نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۱، شماره ۴، مهر- آبان ۱۳۹۴، ص. ۲۹۵-۲۸۵

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 11, No. 4, Oct- Nov 2015, p. 285-295

بررسی عوامل موثر بر استخراج پلی‌فنول‌ها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی چای‌سبز

اکرم آریان فر[۱]- فخری شهیدی[۲*]- رسول کدخدایی[۳]- مهدی وریدی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۵/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۳۰

چکیده

چای با نام علمی *Camellia sinensis* از دم‌نوش‌های رایج و معروف در دنیا محسوب می‌گردد. مهم‌ترین ترکیب شیمیایی چای پلی‌فنول‌ها (کاتچین‌ها) هستند که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی بوده و در جلوگیری از بروز بیماری‌های قلبی مفید می‌باشد. هدف از این پژوهش، بررسی اثر عوامل مختلف از جمله دما در چهار سطح(۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد)، زمان(در چهار سطح ۱۵،۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه) ، توان امواج مایکروویو(۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ درصد)و شدت امواج فراصوت (۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد) بر میزان استخراج پلی فنول‌ها از برگ چای سیز و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره در سه روش هیت رفلاکس، مایکروفر و فراصوت بوده است. نتایج نشان داد که با افزایش دما تا $80^{\circ}C$، زمان تا ۴۵ دقیقه، افزایش شدت امواج فراصوت از ۴۰ تا ۸۰ درصد و افزایش توان امواج مایکروویو از ۳۰۰ تا ۶۰۰ درصد، میزان پلی فنول‌های استخراج شده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره در هر سه روش افزایش یافته و پس از آن تقریبا بدون تغییر بوده است. (α= ۰/۰۵)

واژه‌های کلیدی: چای سبز، ترکیبات پلی فنولی، فعالیت آنتی اکسیدانی، هیت رفلاکس،فراصوت، مایکروویو

مقدمه

چای با (*Camellia sinensis*) گیاهی است بوته‌ای که بومی چین و شمال هندوستان می‌باشد. از برگ‌های خشک این گیاه به اشکال گوناگون در تهیه انواع دم‌نوش‌ها استفاده می‌شود. چای یکی از دم‌نوش‌های رایج و معروف در دنیا، از جمله کشور ایران بوده و پس از آب پر مصرف‌ترین نوشیدنی دنیا است (Komes *et al*., 2010)

ترکیبات متشکله برگ چای شامل فلاوانول‌ها، فلاوونول‌ها، اسیدهای فنولیک، کافئین، تئوبرومین، پروتئین، اسیدهای آمینه ، اسیدهای آلی، مونو و پلی ساکاریدها، لیگنین، چربی، کلروفیل و سایر رنگدانه‌ها، خاکستر و مواد معطر می‌باشند که ترکیبات فلاوونوئیدی(پلی فنول‌ها) از مهم‌ترین آن‌ها محسوب می‌گردند و دارای نقش سلامتی زا هستند (Harbowy *et al*., 1997)

کاتچین ها[۶] (فلاوان-۳-ال)[۷] نوعی آنتی‌اکسیدان و از مهم‌ترین فلاوانول‌ها به شمار می‌روند. کاتچین‌های چای سبز شامل اپی‌کاتچین[۸]، اپی‌کاتچین‌گالات[۹]، اپی‌گالوکاتچین[۱۰] و اپی‌گالوکاتچین‌گالات[۱۱] می‌باشند. فراوان‌ترین و فعال‌ترین کاتچین (فعالیت آنتی‌اکسیدانی)، اپی‌گالوکاتچین گالات می‌باشد(Komes *et al*., 2010).

فعالیت آنتی اکسیدانی کاتچین‌ها به کیفیت برگ چای (موقعیت جغرافیایی کشت، آب و هوا، شرایط برداشت و ذخیره سازی) و شرایط فرایند و عمل آوری آن بستگی دارد(Shisuoka *et al*., 1986).

چای سبز خطر مرگ در اثر بیماری قلبی را بیش از بیست و پنج درصد کاهش می‌دهد و در جلوگیری از بروز بسیاری از بیماری‌ها به‌ویژه سرطان‌های مختلف بسیار حائز اهمیت است که علت آن

۱-دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی ، قوچان، ایران
۲ و ۴- به ترتیب استاد و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
۳- دانشیار گروه نانوفناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی
(*- نویسنده مسئول: Email :Niloofar1373@yahoo.com)

6 -Catechines
7 -Flavan-3-ol
8 -Epicatechin
9 - Epicatechingalat
10 - Epigalocatechin
11 – Epigalocatechingalat

خاصیت آنتی اکسیدانی پلی‌فنول‌های چای می‌باشد. چای سبز در مقایسه با چای سیاه دوره تخمیر و اکسیداسیون کوتاه تری داشته و بنابراین آنتی اکسیدان‌های موجود در آن نسبت به چای سیاه بهتر حفظ می‌شود(Nurulain *et al*., 2006).

تولید و عرضه نوشیدنی چای سبز در مقایسه با سایر نوشیدنی‌های رایج در بازاربه دلیل نقش سلامتی زایی بالای آن بسیار حائز اهمیت است. یکی از مراحل اساسی تولید نوشیدنی چای، فرایند استخراج عصاره از برگ چای می‌باشد. با توجه به اهمیت ترکیبات پلی‌فنولی، عصاره حاصل باید دارای حداکثر ترکیبات پلی‌فنولی باشد. بنابراین بکارگیری یک روش استخراج مناسب جهت استخراج حداکثر این ترکیبات بدون آسیب حرارتی، بسیار حائز اهمیت است.

روش‌های استخراج عصاره از برگ چای شامل استخراج گرم، پرکولاسیون، استخرج مداوم(سوکسله) و هیت رفلاکس با استفاده از حلال‌های آلی می‌باشند که سرعت استخراج در این روش‌ها پایین است. ضمن اینکه با افزایش دمای استخراج بسیاری از ترکیبات چای از جمله پلی فنول‌ها و ترکیبات معطر آسیب دیده وسبب کاهش خواص آنتی اکسیدانی، عطر و طعم عصاره، افزایش استخراج پروتئین و پکتین و در نتیجه افزایش کدورت و تغییر ویژگی‌های حسی عصاره می‌گردند(Lin *et al*., 2008) .

شرایط استخراج عصاره به ویژه دما، زمان، توان امواج مایکروویو، شدت امواج فراصوت، نوع حلال و نسبت ماده خشک به حلال بر کارایی استخراج و کیفیت عصاره حاصل نقش به سزایی دارند. جهت حفظ ویژگی‌های حسی و تغذیه ای عصاره چای سبز، عصاره گیری باید در شرایط دمایی ملایم و در حداقل زمان ممکن صورت پذیرد تا اپی مریزاسیون و ایزومریزاسیون ترکیبات فنولی و سایر آسیب‌های حرارتی به حداقل ممکن کاهش یابد(Sang *et al*., 2005).

Amra و همکاران (۲۰۰۶)، اثر نوع حلال، دما و زمان را بر کارایی استخراج پلی فنول‌ها و کاتکین‌های چای سبز را مورد بررسی قرار داده اند. همچنین کومز و همکاران(۲۰۱۰)، اثر شرایط استخراج و زمان نگهداری بر میزان ترکیبات پلی‌فنولی و ظرفیت آنتی اکسیدانی دم نوش چای سبز در سه حالت کیسه ای ، پودری و برگ چای مورد بررسی قرار داده و دریافتند که بهترین شرایط برای استخراج حداکثر ترکیبات پلی فنولی ۸۰ °C به مدت ۱۵ دقیقه در حالت کیسه ای، ۵ دقیقه در حالت پودری و ۳۰ دقیقه برای برگ چای می‌باشد(Komes *et al*., 2010). ضیاءالدینی و همکاران (۲۰۱۰)، اثر دما و زمان بر حلالیت کاتچین‌ها و کافئین از برگ سبز چای ایرانی و همچنین سنتیک انتقال جرم و مدل سازی استخراج مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران شرایط بهینه استخراج کافئین را ۸۰ °C به مدت ۲۰ دقیقه، اپی کاتچین و اپی گالوکاتچین ۸۰ °C به مدت ۲۰ دقیقه، اپی گالوکاتچین گالات ۹۰ °C به مدت ۴۰ دقیقه و کاتچین را ۹۰ °C به مدت ۸۰ دقیقه گزارش کردند (Ziaedini *et al*., 2010).

Shisuoka (۱۹۸۶)، اثر دما، فشار اکسیژن و pH بر اتواکسیداسیون و اپی مریزاسیون اپی‌گالوکاتچین، تحت شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده و نشان داده است که با افزایش دما حساسیت این ترکیب به سایر شرایط محیطی افزایش یافته و تجزیه خواهند شد. همچنین اثر دما و pH بر واکنش‌های سنتیکی کاتچین‌ها در دم نوش چای سبز مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شده است که اکثرکاتچین‌ها تقریبا تا دمای ۸۰ °C پایدار بوده و پس از ان دچار واکنش‌های اپی‌مریزاسیون و اکسیداسیون می‌گردند (Komatsu *et al*., 1992). Manzocco و همکاران (۱۹۹۸)، اثر فرآیند پاستوریزاسیون و زمان نگهداری را بر خصو صیات آنتی اکسیدانی عصاره چای بررسی کردند و دریافتند تحت این شرایط ممکن است بدلیل تولید محصولات واسطه حاصل از اکسیداسیون کاتکین‌ها و فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتر این ترکیبات نسبت به اپی کاتکین ها، خواص آنتی اکسیدانی افزایش یابد.

امروزه از روشهای نوین، جهت استخراج ترکیبات موثره گیاهی از جمله پلی فنول‌های چای استفاده می‌شود.این روش‌ها عبارتند از: مایکروویو[1]، امواج فراصوت[2]، دی اکسیدکربن فوق بحرانی[3] و فشار بالای هیدروستاتیک[4] .

در سال‌های اخیر استفاده از امواج مایکروویو در صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از تکنیک‌های سنتی در استخراج ترکیبات از منابع گیاهی مستلزم صرف زمان و حلال می‌باشد، همچنین این روش‌ها از لحاظ دمایی ایمن نیستند و باعث تجزیه تعدادی از ترکیبات موجود می‌گردند. Wang و همکاران (۲۰۰۶)، استخراج با امواج مایکروویو (MAE) جهت استخراج ترکیبات فعال بیولوژیکی و اسانس‌های روغنی از علف‌ها و استخراج پلی فنول‌ها و کافئین از برگ چای سبز مورد بررسی قرار دادند از مزایای استخراج با امواج مایکروویو مصرف پایین انرژی و حلال ،زمان کوتاه استخراج و همچنین محافظت از ترکیبات حساس به حرارت می‌باشد. امواج مایکروویو، امواج الکترومغناطیسی با فرکانس ۰/۳ تا ۳۰۰ گیگاهرتز هستند. مایکرویوهای خانگی و صنعتی معمولا در فرکانس ۲/۴۵ گیگاهرتز کار می‌کنند. در استخراج با امواج مایکروویو امواج جذب شده توسط نمونه موجب تولید گرما می‌گردد که این گرما موجب تبخیر آب نمونه و اعمال فشار روی دیواره سلولی نمونه می‌گردد که منجر به تخریب دیواره و رهایی ترکیبات درون سلول می‌گردد(Quan *et al*.,

1- Microwave Assisted Extraction (MAE)
2 - Ultrasound Assisted Extraction (UAE)
3 - Supercritical Co_2
4 - High Hydrostatic Pressure

2009;Wang *et al*.,2006). بنابراین استفاده از امواج مایکروویو مقدار ترکیبات استخراج شده را بهبود می‌بخشد. پن و همکاران(۲۰۰۳)، اثر عوامل موثربر استخراج شامل نوع و غلظت حلال، زمان، نسبت جامد به مایع، زمان خیساندن قبل از استخراج بر میزان استخراج پلی فنول-ها و کافئین از از چای سبز به روش (MAE) مورد بررسی قرار داده و بهترین زمان استخراج در این روش ۴ دقیقه گزارش کرده اند. همچنین مشخص شده است که این روش نسبت به روشهای سنتی کارایی بیشتری دارد. Wang و همکاران(۲۰۱۰) اثر پارامترهای زمان، توان، نوع و غلظت حلال بر میزان استخراج پلی فنولها از چای سبز مورد بررسی قرار دادند . در این پژوهش از اتانول ۶۰ درصد استفاده شده است و بهترین شرایط را دمای $80^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه با توان ۶۰۰ وات گزارش کرده اند (Wang *et al*., 2010).

در سال‌های اخیر از امواج فراصوت (UAE) به عنوان روشی جهت استخراج ترکیبات موثره مانند اسانس‌ها، روغن‌ها و مکمل‌های رژیمی استفاده می‌شود. این امواج دارای فرکانس‌های بالاتر از ۲۰کیلوهرتز هستندکه در محیط‌های جامد، مایع و گاز ارتعاشات مکانیکی ایجاد میکنند. امواج فراصوت در محیط ماده پخش شده و چرخه‌های انبساط و انقباض ایجاد می‌کنند که در حالت انبساط حباب هایی در محیط مایع ایجاد شده و فشار منفی تولید می‌گردد. ترکیدن حباب‌ها سبب متلاشی شدن سلول‌ها می‌شوند. بنابراین تخریب سلولی و انتقال جرم دو فاکتور موثر بر افزایش راندمان استخراج در این روش می‌باشد. این روش استخراج نسبت به روش‌های استخراج سنتی سبب بهبود کیفیت عصاره استخراج شده و جهت استخراج ترکیبات حساس به حرارت مناسب می‌باشد. بطور کلی یک روش ارزان و ساده و جایگزین مناسب برای روش‌های سنتی می‌باشد. ترکیبات مختلف از جمله آنتی اکسیدان‌ها، طعم و آروما، رنگدانه‌ها و... با این روش استخراج شده اند (Chemat *et al*., 2011; Zbigniew *et al*.,2007) مطالعاتی در زمینه استخراج عصاره چای سبز با امواج فراصوت صورت گرفته و نتایج بدست امده نشان می‌دهد این روش سبب حفظ کیفیت کاتچین‌های عصاره می‌شود Xia و همکاران(۲۰۰۶)، اثر امواج فراصوت را برکارایی استخراج و ویژگیهای حسی و شیمیایی دم نوش چای مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که کارایی استخراج اکثر ترکیبات شیمیایی چای در این روش نسبت به روش‌های سنتی بیشتر، اما میزان استخراج پکتین و پروتئین در این روش کمتر بود. همچنین عطر و طعم عصاره حاصل از این روش نیز بیشتر است (Xia *et al*., 2006).

هدف از این پژوهش بررسی اثر عوامل مختلف از جمله دما، زمان، توان مایکروویو و شدت امواج فراصوت بر میزان استخراج پلی‌فنول‌ها از برگ چای سبز در سه روش هیت رفلاکس، مایکروفر و فراصوت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

عمده ترین مواد اولیه مورد استفاده در این پژوهش برگ چای سبز از گونه *Camellia Sinensis* بود که از مزارع لاهیجان تهیه شد. حلال مورد استفاده نیز آب دیونیزه بوده است.

مواد شیمیایی مورد استفاده جهت اندازه گیری پلی‌فنول‌های عصاره چای سبز شامل فولین سیو کالچو، کربنات سدیم و اسید گالیک با درجه خلوص آزمایشگاهی از سیگما آلدریچ ومعرف ۲و۲ دی فنیل۱ پیکریل هیدرازیل (DPPH) و متانول از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

روش‌ها

مراحل تولید عصاره شامل آماده سازی برگ خشک چای سبز و سپس عصاره گیری به سه روش HRE، MAE، UAE می‌باشد. برگهای خشک چای سبز جهت افزایش سطح تماس حلال با ماده خشک و در نتیجه افزایش راندمان عصاره گیری کاملا خرد شده و سپس با الک با مش ۱۶ الک شدند. جهت عصاره‌گیری، یک گرم از ذرات الک شده با صد میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط شدند (نسبت ۱/۱۰۰) در عصاره گیری به روش HRE ، مخلوط حاصل در یک بالن ته گرد متصل به کندانسور مخلوط شده و توسط حمام آب گرم تحت حرارت قرار گرفتند.

در عصاره‌گیری به روش MAE از دستگاه مایکروسنت آزمایشگاهی (Milestone- ACT-36-Revol) استفاده شد. این دستگاه در فرکانس ۵۰ هرتز و خروجی ۲۴۵۰ مگاهرتز با توان خروجی ۱۰۰-۱۰۰۰ وات و حداکثر دمای $180^{\circ}C$ کار می‌کند. علت استفاده از این دستگاه به جای مایکروفر خانگی، کنترل همزمان دما، زمان و توان می‌باشد. مخلو ط برگ چای و آب دیونیزه با نسبت ۱/۱۰۰ در لوله‌های تفلون ریخته و کاملا مخلوط شدند. لوله‌های تفلون در پوسته‌های محافظ HTC قرار گرفته و درب آنها کاملا بسته شد.

در استخراج به روش فراصوت (UAE) از دستگاه مولد امواج فراصوت (VCX 750 ساخت شرکت Sonics & Materials) آمریکا با فرکانس ۲۵ کیلوهرتز و حداکثر توان اسمی ۷۵۰ وات استفاده شد. از پروب انتقال امواج فراصوت مدل S & M 630-0457، ساخت شرکت Sonics & Materials آمریکابه قطر ۱۵ میلی متر و حمام بن ماری با سیستم سرمایش و سیرکولاسیون خارجی مدل F 26، ساخت شرکت Julabo کشور آلمان استفاده شد.

مخلو ط برگ چای و آب دیونیزه با نسبت ۱/۱۰۰ در محفظه دوجداره دستگاه فراصوت پر شده و سونوترود دستگاه ۱/۵ سانتی متر زیر سطح مایع غوطه ور شد.

در هر سه روش ذکر شده از همزن مغناطیسی با دور ۵۰۰ دور در دقیقه در طول مدت عصاره گیری استفاده شد. عصاره گیری در دماهای ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در زمانهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه صورت گرفت. شدت امواج فراصوت ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد و توان امواج مایکروویو ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ بودند. عصاره‌های حاصل توسط فیلتر خلاء صاف و در ۴ °C (یخچال) نگهداری شدند.

میزان ترکیبات پلی فنولی عصاره‌های حاصل به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از معرف فولین سیو کالچو اندازه گیری شد (استاندارد ملی ایران. شماره ۱-۸۹۸۶).

یک میلی لیتر از عصاره صاف شده با صد میلی لیتر آب دیونیزه رقیق شده و یک میلی لیتر از عصاره رقیق شده با پنج میلی لیتر معرف فولین سیو کالچو ۱۰ درصد مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه جهت مخلوط شدن کامل ورتکس شد. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در یک مکان تاریک نگهداری شده و رنگ آبی ایجاد شده در طول موج ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-160 A Shimadzu اندازه گیری شد. منحنی کالیبراسیون اسید گالیک نیز (۰/۰۰۵ تا ۰/۰۵ میلی گرم بر لیتر اسید گالیک) رسم شد و نتایج حاصل از اندازه گیری نیز بر پایه معادله این منحنی, به صورت اکی والان اسید گالیک در هر گرم نمونه بیان شد. ۰/۹۹ =R^2 (۱)

$$Y = 62.94\,X - 0.67$$

خواص آنتی اکسیدانی عصاره‌های حاصل بر اساس فعالیت به دام اندازی رادیکال‌های آزادDPPH به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری شد. یک میلی لیتر از عصاره صاف شده با یک میلی لیتر معرف DPPH (۰/۱ میلی مول در اتانول) مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر اتانول ۹۵٪ به عنوان شاهد با دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu UV-160 A اندازه گیری شد(Brand-Williams *et al*., 2010).

$$\text{درصد بازدارندگی} = \left[\frac{(A517blank - A517sample)}{A517blank}\right] \times 100 \qquad (۲)$$

تجزیه و تحلیل آماری: در این پژوهش اثر چهار سطح دما، چهار سطح زمان و سه سطح توان مایکروویو سه سطح توان دستگاه مولد امواج فراصوت بر میزان استخراج ترکیبات پلی فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره چای سبز مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه واریانس نتایج باآزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. کلیه آزمون‌ها در سه تکرار و میانگین تکرارها در قالب آزمون دانکن در سطح آماری ۵ ٪ مورد مقایسه قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار Minitab 16 انجام شد.

نتایج و بحث

اثر دما بر میزان استخراج پلی‌فنول‌های چای سبز

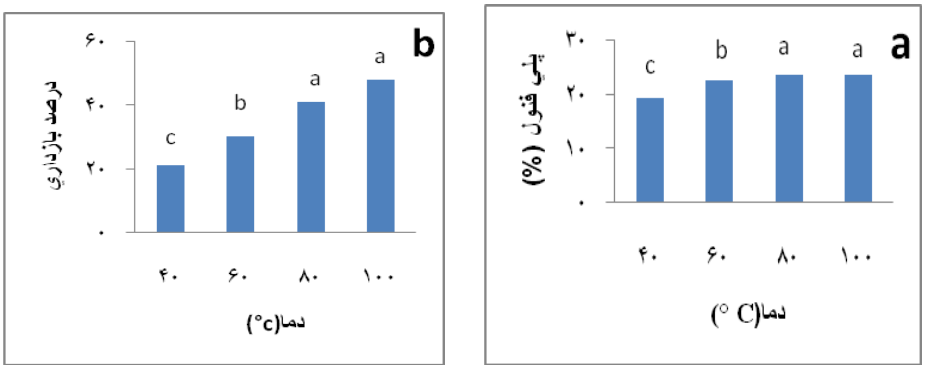
روش استخراج HRE: نتایج آنالیز واریانس نشان می‌دهد که باافزایش دمای استخراج از ۴۰ تا ۶۰ درجه سانتی گراد درصد استخراج پلی فنولهاودرصد بازداری رادیکال‌های آزاد DPPH بطور معنی داری افزایش یافته و پس از آن ثابت بود ($p< ۰/۰۵$). همانطور که در شکل (a,b) ۱ مشاهده می‌شود با افزایش دمای استخراج تا ۸۰ °C ترکیبات پلی فنولی و درصد بازداری به ترتیب به میزان ۲۳/۵۳٪ و ۴۳٪افزایش یافته و سپس ثابت بوده است. با افزایش دمای استخراج انتشار ترکیبات پلی فنولی از داخل سلول افزایش می‌یابد. علت عدم تغییر میزان پلی فنول‌ها در دماهای بالاتر از ۸۰ °C تجزیه کاتکین‌ها در این دما و اشباع حلال از حل شونده می‌باشد (Jhoo *et al*., 2005; Komatsu *et al*.,1992). نتایج نشان می‌دهد درصد بازداری رادیکال‌های آزاد DPPH با میزان ترکیبات پلی فنولی عصاره رابطه مستقیم دارند.امرا و همکاران در سال ۲۰۰۶ اثر نوع حلال، دما و زمان را بر کارایی استخراج پلی فنول‌ها و کاتکین‌های چای سبز بررسی کردند و به نتایج مشابهی در این زمینه دست یافتند (Amra *et al*., 2006).

Koms و همکاران (۲۰۱۰)، در بررسی اثر شرایط استخراج و زمان نگهداری بر ظرفیت آنتی اکسیدانی دم‌نوش چای سبزبه نتایج مشابهی دست یافتند که ارتباط مستقیم بین میزان پلی‌فنول‌های عصاره را با ظرفیت آنتی اکسیدانی تایید می‌کنند.

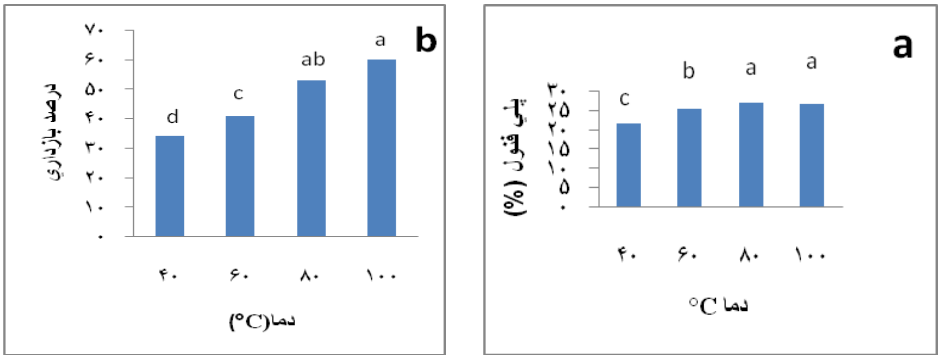
روش استخراج UAE: همان‌طور که در شکل ۲(a,b)، مشاهده می‌شود با افزایش دمای استخراج از ۴۰ °C تا ۸۰ °C میزان پلی فنول‌ها و درصد بازداری رادیکال‌های آزاد DPPH بطور معنی داری افزایش یافته اما افزایش دما از ۸۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد اثر معنی داری بر هیچکدام از متغیرها نداشته است ($p< ۰/۰۵$).

پارامترهای قابلیت انتشار و حلالیت ترکیبات چای و ویسکوزیته و فشار بخار حلال تحت تاثیر دما می‌باشند. با افزایش دمای استخراج، تا حدی حفره زایی حبابها افزایش یافته ودر زمان متلاشی شدن انرژی بالاتری تولید می‌کنند اما با افزایش بیشتر دما و فشار بخار، با وجود تشکیل حباب‌های بیشتر، انرژی حاصل از متلاشی شدن حباب‌ها کمتر است همچنین با افزایش دما تا نقطه جوش حلال به‌دلیل افزایش فشار بخار داخل ریز حباب‌ها و در نتیجه فرونشاندن موج شوک و کاهش کشش سطحی سونیکاسیون غیر موثر رخ داده و حفره زایی تقریبا به صفر می‌رسد و به همین دلیل با افزایش دمای استخراج از ۸۰ °C ، میزان پلی فنول‌های استخراجی و در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی تقریبا ثابت می‌ماند (Charalampos *et al*.,

.(2006; Vinatoru *et al.*,2001



شکل ۱- اثر دما بر میزان استخراج پلی‌فنول‌ها(a)و در صد بازداری رادیکال DPPH (b) چای سبز در روش HRE



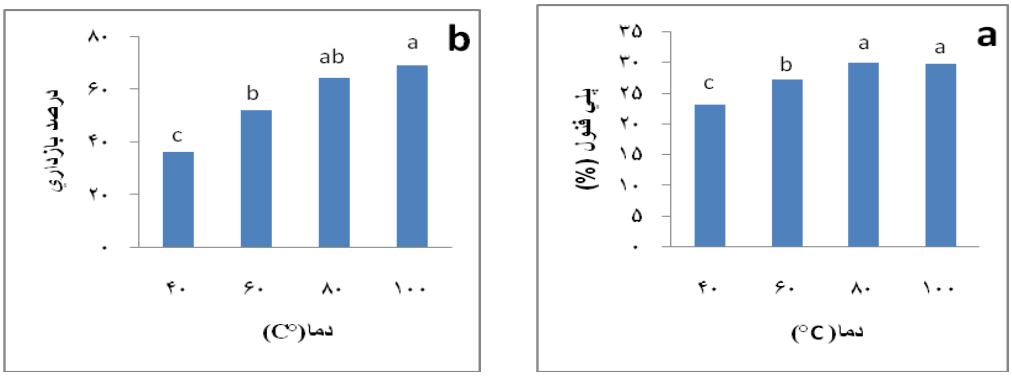
شکل ۲- اثر دما بر میزان استخراج پلی فنول‌ها(a)و در صد بازداری رادیکال DPPH (b)چای سبز در روش UAE

روش استخراجMAE: نتایج آنالیز واریانس گویای معنی‌دار بودن اثر دما بر میزان استخراج پلی‌فنول‌ها و درصد بازداری رادیکال‌های آزاد DPPH از چای سبز بود (p< ۰/۰۵). شکل ۳(a,b)، نشان می‌دهد که با افزایش دمای استخراج از ۴۰ °C تا ۸۰ °C میزان پلی فنول‌ها و درصد بازداری رادیکالهای آزاد DPPH افزایش می‌یابد، اما در دماهای ۸۰ °C تا ۱۰۰ °C افزایش معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. باافزایش دماو جذب آب توسط ذرات چای، فشار بخار داخل سلول‌ها افزایش یافته و با افزایش فشار داخل سیتوپلاسم سلولی، سلول‌ها باد کرده و به دیواره سلولی فشار وارد می‌کنند و بنابراین خروج محتویات سلولی از داخل سلول‌ها افزایش می‌یابد. با افزایش بیشتر دما، و واکنش‌های بین مولکولی در حلال ، مهاجرت ملکولی و قابلیت دسترسی و حلالیت پلی‌فنول‌ها افزایش و در نتیجه بازجذب ترکیبات پلی فنولی از داخل سلول نیز زیاد می‌شود (Wang *et al.*, 2010; Wang *et al.*,2008).

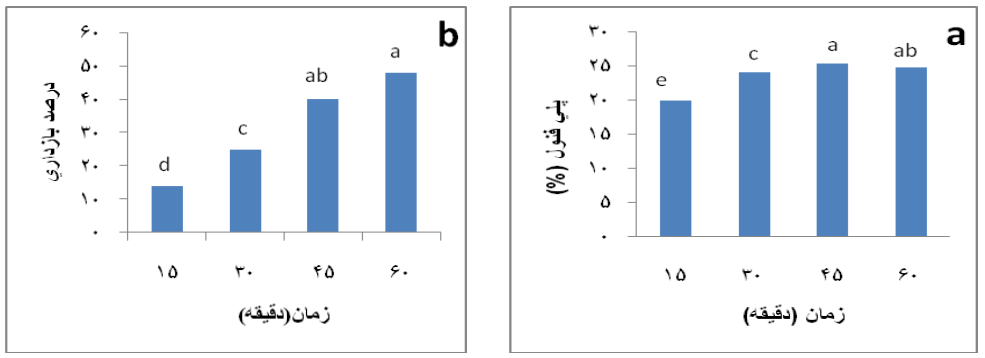
در دماهای بالا ظرفیت حلال جهت حل کردن ترکیبات پلی فنولی افزایش و کشش سطحی و ویسکوزیته حلال کاهش می‌یابد و در نتیجه نفوذ حلال به درون ماتریکس سلول و مرطوب شدن ذرات افزایش می‌یابد. در دماهای بالاتر از ۸۰ °C میزان پلی‌فنول‌ها و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره به دلیل کاهش پایداری آن‌ها در مقابل دما و تجزیه حرارتی و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کاهش می‌یابد (Wang *et al.*, 2010; Zhu *et al.*,1997).

اثر زمان بر میزان استخراج پلی فنول‌های چای سبز

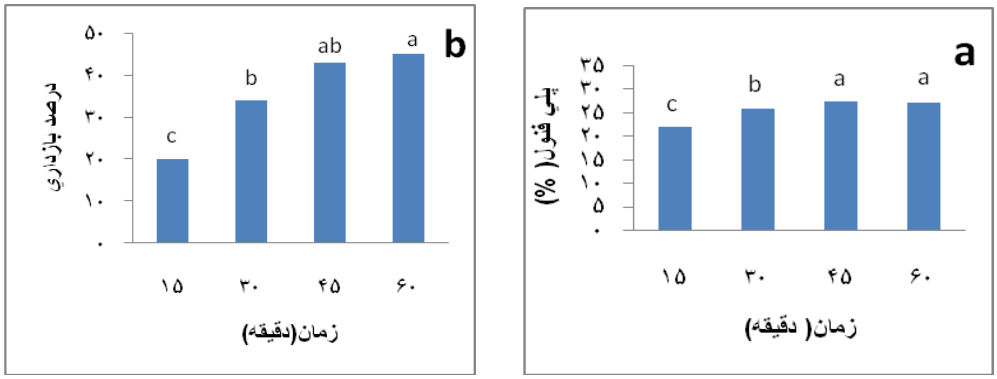
روش استخراج HRE: همان‌طور که در شکل ۴(a,b)، مشاهده می‌شود، افزایش زمان استخراج از ۱۵ تا ۴۵ دقیقه اثر معنی‌داری بر میزان پلی‌فنول‌های استخراج شده و درصد بازداری رادیکال‌های آزاد DPPH از چای سبز داشته است بطوری‌که میزان پلی‌فنول از ۱۸/۸٪ به ۲۳/۵٪ و درصد بازداری از ۱۲٪ به ۴۰٪ افزایش یافته است (p< ۰/۰۵). با افزایش زمان استخراج، مدت زمان تماس حلال و حل شونده افزایش می‌یابد. اما با افزایش زمان استخراج از ۴۵ دقیقه به بالا افزایش معنی‌داری در میزان پلی فنول‌ها مشاهده نمی‌شود که علت آن اشباع شدن حلال از حل شونده می‌باشد و در نتیجه درصد بازداری رادیکال‌های آزاد DPPH نیز ثابت می‌ماند (Lin *et al.*, 2008; Xu *et al.*,2004 &Manzocco *et al.*, 1998).



شکل ۳- اثر دما بر میزان استخراج پلی فنول‌ها(a)و در صد بازداری رادیکال DPPH (b)چای سبز در روش MAE .



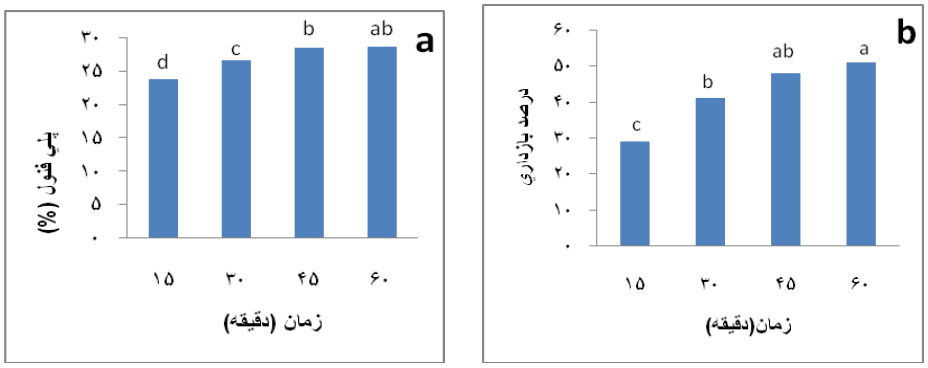
شکل ٤- اثر زمان بر میزان استخراج پلی فنول‌ها (a)و در صد بازداری رادیکال DPPH(b)چای سبز در روش HRE.



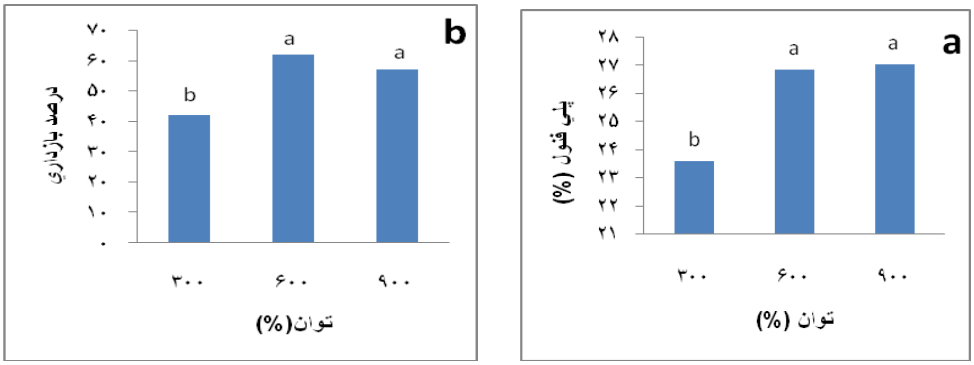
شکل ۵- اثر زمان بر میزان استخراج پلی فنول‌ها(a) و در صد بازداری رادیکال DPPH (b) چای سبز در روش UAE.

روش استخراج UAE: شکل (a,b) ۵، اثر زمان استخراج بر میزان پلی‌فنول‌ها و درصد بازداری رادیکال‌های آزاد DPPH را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس حاکی از این است که با افزایش زمان سونیکاسیون میزان کل پلی‌فنول‌ها و درصد بازداری به ترتیب تا ۲۷/۳٪ و ۴۳٪ افزایش می‌یابد که این افزایش ناشی از تخریب بیشتر دیواره سلولی، تماس بیشتر حلال و حل شونده و در نتیجه افزایش میزان پلی‌فنول‌ها می‌باشد (Vinatoru *et al*., 2001). (p< ۰/۰۵)

روش استخراجMAE: مدت زمان تشعشع امواج مایکروویو نیز یکی از فاکتورهای مؤثر بر میزان استخراج پلی فنول‌ها و درصد بازداری رادیکال‌های آزاد DPPH می‌باشد. همان‌طور که در شکل (a,b)۶، مشاهده می‌شود، افزایش زمان تشعشع از ۱۵ تا ۳۰ دقیقه اثر معنی داری بر میزان پلی‌فنول‌های استخراج شده و درصد بازداری رادیکال‌های داشته است، اما با افزایش زمان استخراج از ۴۵ دقیقه، افزایش معنی داری مشاهده نمی شود (p< ۰/۰۵). نتایج تحقیقات ونگ و همکاران(۲۰۱۰)، نشان داد که با افزایش زمان استخراج تا ۲ دقیقه میزان استخراج پلی‌فنول‌ها افزایش یافته و سپس تغییری نکرده است.



شکل ٦- اثر زمان بر میزان استخراج پلی فنول‌ها(a) و در صد بازداری رادیکال DPPH (b) چای سبز در روش MAE .



شکل ۷- اثر توان امواج بر میزان استخراج پلی فنول‌ها(a)و در صد بازداری رادیکال DPPH (b) چای سبز در روش MAE .

همچنین هانگ-یو و همکاران(۲۰۱۰)، نشان دادند که با افزایش زمان استخراج تا ۲۵ دقیقه میزان استخراج افزایش و پس از آن کاهش یافته است. علت تفاوت زمان حداکثر استخراج تفاوت در توان و دمای بکار رفته در فرایند استخراج می‌باشد (Hong-Yu *et al*., 2010; Wang *et al*.,2010; Spigno *et al*., 2009& Pan *et al*., 2003).

اثرتوان امواج مایکروویو بر میزان استخراج پلی فنول‌های چای سبز

اثر توان امواج مایکروویو بر میزان استخراج پلی‌فنول‌ها و درصد بازداری رادیکال‌های آزاد DPPH در شکل ۷(a,b)، مشاهده می‌گردد. بر اساس نتایج آنالیز واریانس، افزایش توان از ۳۰۰ تا ۶۰۰ اثر معنی داری بر هر دو متغیر داشته است. اما با افزایش توان از ۶۰۰ به ۹۰۰ اثر معنی‌داری مشاهده نشده است. اثر توان امواج مایکروویو به ثابت دی الکتریک حلال بستگی دارد که آب ثابت دی الکتریک بالایی دارد. در واقع با افزایش توان، انرژی امواج به دلیل چرخش دو قطبی و هدایت یونی افزایش و بنابراین میزان تحرک ملکولی و دما افزایش می‌یابد ودر نتیجه استخراج پلی فنول‌ها افزایش می‌یابد اما با افزایش توان از ۶۰۰ به ۹۰۰ تغییری در میزان پلی‌فنول‌ها و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده نمی‌شود زیرا با افزایش توان از این حد دما نیز افزایش یافته و با تجزیه پلی‌فنول‌ها همراه خواهد بود و در نتیجه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نیز کاهش می‌یابد (Nkhili *et al*., 2010; Wang *et al*.,2009).

اثر شدت امواج فراصوت بر میزان استخراج پلی‌فنول‌های چای سبز

میزان پلی‌فنول‌های استخراج شده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بطور معنی‌داری تحت تاثیر شدت امواج می‌باشد. شکل ۸.(a,b) با افزایش شدت صوت از ۴۰ تا ۱۰۰ درصد حباب‌های بیشتری تشکیل و متلاشی می‌شود . فشار و دمای داخل حباب‌ها افزایش یافته وحباب‌ها در مدت زمان کوتاه‌تری متلاشی می‌گردند.

بنابراین موج شوک قوی‌تر[1] وفواره‌های با سرعت بالا[2] تولید شده و نفوذ حلال به نیز زیاد می‌شود. همچنین با افزایش شدت صوت، دما افزایش یافته و سرعت پاره شدن دیواره سلول‌ها را افزایش می‌دهد و در نتیجه خروج محتویات داخل سلولی به حلال (سرعت انتقال جرم)

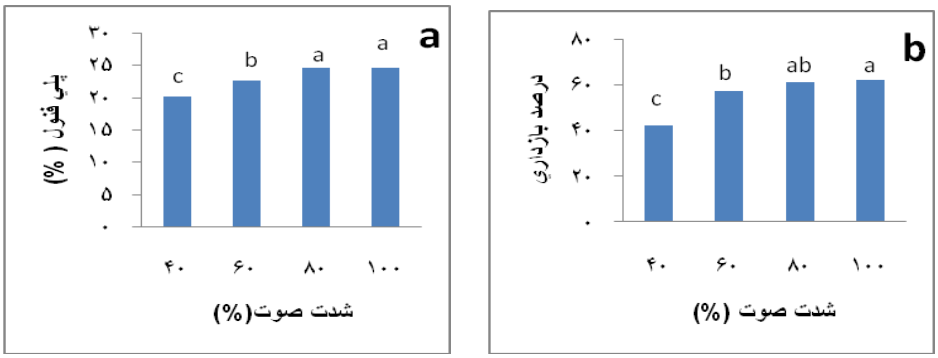
1 - Violent shock wave

2 - High Speed Jet

افزایش یافته، و در نتیجه ظرفیت آنتی اکسیدانی نیز افزایش می‌یابد (Xia *et al*., 2006; Mason *et al*.,1994).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج نشان داد که با افزایش دما و زمان استخراج در هر سه روش HRE، UAE و MAE میزان استخراج پلی فنول‌ها از داخل سلول‌ها و ظرفیت آنتی اکسیدانی، به‌دلیل افزایش سرعت انتشار پلی‌فنول‌ها افزایش می‌یابد و سپس به دلیل اشباع حلال از حل شونده، تجزیه حرارتی کاتچین‌ها و سونیکاسیون غیر موثر (در روش فراصوت) ثابت می‌مانند. شدت امواج فراصوت و توان امواج مایکروویو نیز تا حدی میزان استخراج پلی‌فنول‌ها و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش داده و پس از آن اثر معنی‌داری نداشته‌اند. نتایج حاکی از این است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی ارتباط مستقیم با میزان پلی‌فنول‌های عصاره دارد.



شکل ۸- اثر شدت امواج بر میزان استخراج پلی فنول‌ها(a)و در صد بازداری رادیکال DPPH (b) چای سبز در روش UAE

منابع:

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. تعیین مقدار کل پلی فنول‌های چای سبز و سیاه به روش رنگ سنجی استاندارد ۱- ۸۹۸۶ ایران

Amra, P.U., M, Skrget., and Z, knez. 2006. Extraction of active ingredients from green tea: Extraction efficiency of major catechins and caffeine. J. *Food Chemistry*. 96: 597-605.

Brand-Williams, W. Cavelier, M. E. and Bereset. C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. J. Food Sci. Technol. (London). , 28:25-30.

Charalampos, P., and M, Komitis,. 2006. Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants : Comparison with conventional extraction technics. J. *Food Quality*. 29: 567-582.

Chemat, F., M, Kamran Khan., 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction J. Ultrasonics Sonochemistry. 18 : 813–835.

Harbowy, M and D, Balentin., 1997. Tea chemistry. Critical Rev. J. Food Sci Nut. 16: 415-480.

Hitochi, k and m, Nobuyosh. 2007. Extraction of catechin from green tea using ultrasound. J. Application physic. 46: 4936-4938.

Hong-Yu, L., W, Bin., Y, Chun-Guang., X, Yin-Feng. 2010. Optimization of Microwave-assisted Extraction of Polyphenols from Enteromorpha prolifra by Orthogonal Test. J. Chinese Herbal Medicines. 2(4): 321-325

Jhoo, J.W., C.Y, Lo., S, Li., S ,Sang., T, Heinze and T. C, Ho. 2005. Stability of Black Tea Polyphenol, Theaflavin, and Identification of Theanaphthoquinone as Its Major Radical Reaction Product. J. Agric. Food Chem. 53: 6146□-6150.

Komatsu, Y., S, Suematsu., Y, Hisanobu., H, Saigo ., and R ,Matsuda. 1992. Effect of PH and Temperature on Reaction Kenetics in Green Tea Infusion. J.Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 57(6): 907-910

Komes, D., D, Horzic ., A, Belscak., K, Kovacevic., and I, Vulic. 2010. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. J. Food Research International. 43: 167-176

Lin, D.s., E.H, Lio ., and J.L, Mau. 2008. Effect of different brewing methods on antioxidant properties of steaming green tea. J. Food Science and Technology. 41: 1616-1623.

Mason, T. J and Y, Zhao. 1994. Enhancedextraction of teasolids using ultrasound. J. Ultrasonics. 32(5): 375–377

Manzocco, L., M, Anese ., and M. C. Nicoli. 1998. Antioxidant Properties of Tea Extracts as Affected by Processing. j of Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 31(7): 694-698.

Nkhili, E ., V, Tomao., H, El Hajji., E.S, El Boustani., F, Chematb., and O D,anglesb. 2009. Microwave-assisted Water Extraction of Green Tea Polyphenols. J. Phytochemical Analysis. 20: 408-415.

Nurulain T.Z. 2006. Green tea and its polyphenolic catechins: medical uses in cancer and non cancer applications. J. Life Science.78: 2073-2080.

Pan, X., G, Niu., and H, Liu. 2003. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. J .Chem Eng Processing. 42: 129–133.

Quan, P.T., T.V, Hang., Ha, and T.N, Tuyen. 2006. Microwave-assisted extraction of polyphenols from fresh tea shoot. J. Food Science and Technology Development.9(8) .

Sang, S., M.J, Lee., Z, Hou., C.T, Ho., and C. S, Yang., 2005. Stability of Tea.

Shisuoka, S. 1986. Process for the production of tea catechins, US patent 4.613.672.

References and further reading may be available for this article. To view references and further reading you must purchase this article.

Spigno, G., and D.M , Faveri. 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. J. Food Engineering. 2: 210-217.

Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasoniczlly assisted extraction of bioactive principles from herbs. J. Ultrason. Sonochem. 8: 303-313.

Wang, L. and C. Weller, 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. J. Trends in food Science and Technology.17(6): 300-312.

Wang, R., W, Zhou., and X, Jiang. 2008. Reaction Kinetics of Degradation and Epimerization of Epigallocatechin Gallate (EGCG) in Aqueous System over a Wide Temperature Range. J. Agric. Food Chem. 56: 2694–2701

Wang, L., P, Qin., and Y, Hu., 2010. Study on the microwave-assisted extraction of polyphenols from tea. J. Chem. Eng. China. 4(3): 307–313.

Xia, T., S ,Shi., X, Wan. 2006. Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion . J. of Food Engineering. 74 : 557–560.

Xu, JZ., SY, Yeung., Q, Chang., Y, Huang., and ZY, Chen.2004. Comparison of antioxidant activity and bioavailability of tea epicatechins with their epimers. British Journal of Nutrition. 91(6) : 873-881.

Zbigniew J. Dolatowski, Joanna Stadnik, Dariusz Stasiak. 2007. Application of ultrasound in food technology. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 6(3): 89-99.

Zhu, Q.Z., A, Zhang., D, Tsang., Y, Huang., and Z.Y, Chen. , 1997. Stability of Green Tea Catechins. J. Agric. Food Chem. 45: 4624□-4628.

Ziaedini , A. Jafari, A, Zakeri, A. 2010. Extraction of Antioxidants and Caffeine from Green Tea (Camelia sinensis) Leaves: Kinetics and Modeling . j International Food Science and Technology .16 (6) : 505-510

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 11, No. 4, Oct- Nov 2015, p. 285-295

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۱، شماره ۴، مهر- آبان ۱۳۹۴، ص. ۲۹۵-۲۸۵

Evaluation of factors effecting on extraction of the green tea polyphenols and antioxidant properties

A. Arianfar[1]- F. Shahidi[2*]- R. Kadkhodaee[3]- M. Varidi [4]

Received: 02-08-2012
Accepted: 18-02-2013

Introduction: Tea (*Camellia sinensis*), is the most widely beverage after water across the world. The most important chemical composition in tea is phenolic compounds (catechins) that have antioxidant and anticarcinogenic properties and are benefited for cardiovascular disease. There are two major kinds of tea, black tea and green tea. Green Tea, is originated in China and dates back to several thousand years ago. In the production of green tea, young leaves are rolled and oxidized to decreasing oxidation but in production of black tea, tea leaves are oxidized (fermented) for 90-120 min after rolling and then catechins are converted to complexe compounds (theaflavins and thearubigins). The conventional method for extraction of green tea polyphenols compounds are heating, boiling, cold and heathing refluxe extraction, with long extraction periods and low extraction efficiency. In this study 3 techniques for extraction of polyphenol compounds from Green tea leaves were investigated and compored together.The main objective of this study was to determine the effects of differrent extraction conditions, temperature (40, 60, 80 and 100 °C), different time (15, 30, 45 and 60 min), microwave power (300, 600 and 900 %) and ultrasound amplitude (40, 60, 80 and 100 W) on Green tea polyphenol content and antioxidant activity in three methods including Heat Reflux Extraction(HRE), Microwave Assisted Extraction(MAE) and Ultasound Assisted Extraction(UAE).

Materials and Methods: Dried green tea leaves (supplied from Lahijan (Iran))were grinded for increasing the contact surface area between the solvent and solute. 1 g of green tea was extracted with 100 mL of water at various methods, Heathing Reflux Extraction(HRE), Microwave Assisted Extraction(MAE), by microsynth laboratory system (Milestone-ACT-36-Rev01) at 50 Hz and output 2450 MHz with adjustable power output (100-1000 W), temperature 180 °C and Ultrasound Assisted Extraction (UAE) in double jacket vessel by using a 25 kHz ultrasonic system (model VCX 750, Sonics & Materials, Inc., USA), at a maximum nominal power output of 750W. All measurements were carried out in triplicate. The results were analysed statistically using the minitab 16 Program to determine the average value and standard error. Variance analysis, with a significant level of α= 0.05% was performed to determine the effect of time, temperature, microwave power and ultrasound amplitude on polyphenols content and antioxidant activity. Total phenol were determined spectrophotometerically by Folin-Ciocalteu method at 765 nm (Hewlett- Packard spectrophotometer model 8452A, Rockville). The antioxidant activity evaluated with the DPPH test spectrophotometrically at 517 nm.

Results and Discussion: These results showed that polyphenol content is increased with increasing the time, temperature, ultrasound amplitude and microwave power of extraction. By increasing temperature to 80°C , time to 45 min, ultrasound amplitude from 40 to 80 and microwave power from 300 to 600, polyphenol content and antioxidant activity was increased and after that was constant. These results showed that, H.R.E require long extraction time and have low efficiency. Polyphenol compounds are thermally unstable and maybe degredate in thermal processing. Also, the best method for extraction was MAE, because of higher yield, higher contents of polyphenol and shortend time and this method was very efficient in the extraction of polyphenl compounds. The efficiency of extraction by UAE method is higher than HRE and lower than MAE method.

Conclusion: UAE method compared to HRE method is enhanced the extraction of polyphenol, facilating solvent peneteration and increase the product releasing from intracellular. This method agitated the solvent to material and

1- PhD student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad , Agriculture Fculty and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

2, 4- Professor and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology , Agriculture Fculty, Ferdowsi University of Mashhad.

3- Associate Professor, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST)

(*-Corresponding Author Email: Niloofar1373@yahoo.com)

increased the contact surface between material and solven, and peneteration of solvent in to the green tea leaves. UAE canbe carried out at a lower temperature than HRE and decreased thermal damage.

Keyword: Antioxidant Activity, Green tea, Heat Reflux Extraction(HRE), Microwave Assisted Extraction(MAE), Polyphenol compounds, Ultasound Assisted Extraction(UAE).