیه بود. نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد تکنیک‌های نوین نظیر امواج فراصوت می‌تواند راندمان استخراج ترکیبات فنولیک و فلاونوئید عصاره میوه سنجد را بهبود بخشد. در استخراج ترکیبات فنولیک به کمک امواج فراصوت به علت پایین بودن زمان استخراج، ترکیبات فنولیک دچار آسیب کمتری می‌شود. همچنین نتایج حاصل از تحقیق، بیانگر کارایی مفید روش سطح پاسخ در بهینه‌سازی فرآیند استخراج ترکیبات فنولیک به روش فراصوت می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از پرسنل محترم مرکز تحقیقات سلامت فرآورده‌های طبیعی خراسان شمالی که صمیمانه با ما همکاری داشتند تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

هگزان با دو روش فراصوت و خیساندن مقایسه کرد و دریافت که تفاوت قابل ملاحظه‌ای در راندمان استخراج توسط حلال متانول وجود ندارد گلی و همکاران (Goli et al., 2005) فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست پسته را بررسی کردند و نتایج مشابهی را در این زمینه اعلام نمودند. این محققان گزارش کردند که بین بازده عصاره‌گیری پوست پسته توسط روش‌های فراصوت و خیساندن توسط حلال‌های آب متانول و اتیل استات، اختلاف معنی داری وجود ندارد. همچنین دزاشیبی و همکاران (Dezashibi, 2007) نیز اعلام کردند که بین راندمان عصاره‌گیری، عصاره برگ حنا با دو روش مختلف استخراج با حلال یعنی خیساندن و فراصوت در سطح آماری ($P < 0/05$) تفاوت معنی داری وجود ندارد. این نتایج با گزارش آلبو و همکاران (Albu et al., 2004) در سال ۲۰۰۴ مطابقت دارد، این محققان گزارش کردند که استفاده از روش فراصوت باعث افزایش کارنوسیک اسید استخراج شده از رزماری می‌شود. یاکین و جیان (Ya- Qin and Jian- Chu., 2009) در سال ۲۰۰۹ ضمن بررسی روند استخراج ترکیبات فنولیک از نارنگی بیان داشتند که استفاده از فراصوت باعث افزایش استخراج ترکیبات فنولیک نسبت به روش خیساندن شده است. همچنین روش فراصوت ترکیبات فنولیک بیشتری را بر حسب اسید تانیک نسبت به روش استخراج غرفابی کرده است (Dezashibi, 2007).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج حاصل از مطالعه حاضر با استفاده از آزمون باکس بنکن به منظور افزایش استخراج عصاره سنجد، حاکی از آن بود که شرایط بهینه استخراج عصاره نسبت حلال به ماده جامد ۳۱/۷۹ میلی‌لیتر به گرم نمونه، دمای ۵۲/۸۷ درجه سانتی‌گراد، زمان ۲۵/۴۴

References

1. Albu, S.E., Joyce, L., Paniwnyk, J.P., Lorime, T., Manson, J. 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidant from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(3- 4): 261-265.
2. Atkinson, A.C., Donev, A.N. 1992. Optimum experimental designs. Oxford University Press, Nov 1992. pp. 344
3. Ahmadiani, A., Hosseiny, J., Semnanian, S., Javan, M., Saeedi, F., Kamalinejad, M., Saremi, S. 2000. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Elaeagnus angustifolia* fruit extract. *Journal. Ethnopharmacol*, 72(1-2):287-92.
4. Akbolat, D., Ertekin, C., Menges, H.O., Guzel, E., Ekin, K. 2008. Physical and nutritional properties of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) growing in Turkey. *Asian of Journal Chemistry*, 20: 2358-2366.
5. Bahman Abadi, J. 2012. Optimization of ultrasonic extraction of barberry by RSM. MS thesis. Islamic Azad University. Quchan Branch. 72
6. Basiri, S.H., Shahidi, F., Kadkhodae, R., Farhosh, R. 2011. An investigation on the effect of ultrasound waves and pretreatment methods on the extraction of oil from pomegranate seeds. *Journal of Food Science and Technology*, 8(31): 115-122.
7. Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10: 178-182.
8. Chemat, S., Ranck, T., James, D. 2004. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal*, 19: 188-195.
9. Dezashibi, Z. 2007. Evaluation of antioxidant activity of Hana leaf extract. MS thesis. Islamic Azad University. Sabzevar Branch. 81
10. Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., Hafezi, S. 2008. Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish, Journal of Biology*, 32: 43-49.
11. Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E. 2009. A kinetic study of oxidation development in sunflower oil under microwave heating: Effect of natural antioxidants. *Food Research International*, 42(8): 1171- 1177.
12. Francl, E.N., Meyer, A.S. 2000. The problems of using one-dimensional methods of evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (13): 1925-1941.
13. Goli, A.H., Barzegar, M., Sahari, M.A. 2005. Antioxidant activity and total phenolic compound of pistachio (*pistachia vera*) hull extract. *Food chemistry*, 92: 521-525.
14. Hayouni, E.A., Abedrabba, M., Bouix, M. and Hamdi, M. 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of *Tunisian Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food chemistry*, 105(3), 1126- 1134.
15. Hosseinzadeh, H., Ramezani, M., Namjo, N. 2003. Muscle relaxant activity of *Elaeagnus angustifolia* L. fruit seeds in mice. *Journal of Ethnopharmacol*, 84: 275-278.
16. Hui, L., Etsuzo, O., Masao, L. 1994. Effects of ultrasound on the extraction of saponin from ginseng. *Japanese Journal of Applied Physics*, 33: 3085-3087.
17. Jacques, R.A., Freitas, L.S., Perez, V.F., Dariva, C., Oliverira, A.P., Oliveira, J.V., Carmo, E.B. 2007. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14 (1): 6-12.
18. Myers, R.H., Montgomery, D.C. 2002. Response surface methodology process and product optimization using designed experiments. Wiley Pub Inc, 51-83.
19. Mathew, S., Abraham, T.E. 2005. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract

- assayed by different methodologies. Food and Chemical Toxicology, 44 (2): 198-206.
20. Rostagno, A., Palma, M., Barroso, C. 2003. Ultrasound assisted extraction of soy isoflavones. Journal of Chromatography A, 1012 (2): 119-128.
21. Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrasonics Sonochemistry, 8: 303-313.
22. Wang, Ya., Guo, Tao., Yin, Li-Jia., Shanzhen, Z., Zhao, P. 2012. Four flavonoid glycosides from the pulps of *Eleagnus angustifolia* and their antioxidant activities. Proceedings of the 2012 2nd International Conference on Computer and Information Application (ICCIA 2012) 1666-1669.
23. Ya-Qin, M.A., Jian-Chu, C. 2009. Simultaneous extraction of phenolic compound of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. Journal of Ultrasonics Sonochemistry, 16: 57-62.
24. Yang, J.H., Lin, H.C., Mau, J.L. 2002. Antioxidant properties of several Commercial mushrooms. Food Chemistry, 71, 224-235.
25. Zargari, A. 1998. Medical plant. Volume IV, Fifth Edition, Tehran University Press. Tehran. 274-277.
26. Zhang, L., Shan, Y., Tang, K., Putheti, R. 2009. Ultrasound-assisted extraction flavonoids from Lotus (*Nelumbonificera gaertn*) leaf and evaluation of its anti-fatigue activity. International Journal of physical Sciences, 4(8): 418-422.
27. Zolfaghari, B., Yekdaneh, A. 2009. Recent advances in the field of herbal extraction methods. Herbal medicines, 1(1): 51-55.