

key words

Supercritical extraction

Optimization

Saponin

Response surface

* corresponding author:
sargolzaei@um.ac.ir

Investigation of Optimum Condition of Saponin Extraction by Carbon Dioxide Super Critical Fluid and Solvent

Amin Hedayati Moghaddam¹, Javad Sargolzaei^{2*}, Pardis Shahsavarzadeh Jangi²

1-Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2-Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract

Research subject: Saponin compounds have been considered as anti-cancer, antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory, and antiviral activity agents. In addition, they are also used as foaming agents in some food industries. There are few studies for assessing the extraction of this substance, yet. The main purpose of this study is to assess and compare the extraction yield of Saponin by conventional extracting using solvent and super-critical fluid method.

Research approach: In the extraction with solvent, the effect of three operative parameters including mass of solid material, percentage of ethanol solvent, and time of extraction on process performance were investigated. Yield of extraction and Saponin concentration were considered as indexes for evaluating the process performance. In the super critical fluid extraction, the effects of extraction time, pressure, and temperature were investigated. In this method, carbon dioxide was used as super critical fluid and %80 ethanol was used as co-solvent. In order to design of experiment and process optimization, response surface methodology and central composite design were used.

Main results: In optimum condition of extraction with solvent, the mass of solid material, ethanol solvent percentage, and extraction time were 5.4 g, %77.5, and 7 h, respectively. In this condition, the maximum efficiency of extraction yield of 1.12 mg of Saponin per a gram of dry primary substance was obtained. The results indicated that time and solvent percentage were significant parameters. Further, interaction between two factors of time and solvent percentage were significant. For supercritical fluid extraction, in optimum condition, extraction time, pressure, and temperature were 10 h, 400 bar, and 50 °C, respectively. Extraction yield in this condition was %20 more than the yield of conventional method. It is concluded that the supercritical fluid extraction method has higher performance than conventional method.

بررسی شرایط بهینه استخراج ساپونین به روش استخراج سیال فوق بحرانی دی‌اکسیدکربن با کمک حلال

امین هدایتی مقدم^۱، جواد سرگلزائی^{۲*}، پردیس شهسوارزاده جنگی^۲

۱- گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی مهندسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

فصلنامه علمی - پژوهشی بین رشته‌ای
سال چهارم، شماره ۴، نسخه ۱
زمستان ۱۳۹۹، صفحه ۶۷-۷۶

چکیده

ترکیبات ساپونین به‌عنوان عوامل ضدسرطان، ضدقارچ، ضدالتهابی و ضدویروس شناخته می‌شوند. همچنین، به‌عنوان عامل کفزا در بعضی از صنایع غذایی استفاده می‌شوند. تاکنون مطالعات اندکی پیرامون استخراج این ماده صورت گرفته است. هدف اصلی این تحقیق، بررسی و مقایسه بازده استخراج ساپونین به روش رایج با استفاده از حلال و روش سیال فوق بحرانی است. در روش استخراج با حلال اثر سه متغیر مقدار ماده جامد، درصد حلال اتانول و مدت زمان استخراج بر عملکرد فرایند مورد مطالعه قرار گرفتند. بازده استخراج و غلظت ساپونین به‌عنوان معیارهای سنجش عملکرد فرایند مورد بررسی قرار گرفتند. در روش استخراج با سیال فوق بحرانی اثر متغیرهای عملیاتی مدت زمان استخراج، فشار و دما مورد بررسی قرار گرفتند. در این روش از دی‌اکسیدکربن به‌عنوان سیال فوق بحرانی و از اتانول ۸۰٪ به‌عنوان کمک حلال استفاده شد. برای طراحی آزمایش و بهینه‌سازی فرایند در هر دو روش از سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی استفاده شد. در روش استخراج با حلال در شرایط بهینه، مقدار ماده جامد برابر با ۵/۴ میلی‌گرم، درصد حلال اتانول ۷۷/۵٪ و مدت زمان انجام آزمایش برابر با ۷ ساعت است. در این شرایط بازده استخراج برابر با ۱/۱۲ میلی‌گرم ساپونین به ازای هر گرم ماده جامد خشک است. تحلیل آماری نتایج نشان داد که متغیرهای عملیاتی تأثیرگذار بر عملکرد فرایند، درصد حلال اتانول و مدت زمان استخراج است. همچنین اثر متقابل بین متغیرهای درصد حلال و مدت زمان استخراج دارای اهمیت است. برای استخراج با سیال فوق بحرانی، در شرایط بهینه مدت زمان استخراج، فشار و دما به ترتیب برابر با ۱۰ ساعت، ۴۰۰ بار و ۵۰ درجه سانتی‌گراد است. در این شرایط بازده استخراج ۲۰٪ بیش‌تر از بازده استخراج با حلال است. می‌توان نتیجه گرفت که بازده استخراج با سیال فوق بحرانی به همراه کمک‌حلال بالاتر از استخراج با حلال است.

کلمات کلیدی

استخراج فوق بحرانی

بهینه‌سازی

ساپونین

سطح پاسخ

*مسئول مکاتبات:

sargolzaei@um.ac.ir

۱ مقدمه

در بین ترکیبات فعال زیستی، ساپونین‌ها ترکیبات قطبی زیست‌فعال حاصل از سوخت‌وساز ثانویه با جرم مولکولی بالا هستند. اهمیت بالای این ترکیبات به دلیل خواص دارویی ارزشمند آن‌ها ناشی از مواد فعال دارویی است. این ترکیبات علاوه بر فعالیت‌های زیستی مانند خاصیت ضدباکتری، ضدقارچ، ضدحساسیت و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها دارای خواص فیزیکی شیمیایی مانند امولسیون-کنندگی و کف‌زایی نیز هستند که موجب کاربرد آن‌ها در صنایع غذایی می‌شود. آن‌ها فعالیت سطحی و غیرسطحی بالایی دارند و به‌عنوان عامل امولسیون‌کننده عمل می‌کنند و در آب کف پایدار تشکیل می‌دهند. جهت افزایش پایداری سامانه امولسیونی، باید کشش سطحی که مابین دو مایع غیرقابل انحلال وجود دارد را کاهش داد. در صنایع غذایی از امولسیون‌کننده‌ها به‌عنوان عوامل فعال سطحی استفاده می‌شوند که می‌توان به امولسیون‌کننده‌های سنتزی سدیم‌دودسیل‌سولفات، توئین ۸۰ و بنزالکونیوم کلرید اشاره کرد [۱-۶]. نتایج کار کاراژیان و کیهانی [۳] بر روی عصاره ساپونینی چوبک نشان داد که عصاره چوبک در مقایسه با هر سه سطح فعال سنتزی سدیم‌دودسیل‌سولفات، توئین ۸۰ و بنزالکونیوم کلرید توانایی امولسیون‌کنندگی کم‌تری دارد؛ اما در ارتباط با ویژگی کف‌زایی، این عصاره نسبت به سدیم‌دودسیل‌سولفات توانایی تقریباً یکسان، نسبت به بنزالکونیوم کلرید (Benzalkonium chloride) توانایی کم‌تر و نسبت به توئین ۸۰ توانایی بیش‌تری دارد. آن‌ها همچنین در پژوهشی دیگر اثر خاصیت کف‌زایی این عصاره را برای جایگزین کردن سفیده تخم‌مرغ در کیک بررسی کردند [۷]. با توجه به خواص متنوع ساپونین‌ها تحقیقات بسیاری در جهت استخراج، شناسایی و کاربرد آن‌ها از منابع گیاهی مختلف انجام شده است. درخت شاه‌توت گونه‌ای درخت گل‌دار متعلق به خانواده توت سانان (Moraceae) و بومی آسیای جنوب غربی است [۸]. در کره جنوبی، پودر برگ شاه‌توت یکی از مواد تشکیل‌دهنده بستنی است، به آن طعم شیرین و دلپذیری می‌دهد در حالی که کاهش سطح قند خون و در نتیجه کاهش قند بالای بستنی را در پی دارد. برگ‌های خشک‌شده آن به‌عنوان نوشیدنی چای سبز و مکمل‌های غذایی مصرف می‌شود. محققان در هند برگ شاه‌توت گونه سفید را که به روش خشک کردن انجمادی خشک شده با آرد مخلوط کردند و از آن برای تهیه نان سنتی هندی (Paratha) استفاده کردند. این نان تخت هندی در سراسر شبه قاره هند و دیگر کشورهای آسیایی محبوب است. برگ‌های شاه‌توت گونه سفید باعث افزایش محتوای پروتئین کل محصول شده و دوام آن را افزایش می‌دهد [۸]. بنابر مطالعات آیولا

و همکاران بررسی فیتوشیمیایی برگ شاه‌توت سفید (*Morus alba*) نشان‌دهنده حضور ساپونین، آلکالوئیدها، تانن‌ها، اگزالات و فلاونوئیدها است [۸]. چهارده نوع ترکیب فنولی در برگ شاه‌توت طبق تحقیقات سانچز سالکدو و همکاران شناسایی شده‌است که چهار مورد ترکیبات عمده فنولیک شامل فنولیک‌اسید کافئولیکینیک‌های نئو- کلروژنیک‌اسید، کلروژنیک‌اسید، کریپتو- کلروژنیک‌اسید و ایزومر کلروژنیک‌اسید است [۹]. ده مورد باقی‌مانده ترکیبات فلاونول‌ها مانند مشتقات کوئرستین هستند. تالینی و همکاران نیز در تحقیقات خود دو ترکیب اصلی فلاونوئیدی مانند کوئرستین و کامفرول را به‌عنوان ترکیبات فنولی در برگ شاه‌توت بررسی کردند [۱۰]. در برگ شاه‌توت طبق مشخصه‌یابی انجام شده توسط رادوجکویک و همکاران، کاروتنوئید شناسایی شده‌است و بخش عمده محتوی کاراتنوئیدی (حدود ۶۴٪) آن را بتا-کاروتن و لوتئین به خود اختصاص داده‌اند [۱۱]. نتیجه مشابه از مطالعه ایزابل نیز به‌دست آمده است؛ با این تفاوت که لوتئین درصد بیش‌تری را نسبت به بتا-کاروتن به خود اختصاص داده است [۱۲]. طبق تحقیقات تبتی و همکاران کل محتوی کاروتنوئیدی برگ شاه‌توت ۷۰/۸۶ میلی‌گرم در هر صد گرم گزارش شده‌است [۱۳].

بر اساس‌های رادوجکویک و همکاران اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع نیز در برگ شاه‌توت یافت شده است [۱۱]. تاکنون استخراج ساپونین از برگ شاه‌توت مطالعه نشده است. به‌طور کلی روش‌های استخراج متنوعی برای استخراج ترکیبات موثر مواد گیاهی وجود دارد که هدف همه آن‌ها استخراج ترکیبات زیست‌فعال هدف از نمونه‌های گیاهی، افزایش انتخاب‌پذیری روش‌های تحلیلی، افزایش حساسیت اندازه‌گیری با افزایش غلظت ترکیبات هدف، تبدیل ترکیبات زیست‌فعال به حالت پایدارتر برای تعیین جداسازی آن‌ها و ارائه روشی قوی و قابل تجدیدپذیر مستقل از تغییرات در ماتریس نمونه است [۱۴ و ۱۵]. در این پژوهش روش استخراج سیال فوق بحرانی انتخاب شده است.

هدف این پژوهش استخراج ساپونین‌ها به‌عنوان ترکیب امولسیون‌کننده و کف‌زای طبیعی از برگ شاه‌توت است. بدین منظور در این مطالعه استخراج ساپونین‌ها از برگ شاه‌توت به روش سیال فوق بحرانی مورد بررسی قرار گرفت و بهینه‌سازی شرایط عملیاتی برای رسیدن به حداکثر بازده و غلظت ساپونین انجام شد. در پایان، این روش با روش سوکسله در حالت بهینه مورد مقایسه قرار گرفت.

۲ تجربی

۱-۲ مواد و دستگاهها

نمونه برگ شاه‌توت جمع‌آوری شده در اواخر اردیبهشت ماه از باغ دانشگاه فردوسی مشهد در آون فن‌دار (پارسیان طب ساخت ایران) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد. نمونه پودر شده توسط خردکن (AE-100) ساخت کشور آلمان (خرد و در اندازه ذرات بین ۴۲۵-۲۵۰ میکرومتر غربالگری شد. در نهایت چربی‌زدایی با حلال هگزان (مجللی تولید ایران) برای نمونه‌های استخراج با حلال انجام شد.

براساس طراحی آزمایش روش CCD تعداد کل آزمایش‌ها ۲۰ است که ۴ آزمایش در نقاط فاکتوریل، ۶ آزمایش در نقاط مرکزی و ۴ آزمایش در نقاط محوری انجام شد. با توجه به محدودیت‌های عملیاتی و مطالعات گذشته در طراحی این آزمایش مقدار آلفا برای پیدا کردن نقاط محوری ۲ در نظر گرفته شد. سطوح عملیاتی هر دو روش به ترتیب در جدول ۱ و ۲ آمده است. همچنین برای شناسایی کمی ساپونین در عصاره‌های استخراجی از منحنی استاندارد ساپونین استفاده شد.

۲-۱-۱-۲ استخراج با حلال

ابتدا با توجه جدول آزمایش‌های طراحی شده حلال اتانول با درصد مشخص تهیه و نمونه چربی‌زدایی شده با اندازه ذرات ۴۲۵-۲۵۰ میکرومتر توزین شد. پس از سوار کردن دستگاه سوکسله به محض چکیدن اولین قطره حلال بر روی نمونه زمان استخراج در نظر گرفته شد و پس از پایان زمان استخراج، عصاره سرد از کاغذ صافی (واتمن ۴۲ مرک آلمان) عبور داده شد و عصاره به دست آمده در دستگاه روتاری (هیدولف کشور آلمان) تغلیظ و باقی مانده حلال در آون فن‌دار تبخیر شد. عصاره خشک در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و عصاره آبی در قیف دکانتور با ۲/۵ میلی‌لیتر بوتانول اشباع شده با آب مقطر به ازای هر ۶ گرم بافت اولیه نمونه بعد از ۲۰ دقیقه به دو فاز آبی و آلی

۲-۲ روش‌ها

۲-۲-۱ روش استخراج و طراحی آماری آزمایش‌ها

در روش استخراج با حلال، روش سوکسله برای استخراج ساپونین انتخاب شد و همان‌گونه که پیش از این به آن اشاره شد، اثر متغیرهای مستقل مقدار ماده خشک، درصد حلال اتانول و زمان بر غلظت و بازده استخراج ساپونین بررسی شد. روش سیال فوق-بحرانی نیز به عنوان روش نوین انتخاب شد و اثر متغیرهای مستقل زمان، فشار و دما بر غلظت و بازده استخراج ساپونین بررسی شد. طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ (RSM) و طرح مرکب مرکزی (CCD) انجام شد.

جدول ۱ متغیرهای عملیاتی فرایند استخراج با حلال
Table 1 operative parameters of extraction process with solvent

variables	symbols	levels				
		α	+1	0	-1	α^-
Amount of solid material (g)	A	7	6	5	4	3
Ethanol solvent percent (%volume/volume)	B	100	90	80	70	60
time (h)	C	10	8	6	4	2

جدول ۲ متغیرهای عملیاتی فرایند استخراج فوق‌بحرانی
Table 2 Operative parameters of supercritical extraction process

variables	symbols	levels				
		α	+1	0	-1	α^-
time (h)	A	10	8	6	4	2
pressure (bar)	B	450	400	350	300	250
temperature (°C)	C	60	55	50	45	40

و با جاگذاری مقدار جذب نمونه‌های مجهول در معادله ۱ غلظت ساپونین محاسبه می‌شود.

$$Y = (451.7X + 28.653) \times 3 \quad (1)$$

۲-۲-۲-۲ نحوه محاسبه بازده

برای دستیابی به بازده وزنی ساپونین برحسب میلی‌گرم، ساپونین استخراجی به گرم ماده خشک اولیه از رابطه ۲ استفاده شد.

$$\text{میلی گرم ساپونین استخراجی} = \frac{\text{میلی گرم ماده خشک اولیه}}{\text{بازده}} \quad (2)$$

۲-۳-۲ طرح آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها

به‌طور متداول جهت بررسی صحت مدل از ضریب تبیین (R^2) و آزمون عدم برازش (Lack of fit) استفاده می‌شود. معنی‌دار نبودن آزمون عدم برازش بدین معنی است که مدل توانسته است به خوبی بر داده‌های مورد بررسی برازش شود. برای این که مدل توانایی خوبی برای برازش اطلاعات داشته باشد لازم است که R^2_{adjusted} و $R^2_{\text{predicted}}$ دارای بالاترین مقدار باشند. برای مدلی با برازش خوب، مقدار R^2 بایستی حداقل ۰/۸ باشد [۱۷].

مدل‌های ریاضی برای پاسخ با استفاده از روش رگرسیون چندگانه به‌دست می‌آیند و تابع معادله‌ای چندجمله‌ای هستند. در معادله رگرسیونی شماره ۳، b_0 عرض‌ازمبدا، b_{1i} ، b_{2i} و b_{3i} ضرایب خطی، درجه دوم و برهم‌کنش متغیرهای مستقل کدشده X_1 و X_2 هستند [۱۷].

$$y = b_0 + \sum b_{1i}x_i + \sum b_{2i}x_i^2 + \sum b_{3i}x_ix_j \quad (3)$$

۲-۳-۱-۲ گزینش مدل مناسب روش استخراج با حلال

مدل کدشده سطح پاسخ اصلاح شده درجه دوم برای پیش‌بینی تغییرات غلظت و بازده استخراج بر اساس متغیرهای بررسی شده در استخراج ساپونین به روش سوکسله به‌ترتیب در معادله ۴ با ضریب تبیین ۰/۹۲۲۶ و در معادله ۵ با ضریب تبیین ۰/۹۴۴۲ برازش شد.

$$-29.74^2 \times B^2 - 25.61 \times C^2 y = 206.25 \times A - 12.88 \times B + 30.62 \times C - 23.74 \times A \quad (4)$$

$$y = 1.10 - 0.026 \times A + 0.054 \times B + 0.13 \times C - 0.20 \times (B \times C) - 0.13 \times A^2 - 0.095 \times B^2 - 0.16 \times C^2 \quad (5)$$

جداسازی شد. این عملیات دو مرتبه دیگر بر روی فاز آبی باقی مانده تکرار شد و لایه بالایی فاز آلی حاصل از سه مرحله به‌عنوان عصاره بوتانولی ساپونین خالص جمع‌آوری شد.

۲-۱-۲-۲ استخراج سیال فوق‌بحرانی

در استخراج سیال فوق‌بحرانی ابتدا ۵ گرم نمونه با ترازی رقمی (ساخت شرکت کرنل کشور آلمان) وزن و درون کاغذ صافی پیچیده و به ۵ میلی‌لیتر کمک‌حلال اتانول ۸۰٪ برای افزایش قطبیت دی‌اکسیدکربن فوق‌بحرانی آغشته شد و درون مخزن استخراج قرار گرفت. از حلال دی‌اکسیدکربن درون استوانه ۴۵ کیلوگرمی (شرکت خوراکیان، ایران) به‌عنوان سیال فوق‌بحرانی استفاده شد. پس از تنظیم دما و فشار عملیاتی طبق طراحی آزمایش‌ها، زمان استخراج در نظر گرفته شد و پس از پایان زمان فرایند استخراج، شیر خروجی باز شد و ساپونین استخراجی در دمای ثابت با کاهش فشار از دی‌اکسیدکربن جدا و در مقداری اتانول ۸۰٪ جمع‌آوری شد.

۲-۲-۲ اندازه‌گیری میزان ساپونین

به‌منظور شناسایی کمی ساپونین از روش طیف‌سنجی نوری استفاده شد و براین اساس نیاز به رسم منحنی استاندارد ساپونین برای محاسبه غلظت ساپونین براساس جذب خوانده شده نمونه‌های مجهول در دستگاه طیف‌سنج نوری دو پرتویی فرابنفش-مرئی (مدل BC47358 شرکت Biochrom ساخت کشور انگلیس) است.

۲-۲-۱-۲ نحوه رسم منحنی استاندارد

برای رسم منحنی استاندارد ساپونین از محلول مادر با ساپونین (مرک آلمان) رقت‌های ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از آن در لوله آزمایش ریخته شد و تا تبخیر کامل حلال درون آن با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از سرد شدن لوله‌ها به هریک از آن‌ها ۵ میلی‌لیتر از معرف وانیلین ۰/۷٪ در اسیدسولفوریک ۶۵٪ اضافه شد و نمونه‌ها پس از ورتکس، به‌مدت یک ساعت در حمام آب گرم با دمای $(1 \pm 60^\circ \text{C})$ قرار گرفت و پس از آن برای توقف واکنش به مدت ده دقیقه در حمام آب یخ گذاشته شد. جذب محلول‌های استاندارد در محدوده صفر تا یک در طول موج ۴۷۳ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۶]. با رسم نمودار غلظت برحسب جذب منحنی استاندارد ساپونین به‌دست آمد

نمودارهای سه بعدی سطح پاسخ با دو متغیر مستقل در مقابل پاسخ با ثابت در نظر گرفتن متغیر سوم، رسم شدند. مقادیر بهینه متغیرهای مستقل را می توان با استفاده از همین نمودارها استنباط کرد. مقادیر منفی پیش بینی شده پاسخ های غلظت و بازده در نمودارها به معنای شرایط عملیاتی نامناسب است که توانایی استخراج ساپونین استخراجی ندارد.

۱-۳ بهینه سازی استخراج ساپونین از برگ شاه توت به روش حلال با استفاده از روش سطح پاسخ

طبق نتایج آزمایش (جدول ۳) و جدول تحلیل واریانس، متغیرهای مقدار ماده جامد و زمان در مدل پیش بینی غلظت، معنادار شدند و متغیرهای درصد حلال، زمان، اثر متقابل درصد حلال و زمان در مدل پیش بینی بازده استخراج ساپونین معنادار بودند. در این بخش تأثیر متغیرهای مستقل بر غلظت ساپونین و بازده استخراج

۲-۳-۲ گزینش مدل مناسب روش استخراج با حلال

مدل کد شده سطح پاسخ اصلاح شده درجه دوم برای پیش بینی تغییرات غلظت و بازده استخراج بر اساس متغیرهای بررسی شده در استخراج ساپونین به روش سوکسله به ترتیب در معادله ۶ با ضریب تبیین ۰/۹۲۲۶ و در معادله ۷ با ضریب تبیین ۰/۹۹۵۸ برآزش شد.

(۶)

$$y=106.87+18.02 \times A+8.21 \times B+0.97 \times C+3.50 \times AB-1.95 \times BC-6.27 \times B^2-7.62 \times C^2$$

(۷)

$$y=0.74-0.25 \times A+0.074 \times B+0.000555 \times C-0.065 \times (A \times C)+0.053 \times (B \times C)+0.018 \times A^2-0.097 \times C^2$$

۳ نتایج و بحث

برای شهودی کردن رابطه متغیرهای مستقل و پاسخ، همچنین اثر متقابل هر متغیر مستقلی بر سامانه،

جدول ۳ چینش طراحی آزمایش ها در استخراج ساپونین توسط حلال
Table 3 Experimental design layout of Saponin extraction by solvent

row	independent variables			responses	
	solid amount (g)	ethanol solvent (%)	time (h)	saponin concentration* (mg/L)	efficiency (%)
1	7	80	6	145	0.59
2	4	90	8	120	0.74
3	4	90	4	65	0.84
4	5	80	6	200	1.1
5	3	80	6	73	0.61
6	6	90	8	186	0.59
7	6	90	4	110	0.75
8	5	80	6	181	1.02
9	5	80	6	195	1.08
10	5	60	6	117	0.6
11	5	80	10	161	0.72
12	4	70	4	88	0.35
13	5	80	6	230	1.27
14	6	70	8	191	0.95
15	6	70	4	131	0.3
16	4	70	8	149	1.03
17	5	80	6	240	1.34
18	5	80	2	42	0.25
19	5	80	6	188	1.04
20	5	100	6	53	0.89

* concentration in 10 microliters of sample

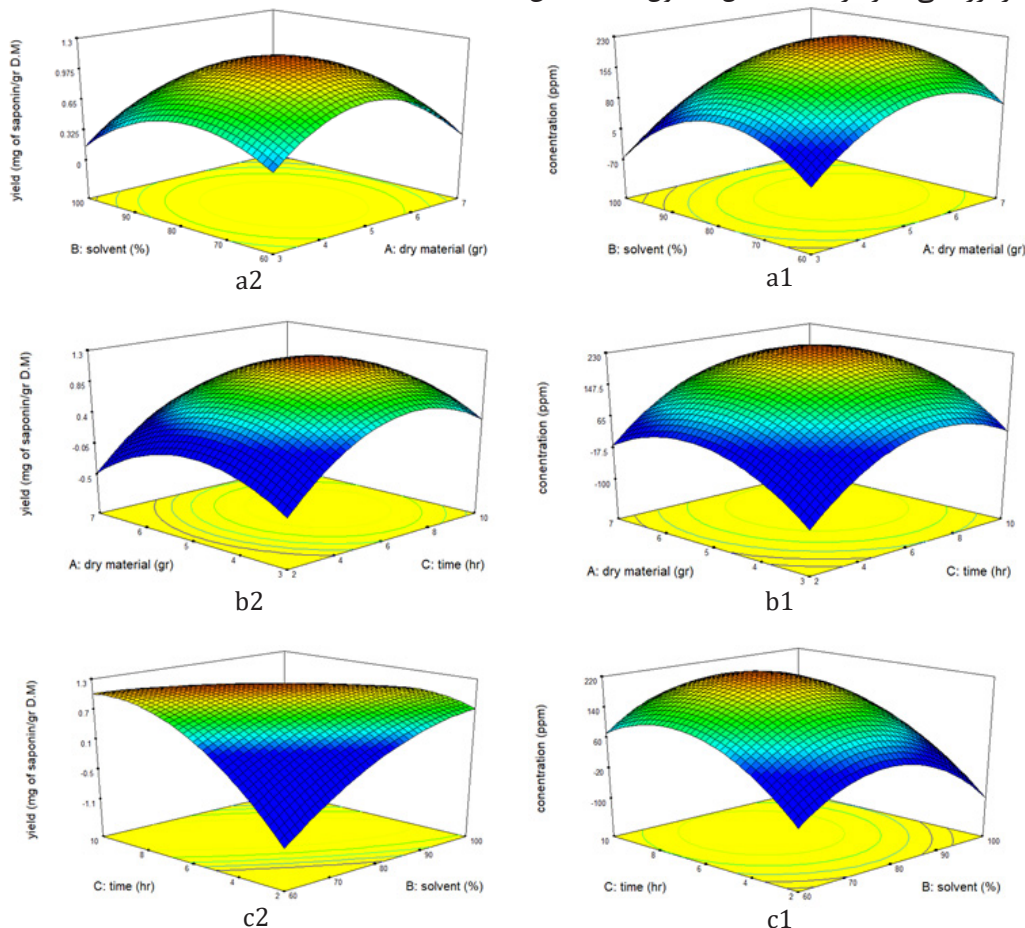
حلال از اتانول ۱۰۰٪ تا حدود اتانول ۸۰٪ نمودارهای سطح پاسخ بیانگر روند افزایشی و پس از آن بیانگر روند کاهشی در غلظت و بازده استخراج ساپونین هستند. کاهش غلظت و بازده استخراج ساپونین به این دلیل است که در روش سوکسله، فاز آلی به عنوان عصاره خالص ساپونین از فاز آبی جدا و افزایش قطبیت نسبی حلال از ۸۰٪ تا ۶۰٪ باعث انتقال بخش اعظم ساپونین‌ها به فاز آبی می‌شود.

در نمودارهای b1 و b2 اثر مقدار ماده جامد و زمان بر غلظت و بازده را به روش سوکسله نشان می‌دهد که افزایش زمان ابتدا اثر افزایشی و سپس کاهشی بر غلظت و بازده استخراج ساپونین دارد. اثر افزایشی زمان، می‌تواند به دلیل سازوکار استخراج جامد-مایع و دو عامل نفوذ و شیو (Gradient) غلظت در انتقال باشد. جذب و دفع، فرایندهای زمان‌بر هستند؛ بنابراین براساس اختلاف پتانسیل شیمیایی (غلظت) با گذشت

آن از برگ شاه‌توت در روش سوکسله به روش سطح در شکل‌های ۱-۵ نشان داده شده است.

در شکل ۱ در نمودارهای a1 و a2 و نمودارهای b1 و b2 روند مشابهی در اثر تغییرات متغیرهای مستقل بر پاسخ‌های غلظت و بازده استخراج ساپونین مشاهده می‌شود. در نمودارهای a1 و a2 روند افزایش پاسخ‌ها با افزایش مقدار ماده جامد به دلیل افزایش ماتریس نمونه در دسترس حلال برای استخراج ساپونین است و روند کاهشی پاسخ‌ها به ازای مقادیر بیش‌تر ماده جامد پاسخ به این دلیل است که با توجه به ثابت بودن مقدار حلال در روش سوکسله، میزان حلال برای استخراج آنالیت از ماده جامد مصرفی کافی نبوده و منجر به کاهش غلظت و بازده ساپونین استخراجی شده است.

درصد حلال، معیاری از قطبیت نسبی حلال است بنابراین در بررسی اثر درصد حلال اتانول با کاهش



شکل ۱ اثر متغیرهای عملیاتی بر غلظت ساپونین و بازده استخراج در روش استفاده از حلال

Fig-1 Effects of operative parameters on Saponin concentration and extraction yield in extraction by solvent

زمان حلال فرصت کافی برای نفوذ در نمونه دارد و پس از حل کردن ماده هدف در خود فرصت برگشت به سطح ماتریس نمونه (دفع) را پیدا می‌کند؛ بنابراین افزایش زمان باعث افزایش غلظت ماده هدف در عصاره

درصد اتانول انتظار می‌رود با توجه به قطبیت بودن ساپونین‌ها، تنها روند افزایشی غلظت و بازده ساپونین مشاهده شود؛ با این حال با افزایش قطبیت نسبی

نتایج، این گونه تحلیل می‌شود که حداکثر زمان رسیدن به حالتی که دیگر زمان اثر زیادی بر افزایش بازده ندارد، بستگی به قدرت حلال دارد و این گونه اثر متقابل بین زمان و درصد حلال قابل تشخیص است.

۲-۳ بهینه‌سازی استخراج ساپونین از برگ شاه‌توت به روش سیال فوق‌بحرانی با استفاده از روش سطح پاسخ

طبق نتایج آزمایش‌ها (جدول ۴) و بررسی آماری داده‌ها، متغیرهای زمان، فشار، اثر متقابل زمان و فشار و اثر متقابل فشار و دما در مدل پیش‌بینی غلظت معنادار شدند و متغیرهای زمان، فشار، اثر متقابل فشار و دما و اثر متقابل فشار و دما در مدل پیش‌بینی بازده استخراج ساپونین معنادار بودند. در این بخش تأثیر متغیرهای مستقل بر غلظت ساپونین و بازده استخراج آن از برگ شاه‌توت در روش استخراج دی‌اکسیدکربن فوق‌بحرانی با اتانول ۸۰٪ به روش سطح پاسخ در شکل‌های ۲ نشان داده شده است.

استخراجی می‌شود. از طرفی در روش سوکسله با سرریز کردن حلال درون بالن، نمونه در معرض حلال تازه قرار می‌گیرد و مانع از تجمع غلظت و کاهش شیو غلظت می‌شود؛ در نتیجه مانع کاهش انتقال جرم و به تبع آن کاهش غلظت و بازده استخراج می‌شود. پس از اعمال حداکثر قدرت حلالیت حلال برای استخراج ماده هدف با گذشت زمان عصاره استخراجی بدون افزایش در غلظت در معرض دمای جوش محلول است و این امر منجر به از بین رفتن بخشی از ترکیبات در اثر تجزیه حرارتی می‌شود. کاهش غلظت با افزایش زمان پس از نقطه عطف دارای شیب کمی است.

در نمودارهای سطح پاسخ نام برده و همچنین نمودار C۱ پیچ‌خوردگی در نمودار سطح پاسخ مشاهده نمی‌شود اما این پیچ‌خوردگی در شکل پ-۲ برای تأثیر درصد حلال و زمان بر بازده استخراج ساپونین دیده می‌شود که نشانگر اثر متقابل بین دو متغیر مستقل درصد حلال و زمان است.

با افزایش هم‌زمان دو فاکتور حلال و زمان بازده تا حدود نقاط مرکزی، افزایش و پس از آن کاهش دارد.

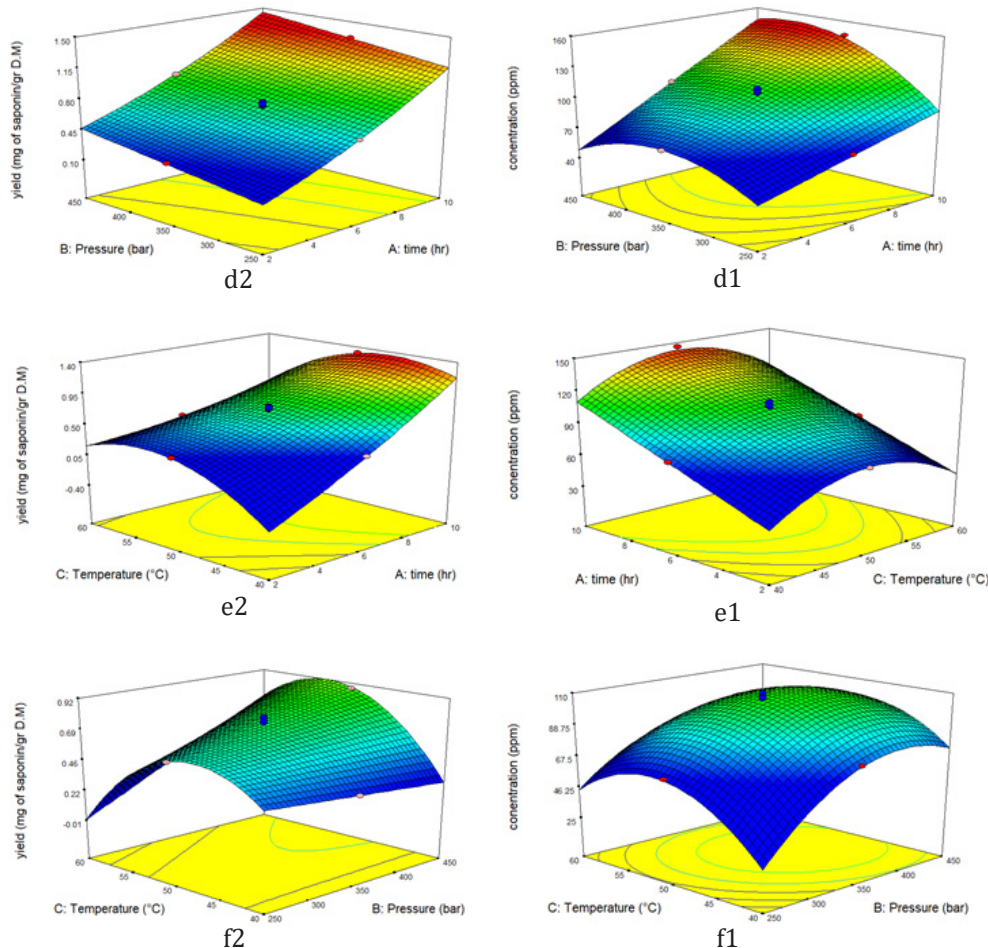
جدول ۴ چینه طراحی آزمایشات در استخراج ساپونین به روش فوق‌بحرانی
Table 4 Experimental design layout of Saponin extraction by super critical method

row	independent variables			responses	
	time	pressure	temperature	concentration	efficiency
	(h)	(bar)	(°C)	(ppm)	(mg/g D.M)
1	2	350	50	70.32	0.33
2	4	400	55	80	0.60
3	8	300	55	101.3	0.71
4	6	350	50	110	0.77
5	4	300	55	73	0.34
6	8	400	55	120.5	0.96
7	6	350	40	75	0.35
8	4	400	45	81	0.38
9	8	300	45	94.2	0.96
10	10	350	50	146	1.31
11	6	350	50	105.7	0.74
12	6	250	50	66.3	0.59
13	6	350	50	104	0.73
14	8	400	45	123	0.98
15	4	300	45	68	0.32
16	6	350	50	106.9	0.75
17	6	350	50	108.3	0.78
18	6	350	60	78.5	0.37
19	6	450	50	98	0.88
20	6	350	50	105.2	0.74

به دلیل افزایش چگالی سیال مشاهده شده است. این تفاوت رفتار با تغییر زمان و فشار به اترمتقابل بین این دو پارامتر برمی گردد. نتایج مشابهی برای اثر زمان و فشار در تحقیق سان و همکاران [۱۸] و برای اثر فشار در تحقیق گوینچ و همکاران [۱۹] به دست آمده است. به دلیل نزدیک بودن بازه‌های دمایی به منظور رعایت محدوده دمایی ۴۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد برای حفظ خاصیت امولسیون‌کنندگی ساپونین‌ها و همچنین عدم کنترل دمایی مناسب دستگاه، متغیر دما برای غلظت و بازده در روش سیال فوق بحرانی طبق نتایج تحلیل واریانس معنی‌دار نشده است؛ با این وجود در نمودارهای سطح پاسخ e1 و e2 که مربوط به غلظت ساپونین و بازده استخراج آن می‌شوند روند تغییرات پاسخ‌ها با افزایش دما مشابه نتایج سایر پژوهش‌ها است [۱۸]. افزایش دما در فشار ثابت، کاهش چگالی سیال فوق بحرانی و افزایش فشار بخار جز حل شونده را در پی دارد که در فشارهای بالا اثر افزایش فشار بخار جز حل شونده بر کاهش چگالی سیال غالب است و

اثر زمان و فشار در نمودارهای d1 و d2 به ترتیب برای غلظت و بازده استخراج ساپونین بررسی شده است که اثر زمان برای هر دو پاسخ، روند افزایشی را در پی داشته است در واقع سیال فوق بحرانی زمان بیشتری دارد تا ماده هدف را از ماتریس نمونه استخراج کند. در سطوح بالای فشار شیب افزایش غلظت نسبت به فشار پایین بیشتر است که به دلیل اثر فشار بر اساس افزایش چگالی سیال فوق بحرانی و همچنین اثر متقابل بین فشار و زمان است.

اثر فشار بر غلظت ساپونین در این روش در زمان بین ۲ تا ۴ ساعت ابتدا روند افزایشی و سپس کاهش‌ی پاسخ را نشان می‌دهد که روند افزایشی به دلیل افزایش چگالی سیال فوق بحرانی است که موجب افزایش حلالیت می‌شود. از طرفی افزایش فشار، افزایش ویسکوزیته با اثر منفی بر حلالیت را به دنبال دارد. روند کاهش غلظت ساپونین نشان‌دهنده غالب شدن افزایش گرانی بر افزایش چگالی سیال است. اما پس از زمان ۴ ساعت با افزایش فشار فقط افزایش غلظت



شکل ۲ اثر متغیرهای عملیاتی بر غلظت ساپونین و بازده استخراج در روش فوق بحرانی

Fig-1 Effects of operative parameters on Saponin concentration and extraction yield in extraction by super critical method

غلظت و بازده استخراج ساپونین به ترتیب ۴۲۰ میلی گرم بر لیتر و ۱/۱۲ میلی گرم ساپونین استخراجی بر گرم ماده خشک اولیه به دست آمد.

۳-۴ تعیین شرایط بهینه روش سیال فوق بحرانی

مشابه روش حلال شرایط بهینه استخراج سیال فوق بحرانی تعیین شد. تحت شرایط زمان ۱۰ ساعت، فشار ۴۰۰ بار و دمای ۵۰ درجه سانتی گراد حداکثر غلظت و بازده استخراج ساپونین به ترتیب ۱۴۷ میلی گرم بر لیتر و ۱/۳۴ میلی گرم ساپونین استخراجی بر گرم ماده خشک اولیه به دست آمد.

۴ نتیجه گیری

استخراج ساپونین از برگ شاتوت با استفاده از دو روش استخراج با حلال و استخراج سیال فوق بحرانی مورد بررسی قرار گرفت. در استخراج با حلال در شرایط بهینه، بیشینه غلظت و بازده استخراج ساپونین به ترتیب ۴۲۰ میلی گرم بر لیتر و ۱/۱۲ میلی گرم ساپونین استخراجی بر گرم ماده خشک اولیه به دست آمد. برای استخراج با سیال فوق بحرانی، بیشینه غلظت و بازده استخراج ساپونین به ترتیب ۱۴۷ میلی گرم بر لیتر و ۱/۳۴ میلی گرم ساپونین استخراجی بر گرم ماده خشک اولیه به دست آمد.

منجر به افزایش حلالیت و در نتیجه افزایش غلظت و بازده می شود. بعد از دمای حدود ۵۰ درجه سانتی گراد کاهش غلظت و بازده، طبق مطالعات به دلیل جداسازی ترکیبات فعال در دماهای بالاتر است [۲]. پیچ خوردگی نمودار سطح پاسخ بازده (e۲) بیانگر اثر متقابل زمان و دما بر بازده استخراج ساپونین است که با نتایج تحلیل واریانس مطابقت دارد.

پیچ خوردگی نمودار سطح پاسخ غلظت و بازده (f۱) و ساپونین براساس تغییرات دما و فشار بیانگر اثر متقابل این دو پارامتر عملیاتی است. که این اثر در تحلیل واریانس نیز معنی دار شده است. با توجه به نتایج سایر مطالعات در صورت مهم شدن متغیر دما انتظار می رود پیچ خوردگی مدل بیش تر باشد یعنی اثر متقابل بیش تری از دما و فشار انتظار می رود. زیرا با افزایش هم زمان دما و فشار، میزان برهم کنش حلال و فشار محلول افزایش می یابد. بدین ترتیب مشخص شده است که تأثیر دما و فشار بر حلالیت امری پیچیده است [۲۰].

۳-۳ تعیین شرایط بهینه روش حلال

شرایط بهینه روش استخراج حلال برای غلظت و بازده استخراج ساپونین از برگ شاه توت براساس بهینه سازی عددی با نرم افزار طرح آزمایش بین سطوح α و $-\alpha$ تمامی متغیرهای مستقل برای دستیابی به حداکثر پاسخ انجام شد. تحت شرایط بهینه مقدار ماده جامد ۵/۴ گرم، درصد حلال ۷۷/۵٪ و زمان ۷ ساعت حداکثر

مراجع

- [1] Francis G., Kerem Z., Makkar H. P. S., and Becker K., The Biological Action of Saponins in Animal Systems: A Review, *British Journal of Nutrition*, 88(6), 587, 2002.
- [2] Bitencourt R. G., et al., Sequential Extraction of Bioactive Compounds from *Melia Azedarach L.* in Fixed Bed Extractor Using CO₂, Ethanol and Water, *Journal of Supercritical Fluids*, 95, 355–363, 2014.
- [3] Keyhani V., Karazhian H., Initial Investigation of Foaming Properties of Choubak, 20th National Conference on Food Science, 1390.
- [4] Hasanzadeh R., Karazhian H., Investigation The Emulsifier Effect of Choubak on Saponin, 20th National Conference on Food Science, 1390.
- [5] Ebrahimpour F., Eidizadeh K., Habibi H., *Medicinal Plants*, Payam Nour Publication, Tehran, 1390.
- [6] Keyhani V., Mortazavi S. A., Karimi M., Karazhian H., Saponins and Their Application in Food Processing, 20th National Conference on Food Science, 1390.
- [7] Karazhian H., Keyhani V., The effect of Chubak extract on sponge cake as an egg white substitute, *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 11(1), 63–76, 2015.
- [8] Grajek K., Wawro A., and Kokocha D., Bactivity of *Morus Albal.* Extracts – an Overview, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(8), 3110–3122, 2015.
- [9] Sánchez-Salcedo E. M., Mena P., García-Viguera C., Hernández F., and Martínez J. J., (Poly)Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of White (*Morus alba*) and Black (*Morus nigra*) Mulberry Leaves: Their Potential for New Products Rich in Phytochemicals, *Journal of Functional Foods*, 18, 1039–1046, 2015.
- [10] Tallini L. R., et al., Analysis of Flavonoids in *Rubus Erythrocladus* and *Morus Nigra* Leaves Extracts by Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 25(3), 219–227, 2015.
- [11] Radojkovic M., Zekovic Z., Maskovic P., Vidovic S., and Mandic A., Misan A., and Durovic S., Biological Activities and Chemical Composition of *Morus* Leaves Extracts Obtained by Maceration and Supercritical Fluid Extraction, *Journal of Supercritical Fluids*, 41, 50–58, 2016.
- [12] Isabelle M., Bee L. L., Choon N. O., Liu X., and Huang D., Peroxyl Radical Scavenging Capacity, Polyphenolics, and Lipophilic Antioxidant Profiles of Mulberry Fruits Cultivated in Southern China, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(20), 9410–9416, 2008.
- [13] Thabti I., Marzougui N., Elfalleh W., and Ferchichi A., Antioxidant Composition and Antioxidant Activity of White (*Morus alba L.*), Black (*Morus nigra L.*) and Red (*Morus rubra L.*) Mulberry Leaves, *Acta Botanica Gallica*, 158(2), 205–214, 2011.
- [14] Khajehnouri M., Haghighi Asl A., Badrkhani N., Novel Methods in Extraction of Natural Compound, First National Conference on Novel Technologies in Chemistry and Chemical Engineering, 1392.
- [15] Azmir J., et al., Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials: A Review, *Journal of Food Engineering*, 117, 426–436, 2013.
- [16] Karimian R., Ghasenlou F., Study of Saponin Content in Aerial Parts and Roots of Three *Verbascum L.* species, *Journal of Plant Research*, 28(3), 596–606, 2014.
- [17] Montgomery D. C., *Design and Analysis of Experiments*, 8th ed, John Wiley & Sons, Inc, NJ, 2013.
- [18] Sun Y., et al., Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Saikosaponins from *Bupleurum Falcatum* with Orthogonal Array Design, *Journal of Separation Science*, 33(8), 1161–1166, 2010.
- [19] Goyeneche R., Fanovich A., Rodriguez Rodrigues C., Nicolao M. C., and Di Scala K., Supercritical CO₂ Extraction of Bioactive Compounds from Radish Leaves: Yield, Antioxidant Capacity and Cytotoxicity, *Journal of Supercritical Fluids*, 135, 78–83, 2018.
- [20] Jalilvand M., Vakili S., Amini N., Nematollahi A., *Applicable View in Medicinal Plant Investigations*, Andish_e_Mandegar Publication, Tehran, 1390.