DOI: http://dx.doi.org/ 10.22104/JIFT.2018.2550.1598

فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، دوره ۵، شماره ۳، صفحه ۴۴۶-۴۲۷، بهار ۱۳۹۷

# فرایند چندمرحله‌ای با جریان متقابل و متقاطع برای استخراج ترکیبات فنلی و آنتی اکسیدانی از گیاه رزماری در مقیاس نیمه‌صنعتی

**زرین نصری***

**استادیار پژوهشی، مهندسی شیمی، گروه فناوری‌های شیمیایی سبز، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران**

**(تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۸، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۶/۱۱/۷، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۰)**

## چکیده

در این مقاله فرایندهای استخراج چند مرحله‌ای با جریان متقاطع و متقابل به‌منظور استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از گیاه رزماری در مقیاس نیمه صنعتی برای اولین بار انجام شده است. آزمایش‌های انجام شده شامل استخراج سه مرحله‌ای با جریان متقاطع با استفاده از حلال استن، استخراج سه مرحله‌ای با جریان متقاطع با استفاده از حلال اتانول، استخراج یک، دو و سه مرحله‌ای با جریان متقابل در حالت نا پیوسته با استفاده از حلال اتانول می‌باشند. شرایط فرایندی شامل وزن گیاه ۲/۵ kg، نسبت حلال به گیاه، ۱۲ lit/kg و زمان فرایند ۹۰ min می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که میزان بازده عصاره جامد استخراج شده ۳۷/۲۷ ، ۹۵/۴۵ و ۹۳/۱۸٪، میزان ترکیبات فنلی کل استخراج شده (بر پایه وزن گیاه) ۲۶۶۲/۷۵، ۸۶۲۷/۴۴ و ۸۳۷۸/۳۲ mg(GAE)/100g(DP)(TPC-DP)، میزان ترکیبات فنلی کل استخراج شده (بر پایه وزن عصاره خشک) ۱۶۳۴۴/۴، ۱۷۸۶۱/۶۹ و ۲۱۱۴۷/۰۷ mg (GAE)/100 g (DE)(TPC-DE ) و درصد مهار رادیکال آزاد DPPH (به‌عنوان شاخص فعالیت آنتی اکسیدانی) ۷۰/۷۲، ۷۷/۰۹ و ۸۴/۱٪، به‌ترتیب برای فرایندهای استخراج سه مرحله‌ای با جریان متقاطع با حلال استن، استخراج سه مرحله‌ای با جریان متقاطع با حلال اتانول، استخراج سه مرحله‌ای با جریان متقابل با حلال اتانول می‌باشد. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های محصول هم‌چنین با فعالیت آنتی اکسیدانی دو آنتی اکسیدان استاندارد BHA و BHT مقایسه شده و نتایج مطلوبی به‌دست آمده است. با توجه به این‌که میزان حلال مصرفی در روش‌های با جریان متقاطع ۹۰ lit و در روش با جریان متقابل ۳۰ lit به ازاء ۲/۵ kg گیاه می‌باشد، نتایج بیانگر میزان صرفه‌جویی قابل ملاحظه‌ای در مصرف حلال، انرژی و زمان در فرایند جریان متقابل است.

**واژه‌های کلیدی: استخراج چند مرحله‌ای، متقاطع، متقابل، گیاه رزماری، ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی اکسیدانی.**

---

* نویسنده مسئول: nasri@irost.ir

## ۱- مقدمه

نام علمی گیاه رزماری، *Rosmarinus Officinalis* و از خانواده نعناعیان می‌باشد. نام فارسی آن اکلیل کوهی بوده و گیاهی بوته‌ای و همیشه سبز است. نام‌های عربی این گیاه اکلیل الجبل، حصالبان، حصالبان اکسیر، نام‌های انگلیسی آن رزماری، گیاه حافظه[1] و نام فرانسوی آن رومارین است. این گیاه بومی ناحیه مدیترانه است و به‌طور گسترده در آب و هوای معتدل پرورش داده می‌شود. در ایران در اغلب نواحی آن را کشت و پرورش می‌دهند. شکل (۱) گیاه رزماری را نشان می‌دهد.

در سال‌های اخیر علاقه روزافـزونـی به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مانند توکوفرول‌ها و فلاونوئیدها برای حفاظت مواد غذایی ایجاد شده است. زیرا آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مسائل سمی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی را ندارند. در این میان عصاره‌های رزماری در صنایع غذایی به‌عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی مورد توجه قرار گرفته‌اند. عصاره‌های رزماری در سطح جهانی به‌طور تجاری در هر دو محصولات قابل حل در آب و قابل حل در روغن در دسترس هستند[۱، ۲] . در دنیا عصاره‌های رزماری به‌عنوان افزودنی مواد غذایی، طعم دهنده و به‌منظور جلوگیری از فساد چربی و گوشت استفاده می‌شوند [۶-۴].

از آن‌جایی که فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان متناسب با ترکیبات پلی فنلی آن‌ها می‌باشد و بررسی‌ها نشان می‌دهد که گیاهان حاوی ترکیبات فنلی بیش‌تر، فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد بالاتری دارند، معیار بررسی در این تحقیق تعیین کمی ترکیبات فنلی می‌باشد. در مورد گیاه رزماری این موضوع بویژه در مراجع اشاره شده است[۷]. اثر اصلی آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های رزماری به دی‌ترپن‌های فنلی مانند متیل کارنوسات[1]، کارنوسول[2]، اسید کارنوسیک[3] و اسیدهای فنلی مانند اسید کافئیک[4] و اسید رزمارینیک[5] مربوط است [۵، ۱۲-۸].

دل بانو و همکاران توزیع ترکیبات پلی فنلی را در قسمت‌های مختلف گیاه رزماری بررسی کردند. آن‌ها از حلال DMSO جهت استخراج استفاده کرده و نتیجه گرفتند که غلظت ترکیبات فنلی از جمله اسید کارنوسیک و کارنوسول و اسید رزمارینیک در برگ‌های این گیاه بیش‌تر از ساقه آن می‌باشد. آن‌ها هم‌چنین بیان کردند که غلظت پلی فنل‌ها در طی مراحل رشد اولیه گیاه بیش‌تر است[۹]. ولوود و کول فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های رزماری را با استفاده از سه حلال استخراج شامل پترولیوم اتر، دی‌کلرومتان، اتانول و مخلوطی از دی‌کلرومتان و اتانول مقایسه کردند. حلال اتانول مناسب‌ترین حلال تشخیص داده شد[۸]. یسیل سلیکتاس و همکاران ترکیبات فنلی کل چند نمونه عصاره رزماری را در محدوده ۱۲۰- ۲۰ بر حسب mg (GAE)/ g عصاره به‌دست آوردند. آن‌ها از حلال متانول برای استخراج استفاده کردند[۱۳]. ارکان و همکاران فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره رزماری را با گیاه سیاه دانه مقایسه کردند. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره رزماری بیش‌تر

1. Herb of memory

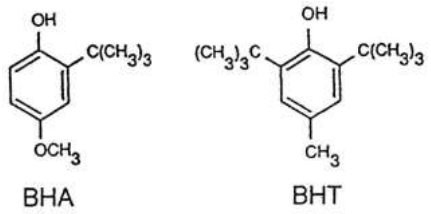
1. methyl carnosate
2. carnosol
3. carnosic acid
4. caffeic acid
5. rosmarinic acid

**شکل (۱)** گیاه رزماری

**Fig.1** Rosemary plant

از اسانس گیاه سیاه دانه به‌دست آمد[۱۱]. جینیا و همکاران عصاره‌های گیاه رزماری را از نقطه نظر فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از روش استخراج فوق بحرانی و سوکسله بررسی کردند. آن‌ها میزان ترکیبات فنلی کل عصاره‌های برگ رزماری را در محدوده ۱۴/۲۰- ۸/۴۲ برحسب g TAE/ 100 g عصاره بیان کردند[۱۴]. هرناندس و همکاران میزان ترکیبات فنلی کل عصاره‌های رزماری و پونه کوهی را با یکدیگر مقایسه کردند. در کار آن‌ها با حلال کلروفرم، میزان TPC برای عصاره رزماری ۰/۱۳۸۵ و برای عصاره پونه کوهی ۰/۰۲۲۸، با حلال اتانول، TPC برای عصاره رزماری ۰/۱۰۹۵ و برای عصاره پونه کوهی ۰/۱۰۳۲ بر حسب mg/ml عصاره به‌دست آمد[۱۰]. پانیونیک و همکاران استخراج آنتی اکسیدان‌ها را از گیاه رزماری با استفاده از التراسونیک بررسی کردند. آن‌ها نتیجه گرفتند که در مقایسه با استخراج متداول، روش التراسوند یک روش استخراج موثرتر در درجه حرارت‌های کم‌تر است [۱۵]. ترپینک و همکاران میزان ترکیبات فنلی کل عصاره رزماری را در محدوده ۹۶۶- ۲۷۸ بر حسب mg/g عصاره رزماری به‌دست آوردند [۷]. کونگ و همکاران ترکیبات فنلی کل عصاره‌های گیاه رزماری را برابر با ۶۹/۲ بر حسب mg (GAE)/g به‌دست آوردند[۱۶]. ویراکودی و همکاران فعالیت ضد باکتری و ترکیبات فنلی کل عصاره رزماری را بررسی کردند. آن‌ها مقادیر TPC رزماری را ۵۶/۷۶ بر حسب mg (GAE)/g (dE) با استفاده از حلال اتانول به‌دست آوردند [۱۷]. بوبنجا و همکاران میزان ترکیبات فنلی کل عصاره رزماری را ۴۵۰ mg/g گزارش کردند[۱۸]. دماسیوس و همکاران ترکیبات فنلی کل عصاره گیاه رزماری را برابر با ۱۴۲ بر حسب mg (GAE)/g به‌دست آوردند. آن‌ها جهت بررسی از حلال اتانول ۷۰٪ استفاده کردند[۱۹]. حسین و همکاران میزان ترکیبات فنلی را در عصاره‌های چند گونه مختلف گیاهان نعنایی از جمله رزماری بررسی کردند. آن‌ها میزان ترکیبات فنلی عصاره رزماری را برابر با ۰/۲۷۸ mg(GAE)/g به‌دست آوردند. حلال مورد استفاده در کار آن‌ها متانول بود[۲۰]. امام جمعه و توسلی میزان ترکیبات فنلی عصاره رزماری را ۴/۹۹ بر حسب (برگ خشک) g/100 g به‌دست آوردند [۲۱]. ناگ و همکاران میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی بعضی از گیاهان معطر و دارویی را از جمله رزماری بررسی کردند. نتایج نشان می‌دهد که میزان ترکیبات فنلی رزماری برابر با ۳۳۶۷ بر حسب mg (GAE)/ 100 g dw است. آن‌ها فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره رزماری را ۵۵/۰۸٪ به‌دست آوردند [۱۲]. فرناندس و همکاران میزان ترکیبات فنلی کل رزماری را ۴۶/۱۸ بر حسب mg (GAE)/g dw به‌دست آوردند[۲۲]. هندل و همکاران میزان ترکیبات فنلی عصاره رزماری الجزیره را برابر با ۱۲۹ mg(GAE)/g بیان کردند [۲۳]. میزان ترکیبات فنلی عصاره رزماری ایتالیا ۴۹۸۰ mg (GAE)/100 g گزارش گردیده است[۲۴]. اسکندی و همکاران میزان ترکیبات فنلی را با استفاده از روش اسید گالیک در مورد رزماری برابر با ۴۰/۲ mg (GAE)/g dw به‌دست آوردند [۲۵]. جمشیدی و همکاران میزان ترکیبات فنلی کل عصاره رزماری را ۵۹/۱۴ بر حسب mg (GAE)/g گزارش کردند. آن‌ها از حلال متانول برای این منظور استفاده کردند[۲۶].

آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به‌طور معمول از ترکیبات پلی‌فنلیک ساخته می‌شود. BHA و BHT دو آنتی‌اکسیدانی هستند که بیش‌ترین میزان مصرف را دارند. هر چند مطالعات نشان می‌دهد که به‌واسطه آثار سمی این دو ترکیب، تمایل به مصرف آن‌ها در دنیا کاهش پیدا کرده است. یک سری ترکیبات کمکی نیز وجود دارد که خودشان اثر کمی روی




**شکل (۲)** ساختار شیمیایی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA، BHT [۲۷]

**Fig.2** Chemical structures of synthetic antioxidants, BHT, BHA

اکسیداسیون چربی دارند ولی کار آنتی‌اکسیدان را بهبود داده و مدت کارکرد آن‌ها را افزایش می‌دهند. شکل (۲) ساختار شیمیایی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی را به‌عنوان نمونه نشان می‌دهد. این مواد اگرچه از نظر جلوگیری از اکسیداسیون چربی موثر هستند، ولی مواد سنتزی و غیر طبیعی هستند که در خیلی از کشورها ممنوع شده است و در سایر کشورها مصرف آن‌ها رو به کاهش است.

مطالعات نشان می‌دهد که استخراج مواد موثره از گیاهان دارویی در صنعت به‌طور عمده در حالت یک مرحله‌ای و با استفاده از روش پرکولاسیون می‌باشد. در این تحقیق تاثیر نوع روش جریان (متقاطع و متقابل)، نوع حلال (استن و اتانول) و تعداد مراحل استخراج برای استخراج مواد موثره از گیاه رزماری در مقیاس نیمه صنعتی برای اولین بار انجام گرفته است و آنالیزهای مختلف شامل میزان عصاره کل، بازده عصاره کل، ترکیبات فنلی کل (بر اساس وزن گیاه)، ترکیبات فنلی کل (بر اساس وزن عصاره خشک)، فعالیت آنتی اکسیدانی محصول اندازه گیری شده و با آنتی اکسیدان‌های استاندارد BHT و BHA مقایسه شده است.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- تهیه و آماده‌سازی گیاه

برای افزایش راندمان استخراج، مواد جامد قبل از ورود به سیستم استخراج پیش فراوری می‌شود. این فراوری شامل آسیاب کردن و خرد کردن می‌باشد. اجزای قابل حل در گیاهان به‌طور معمول داخل سلول‌های گیاهی قرار دارند. سلول‌های گیاهان به‌وسیله دیواره سلولی احاطه شده‌اند که در مقابل نفوذ حلال مقاومت دارند. جهت استخراج بایستی دیواره‌های سلول‌های گیاهی تخریب گردند. برای استخراج محصولات دارویی از برگ‌ها و ساقه‌های گیاهان، آسیاب کردن به پاره شدن دیواره‌های سلول کمک می‌کند و حلال می‌تواند با حل شونده تماس پیدا کند. فرایندهای آسیاب کردن و خرد کردن هم‌چنین سطح تماس حل شونده را با حلال افزایش می‌دهد. در این تحقیق گیاه اکلیل کوهی (رزماری) شامل برگ و چوب در محیط خشک و سایه به دور از نور خورشید نگه‌داری شده اند. گیاه پس از آسیاب کردن با اندازه کوچک‌تر از ۲ میلی‌متر جهت استخراج مورد استفاده قرار گرفته است.

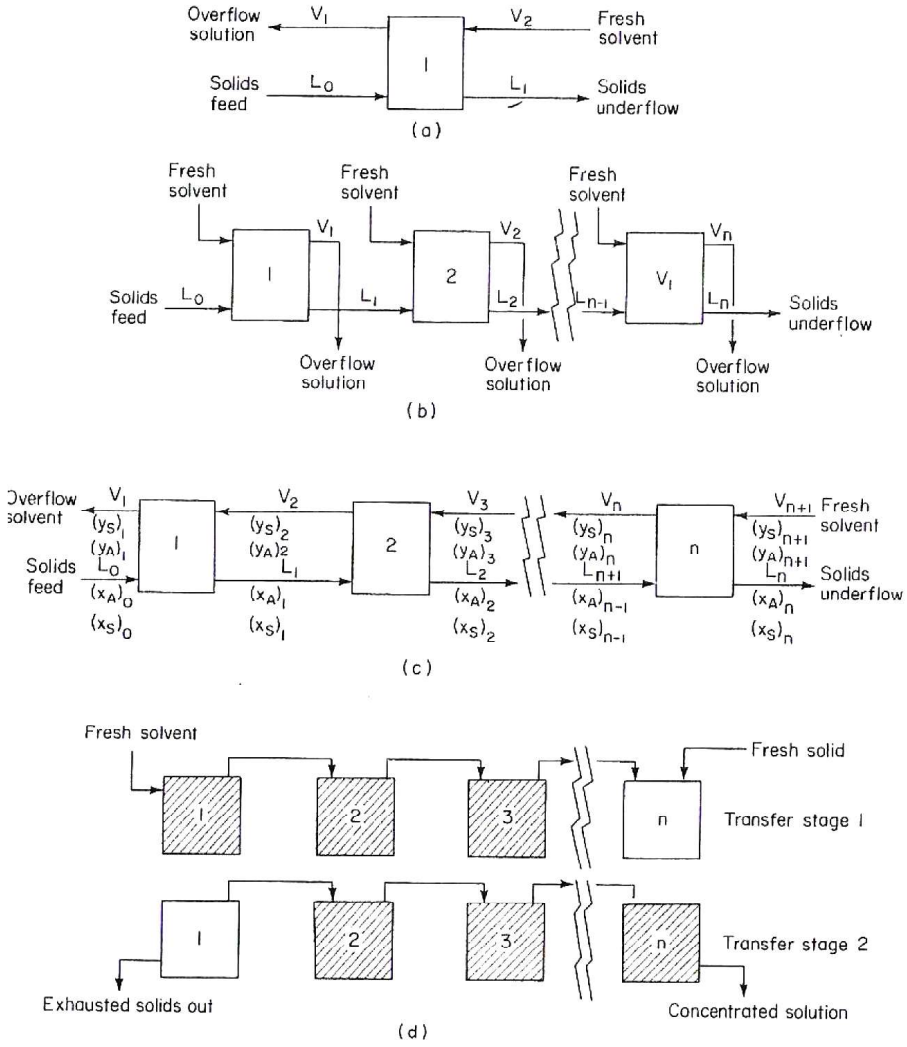
### ۲-۲- مواد شیمیایی

اسید گالیک و فولین سیوکالتیو از شرکت مرک و DPPH ازشرکت سیگما خریداری شده‌اند. همه مواد شیمیایی و معرف‌ها گرید آنالیتیکال داشتند.

### ۲-۳- روش استخراج چند مرحله ای در مقیاس نیمه صنعتی

سه نوع اساسی روش‌های عملیات در سیستم‌های استخراج وجود دارد. شکل (۳) این روش‌ها را نشان می‌دهد. شکل ۳-a یک سیستم یک‌مرحله‌ای را نشان می‌دهد که بیانگر عملیات کامل تماس خوراک و حلال تازه است. این روش اگر چه در عملیات صنعتی به‌واسطه استخراج کم حل‌شونده به‌ندرت استفاده می‌گردد، در کارخانجات گیاهان دارویی کاملا متداول است. محلول حاصل در این حالت به‌نسبت رقیق است. شکل ۳-b یک سیستم چندمرحله‌ای با جریان متقاطع را نشان می‌دهد. حلال تازه، وارد هر مرحله می‌گردد و با جریان جامد تماس داده می‌شود. جریان زیرین از مرحله اول به مرحله دوم فرستاده می‌شود که دوباره با حلال تازه استخراج می‌شود. شکل‌های ۳-c و ۳-d سیستم‌های چند مرحله‌ای با جریان متقابل را به‌صورت پیوسته و ناپیوسته نشان می‌دهند. جریان‌های زیرین و بالایی به‌صورت جریان متقابل مداوم با یکدیگر جریان می‌یابند. در این سیستم گیاه در یک جهت و حلال در جهت دیگر حرکت کرده و در تماس با یکدیگر قرار می‌گیرند. اگر مقادیر حلال و مواد و نرخ جریان بهینه باشند، استخراج مواد موثره از گیاه به‌طور کامل امکان پذیر است. این فرایند بسیار کارآمد بوده و زمان کم جهت استخراج نیاز دارد. عصاره کاملا تغلیظ شده از یک طرف سیستم و گیاه عاری از مواد موثره از طرف دیگر واحد خارج می‌گردد. با این روش در مقایسه با سایر روش‌ها با مقدار حلال کم‌تری می‌توان مقدار مشخصی از مواد موثره را از گیاه استخراج کرد زیرا محلول تغلیظ شده بعد از تماس با جامد تازه سیستم را ترک می‌کند.

در استخراج از جامد، پارامتر کنترل کننده در فرایند انتقال جرم شدت انتقال ماده به یا از داخل ذرات جامد است. در




**شکل (۳)** روش‌های عملیات در سیستم‌های استخراج جامد-مایع بر حسب جهت جریان a) سیستم یک‌مرحله‌ای، b) سیستم چندمرحله‌ای با جریان متقاطع، c) سیستم چند مرحله‌ای با جریان متقابل به‌صورت پیوسته و d) سیستم چند مرحله‌ای با جریان متقابل به‌صورت ناپیوسته [۲۸]

**Fig.3** Unit operations in solid-liquid extraction processes a) single stage, b) multistage cross-current, c) continuous multistage counter-current, d) batch multistage counter-current

صورتی که سیستم بدون همزدن انجام گیرد فرایند انحلال به‌وسیله نفوذ مولکولی انجام می‌شود که خیلی آهسته است. همزدن باعث می‌شود که فرایند نفوذ سریع‌تر صورت بگیرد و هم‌چنین از پراکندگی محلول غلیظ که در اطراف سطح ذرات تجمع یافته است، جلوگیری می‌گردد و امکان تجمع حلال تازه را در اطراف سطح ذرات جامد فراهم می‌نماید. کار اصلی همزدن تامین حلال برای کلیه ذرات در محفظه استخراج است. در طی این فرایند به‌منظور افزایش انتقال جرم و همزدن سوسپانسیون در هنگام استخراج از پمپ‌های سیرکولاسیون استفاده می‌شود.

شکل (۴) واحد استخراج چند مرحله‌ای جهت استخراج مواد موثره از گیاه رزماری را با حلال اتانول نشان می‌دهد.

همه تجهیزات از جنس SS-304 می‌باشند. در این واحد تانک‌های استخراج دو جداره و دارای قطر و ارتفاع به‌ترتیب ۳۵ و ۱۶۰ cm می‌باشند که در جدار بیرونی بخار جهت گرمایش محتویات تانک جریان می‌یابد. سیستم دارای چهار حلقه کنترل

**شکل (۴)** واحد استخراج چند مرحله‌ای جهت استخراج مواد موثره از گیاه رزماری با حلال اتانول

**Fig.4** Multistage extraction unit for effective components extraction from rosemary plant using ethanol solvent

است که در آن درجه حرارت محصول خروجی با استفاده از شدت جریان بخار ورودی به جدار بیرونی تانک‌های استخراج کنترل می‌گردد. در این سیستم نیز به‌منظور افزایش انتقال جرم و همزدن سوسپانسیون در هنگام استخراج از پمپ‌های سیرکولاسیون استفاده می‌شود. پمپ حلال ورودی و پمپ‌های سیرکولاسیون دارای دبی ۱ مترمکعب بر ساعت می‌باشند. محصول خروجی از سیستم استخراج سپس در واحد تبخیرکننده تحت خلاء ۰/۲ اتمسفر تغلیظ می‌گردد. در این واحد خوراک ورودی در داخل مبدل حرارتی صفحه‌ای گرم شده و به درجه حرارت مورد نظر تنظیم می‌گردد. سیال گرمایش بخار است که شدت جریان آن به‌وسیله درجه حرارت خروجی عصاره گیاه از مبدل حرارتی تنظیم می‌گردد. عصاره خروجی از مبدل حرارتی سپس وارد محفظه تبخیرکننده می‌شود که تحت خلاء قرار دارد. بخارات حاصل از این محفظه وارد کندانسور می‌شود که به‌وسیله آب حاصل از برج سرد کننده مایع شده و وارد تانک محصول می‌شود.

در مورد حلال استن به‌واسطه محدودیت سیستم از نظر جنس مخازن استخراج (پلیمری) و پمپ‌های سیرکولاسیون، استخراج در درجه حرارت محیط صورت گرفته است. مشخصات پمپ‌های سیرکولاسیون شامل ظرفیت بیشینه ۷۰ lit/min، حداکثر بار ۸/۲ m، ۳۲۰۰ rpm، توان ۶۰ وات است. عصاره حاصل پس از استخراج، فیلتر شده و با دستگاه تبخیر کننده و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شده و خشک گردید. علت استفاده از این سیستم برای حلال استن محدودیت پمپ‌های سیستم اتانول برای حلال‌های با نقطه اشتعال پایین می‌باشد.

میزان بازدهی عصاره کلی بر اساس حداکثر ماده جامد قابل استخراج از گیاه رزماری محاسبه گردیده است.

$$Total\ Extract = \frac{m_e}{m_p} \times 100 \qquad (۱)$$

$$Total\ Extract\ Yield = \frac{Total\ Extract}{m_t} \times 100 \qquad (۲)$$

در این روابط:

$m_e$ : جرم استخراج شده، g

$m_p$: جرم گیاه خشک، g

$m_t$: حداکثر جرم قابل استخراج (بر اساس صد گرم گیاه) (g)

حداکثر جرم قابل استخراج (بر اساس صد گرم گیاه) برای گیاه رزماری مورد آزمایش برابر با g ۴۴ می‌باشد.

### ۲-۴- بررسی میزان عصاره کلی گیاه رزماری

پس از انجام استخراج به میزان مناسب از عصاره محلول در شیشه ساعت قرار می‌گیرد و در آون در درجه حرارت مناسب تا رسیدن به وزن ثابت حرارت داده می‌شود. سپس درصد باقی مانده خشک عصاره که بیانگر میزان ماده استخراج شده از گیاه است محاسبه می‌شود. لازم به ذکر است که از هر نمونه عصاره

گیاه دو نمونه برداشته می‌شود و درصد عصاره خشک استخراج شده از هر نمونه دو بار (در مجموع ۴ بار) اندازه‌گیری می‌شود. درصد انحراف معیار نسبی (RSD٪) در این گروه از آزمایش ها برابر با ۲ ± درصد می‌باشد.

### ۲-۵- آنالیز

در این تحقیق سنجش ترکیبات فنلی در عصاره‌ها با استفاده از رنگ سنجی معرف Folin-Ciocalteau انجام شده که روشی استاندارد بوده و در کلیه مراجع برای اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی استفاده شده است. این روش بر اساس مقدار جسمی از ماده مورد آزمایش که برای بازدارندگی اکسیداسیون معرف مورد نیاز است می‌باشد. محصولات احیاء اکسید فلز رنگی آبی دارد که جذب نوری وسیع با ماکزیمم در ۷۶۵ nm به نمایش می‌گذارد. شدت جذب نور در آن طول موج متناسب با غلظت فنل‌ها است. روش به این ترتیب است که یک میلی‌لیتر نمونه عصاره با غلظت مناسب یا استاندارد کالیبراسیون گالیک اسید یا شاهد (آب مقطر) در یک فلاسک حجمی ۱۰۰ ml قرار می‌گیرد. ۷۰ ml آب مقطر و سپس ۵ ml معرف Folin-Ciocalteau اضافه می‌شود. محلول حاصل بهم زده می‌شود و به مدت یک تا هشت دقیقه در درجه حرارت اطاق قرار می‌گیرد. ۱۵ ml محلول کربنات سدیم اضافه می‌شود. آب به محلول اضافه شده تا به حجم ۱۰۰ ml برسد. سپس برای مدت ۲ ساعت در درجه حرارت اطاق نگه داشته می‌شود. نمونه به سل اسپکتروفتومتر وارد و جذب در ۷۶۵ nm اندازه‌گیری می‌گردد. این روش می‌تواند برای حجم‌های کوچک‌تر نیز انجام شود. کلیه حجم‌های ارائه شده بالا به‌صورت متناظر کاهش می‌یابد. هم‌چنین منحنی کالیبراسیون گالیک اسید برای غلظت متناظر نمونه‌ها استفاده می‌گردد. مقادیر برحسب غلظت گالیک اسید (GAE) با استفاده از واحدهای میلی‌گرم بر لیتر بیان می‌گردد[۲۹]. این آزمایش در این تحقیق برای هر نمونه عصاره چهار بار تکرار شده است. درصد انحراف معیار نسبی (RSD٪) در این گروه از آزمایش ها برابر با ۵ ± درصد می‌باشد.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری ابتدا عصاره رزماری از هر نمونه شامل ۱ mg/ml تهیه می‌شود. مقدار لازم عصاره رزماری در غلظت‌های مختلف به ۱/۵ ml محلول DPPH با غلظت مناسب اضافه می‌شود. مخلوط‌ها هم زده شده و در شیشه‌های قهوه‌ای در درجه‌حرارت اطاق برای مدت ۳۰ min می‌ماند. یک محلول شاهد شامل متانول و محلول DPPH به‌عنوان محلول کنترل تهیه می‌شود. سپس میزان جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ nm به‌وسیله اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود. میزان جذب برای متانول به صفر تنظیم شده و برای محلول نمونه‌ها و محلول کنترل ثبت می‌گردد. درصد بازدارندگی رادیکال DPPH از محلول کنترل محاسبه می‌گردد.

$$\text{درصد فعالیت مهار رادیکال DPPH} = \frac{A_b - A_s}{A_b} \times ۱۰۰ \qquad (۳)$$

در این رابطه $A_b$، جذب محلول کنترل و $A_s$، جذب نمونه است. این آزمایش برای هر نمونه عصاره چهار بار انجام شده است. درصد انحراف معیار نسبی (RSD٪) در این گروه از آزمایش ها برابر با ۵ ± درصد می‌باشد.

میزان رطوبت موجود در گیاه رزماری به‌وسیله دستگاه تقطیر انجام گرفته است. ۲۰۰ ml تولوئن و ۲ ml آب به همراه سنگ جوش در بالن ۵۰۰ میلی‌لیتری دستگاه قرار می‌گیرد. دمای جوش تولوئن ۱۱۱ درجه سانتی‌گراد و دمای جوش آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد است. برای کالیبره کردن دستگاه به مدت ۲ ساعت تقطیر انجام می‌شود (تقطیر اول) سپس سیستم سرد می‌شود و حجم آب تقطیر شده خوانده می‌شود ($n_1$). سپس ۲۰ گرم گیاه را وزن کرده و در داخل بالن ریخته و حرارت داده می‌شود تا همه آب آن تقطیر گردد و حجم آب موجود در گیاه اندازه‌گیری می‌شود (تقطیر دوم). میزان رطوبت گیاه از رابطه زیر در واحد میلی لیتر بر کیلو گرم به‌دست می آید.

$$\text{میزان رطوبت} = \frac{1000(n_2 - n_1)}{m} \qquad (۴)$$

$n_1$: حجم آب به‌دست آمده از تقطیر اول،

$n_2$: حجم کلی آب به‌دست آمده از تقطیر اول و دوم و

m: وزن پودر اولیه گیاه.

بر اساس آزمایش فوق میزان آب گیاه رزماری ۶ ± ۶۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم به‌دست آمد.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- فرایند چند مرحله‌ای با جریان متقاطع برای استخراج عصاره گیاه رزماری با حلال استن در مقیاس نیمه صنعتی

جدول (۱) مشخصات فرایندی استخراج چند مرحله‌ای گیاه رزماری با جریان متقاطع را با استفاده از حلال استن نشان می‌دهد. دلایل استفاده از استن به‌عنوان حلال در این تحقیق این است که استن به‌عنوان یک حلال صنعتی جهت استخراج عصاره رزماری در دنیا استفاده می‌شود [۳۰].

شکل (۵) تغییرات میزان عصاره کلی و بازدهی عصاره کلی را بر حسب شماره مرحله نشان می‌دهد. اعداد در این شکل مربوط به مشخصات عصاره خروجی از هر مرحله است. چنان‌که مشاهده می‌شود حداکثر بازدهی استخراج مربوط به مرحله دوم می‌باشد و برابر با ۱۷/۷۳٪ است. علت آن را می‌توان این‌گونه بیان کرد که از آن‌جایی که استخراج در شرایط محیط صورت می‌گیرد. در طی مرحله اول، زمان برای استخراج قسمت قابل توجهی از مواد قابل استخراج از گیاه کافی نبوده است و در مرحله دوم به‌واسطه زمان کافی پرکولاسیون استخراج بیش‌تر صورت گرفته است. زمان استخراج در مورد گیاهان بایستی به اندازه کافی باشد تا حلال از میان دیواره سلول‌های گیاهی برای انحلال اجزاء به داخل سلول‌ها نفوذ کند و محلول حاصل به بیرون نفوذ نماید. با افزایش زمان میزان استخراج عصاره کلی افزایش می‌یابد.

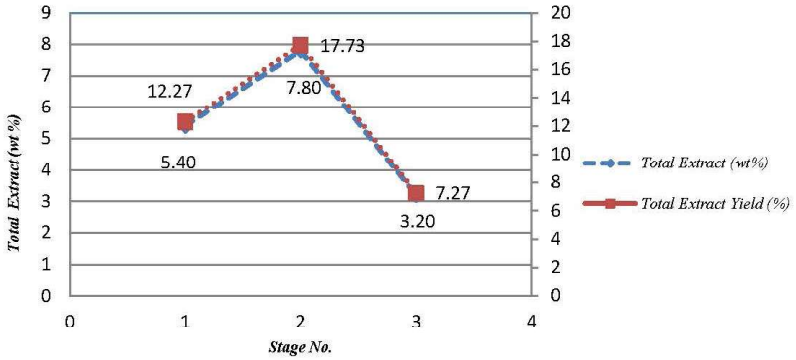
شکل (۶) تغییرات بازدهی عصاره کلی تجمعی را بر حسب شماره مرحله نشان می‌دهد. مشاهده می‌گردد که در پایان مرحله سوم ۳۷/۲۷٪ ماده از گیاه استخراج شده است.

شکل (۷) تغییرات میزان ترکیبات فنلی عصاره را بر حسب (TPC-DP) mg (GAE) / 100g (DP) با شماره مرحله استخراج نشان می‌دهد. این اعداد بیانگر ترکیبات فنلی کل استخراج شده (هم ارز با اسید گالیک) از ۱۰۰ گرم گیاه رزماری خشک می‌باشد. چنان‌که مشاهده می‌شود روند تغییرات این پارامتر مطابق با میزان عصاره خشک کلی استخراج شده می‌باشد و بیش‌ترین عدد مربوط به عصاره حاصل از مرحله دوم استخراج و برابر با ۱۳۲۲/۱۸ mg (GAE) /100g (DP) است.

شکل (۸) تغییرات میزان ترکیبات فنلی کل عصاره خشک را بر حسب mg (GAE) / 100g (DE) در مقابل شماره مرحله نشان می‌دهد. این اعداد بیانگر میزان میلی گرم ترکیبات فنلی استخراج شده (هم ارز با اسید گالیک) در ۱۰۰ گرم عصاره خشک می‌باشد. چنان‌که مشاهده می‌شود با افزایش شماره مرحله از ۱ به ۲ این میزان افزایش یافته ولی مراحل ۲ و ۳ تقریبا یکسان است. علت آن را می‌توان این گونه بیان کرد که ترکیبات فنلی کل، جهت استخراج نیاز به زمان بیش‌تری نسبت به سایر مواد قابل استخراج دارند. در مرحله اول گیاه در حلال خیسانده شده و مواد موثره جهت استخراج در معرض حلال قرار می‌گیرند. حداکثر میزان ترکیبات فنلی کل در ۱۰۰

**جدول (۱)** مشخصات فرایندی استخراج چند مرحله‌ای گیاه رزماری با جریان متقاطع با استفاده از حلال استن
**Table 1** Process specifications of multistage cross-current extraction of rosemary using acetone solvent

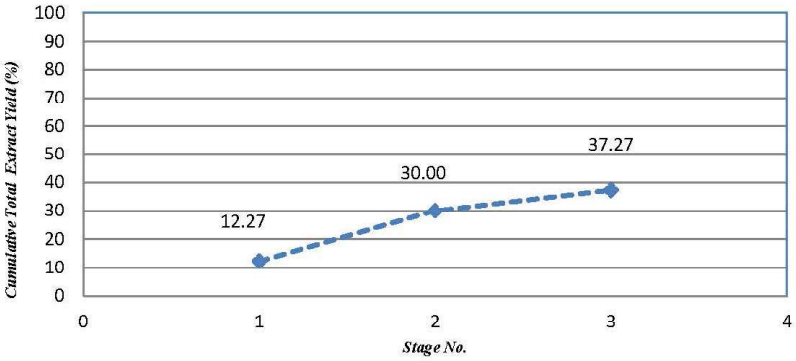
| فرایند<br>process | جریان متقاطع<br>Cross-current |
|---|---|
| تعداد مراحل<br>No. of stages | 3 |
| وزن گیاه<br>Plant weight | 2.5 kg |
| نسبت حلال به جامد<br>Solvent to solid ratio | 12 lit/kg |
| حلال<br>solvent | استن |
| درجه حرارت<br>temperature | 25 °C |
| زمان فرایند (هر مرحله)<br>Process time (each stage) | 2 hr |




**شکل (۵)** تغییرات میزان عصاره کلی و بازدهی عصاره کلی گیاه رزماری بر حسب شماره مرحله (حلال: استن، نوع جریان: متقاطع)

**Fig. 5** Effect of stage number on total extract and total extract yield of rosemary

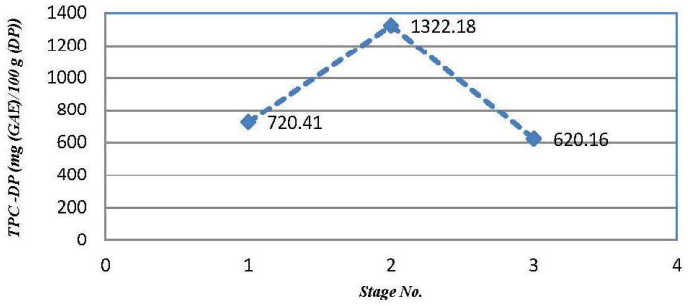
(Solvent: Acetone, Process: Cross-current)




**شکل (۶)** تغییرات بازدهی عصاره کلی تجمعی گیاه رزماری بر حسب شماره مرحله (حلال: استن، نوع جریان: متقاطع)

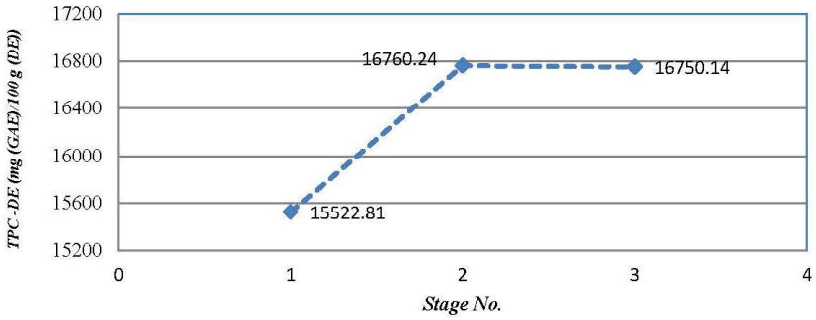
**Fig. 6** Effect of stage number on cumulative total extract yield of rosemary plant

(Solvent: Acetone, Process: Cross-current)




**شکل (۷)** تغییرات میزان ترکیبات فنلی عصاره گیاه رزماری بر حسب (TPC-DP) mg (GAE) / 100g (DP) با شماره مرحله استخراج (حلال: استن، نوع جریان: متقاطع)

**Fig.7** Effect of stage number on TPC-DP of rosemary plant (mg (GAE) / 100g (DP) (Solvent: Acetone, Process: Cross-current)




**شکل (۸)** تغییرات میزان ترکیبات فنلی کل عصاره خشک گیاه رزماری بر حسب mg (GAE) / 100g (DE) در مقابل شماره مرحله استخراج (حلال: استن، نوع جریان: متقاطع)

**Fig. 8** Effect of stage number on TPC-DE of rosemary plant (mg (GAE) / 100g (DE)) (Solvent: Acetone, Process: Cross-current)

گرم عصاره خشک از گیاه رزماری با استفاده از حلال استن ۱۶۷۶۰/۲۴ میلی‌گرم می‌باشد. به عبارت دیگر ۱۶/۷۶٪ عصاره خشک را ترکیبات فنلی تشکیل می‌دهند.

هندل و همکاران میزان ترکیبات فنلی عصاره رزماری الجزیره را برابر با ۱۲۹ mg (GAE)/g بیان کردند [۲۳].

شکل (۹) تغییرات درصد مهار رادیکال DPPH عصاره گیاه رزماری را با حلال استن بر حسب شماره مرحله در فرایند با جریان متقاطع نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌گردد روند تغییرات این پارامتر نیز مشابه با میزان عصاره کلی و ترکیبات فنلی کل (بر حسب وزن گیاه) می‌باشد. بالاترین درصد مهار رادیکال DPPH از عصاره حاصل از مرحله دوم استخراج صورت می‌گیرد و برابر با ۹۰/۵۶٪ می‌باشد که عدد قابل توجهی است. آنتی‌اکسیدان‌ها رادیکال‌های آزاد را به‌وسیله دو مکانیسم اصلی خنثی می‌کنند. از طریق انتقال الکترونی یا به‌وسیله انتقال اتم هیدروژن یا هر دو می‌تواند توام صورت گیرد که در انتها نتیجه یکسان است. ولی مکانیسم و سینتیک واکنش متفاوت است. مهار رادیکال DPPH اساسا بر پایه انتقال الکترون است و انتقال اتم هیدروژن مسیر واکنش جانبی است. واکنش در ابتدا شامل واکنش‌های الکترون و یا انتقال اتم هیدروژن از آنتی‌اکسیدان به رادیکال آزاد است.

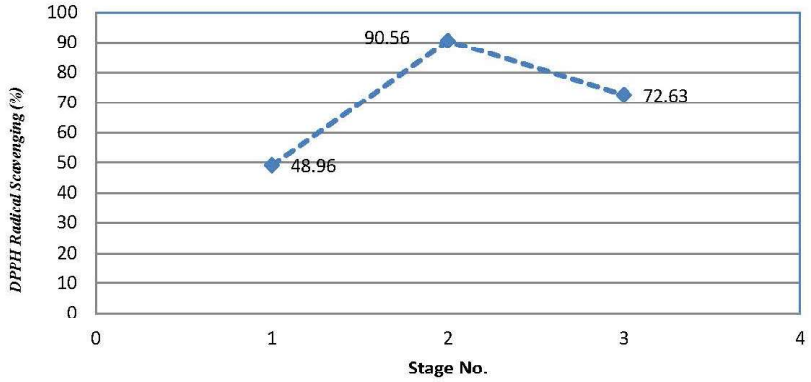
شکل (۱۰) تغییرات درصد مهار رادیکال DPPH عصاره گیاه رزماری حاصل از سه مرحله استخراج با حلال استن را با دو آنتی‌اکسیدان استاندارد BHA و BHT مقایسه می‌کند. چنان‌که مشاهده می‌شود میزان درصد مهار رادیکال DPPH برای عصاره گیاه رزماری ۷۰/۷۲ است که از آنتی اکسیدان استاندارد BHT (۵۹/۰۱٪) بیش‌تر است.

لازم به ذکر است که در مراجع میزان مهار رادیکال آزاد DPPH برای آنتی اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT به‌ترتیب ۷۱/۲۸ و ۵۳/۲۹٪ گزارش شده است [۳۱]. هندل و همکاران فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره رزماری را با آنتی اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT مقایسه نمودند. آن‌ها نتیجه گرفتند که فعالیت آنتی اکسیدانی رزماری از BHT بیش‌تر و از BHA کم‌تر است [۲۳]. این نتیجه با نتایج تحقیق تطابق دارد.

### ۳-۲- فرایند چند مرحله‌ای با جریان متقاطع برای استخراج عصاره گیاه رزماری با حلال اتانول در مقیاس نیمه صنعتی

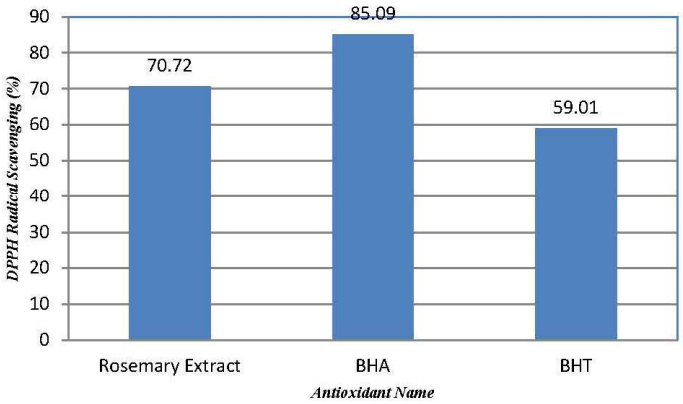
جدول (۲) مشخصات فرایندی استخراج چند مرحله‌ای گیاه رزماری با جریان متقاطع را با استفاده از حلال اتانول نشان می‌دهد.

شکل (۱۱) تغییرات میزان عصاره خشک و بازدهی عصاره خشک را بر حسب شماره مرحله در مورد استخراج با حلال اتانول با جریان متقاطع نشان می‌دهد. میزان بازدهی عصاره خشک بر اساس روابط (۱) و (۲) محاسبه گردیده است. چنان‌که مشاهده می‌شود حداکثر بازدهی استخراج مربوط به مرحله اول است و برابر با ۵۹/۰۹٪ می‌باشد. مقایسه میان این شکل با شکل (۵) نشان می‌دهد که در این حالت به‌دلیل درجه حرارت بالای استخراج (۷۰ °C) قسمت عمده مواد قابل استخراج از گیاه در همان مرحله اول خارج شده است. شرایط درجه حرارت بالا باعث افزایش میزان شدت نفوذ حلال و انتقال جرم و کاهش ویسکوزیته حلال و کشش سطحی می‌گردد.



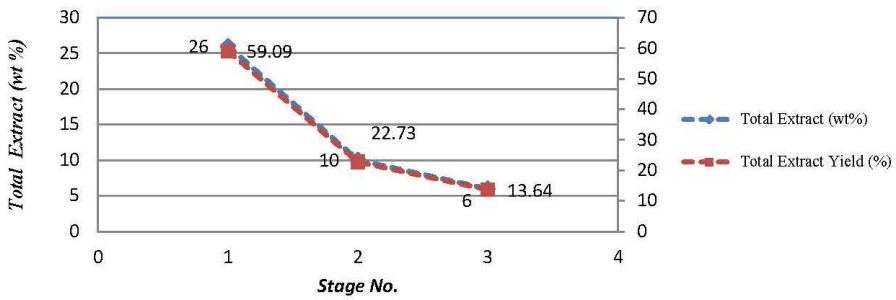

**شکل (۹)** تغییرات درصد مهار رادیکال DPPH عصاره گیاه رزماری بر حسب شماره مرحله (حلال: استن، نوع جریان: متقاطع)

**Fig. 9** Effect of stage number on DPPH radical scavenging of rosemary extract (Solvent: Acetone, Process: Cross-current)




**شکل (۱۰)** مقایسه درصد مهار رادیکال DPPH عصاره گیاه رزماری حاصل از سه مرحله استخراج با دو آنتی اکسیدان استاندارد BHA و BHT (حلال: استن، نوع جریان: متقاطع)

**Fig. 10** Comparison of DPPH radical scavenging of rosemary extract with standard synthesis antioxidants, BHA and BHT (Solvent: Acetone, Process: Cross-current)




**شکل (۱۱)** تغییرات میزان عصاره خشک و بازدهی عصاره خشک گیاه رزماری بر حسب شماره مرحله استخراج (حلال: اتانول، نوع جریان: متقاطع)

**Fig. 11** Effect of stage number on total extract and total extract yield of rosemary (Solvent: Ethanol, Process: Cross-current)

**جدول (۲)** مشخصات فرایندی استخراج چند مرحله‌ای گیاه رزماری با جریان متقاطع با استفاده از حلال اتانول
**Table 2** Process specifications of multistage cross-current extraction of rosemary using ethanol solvent

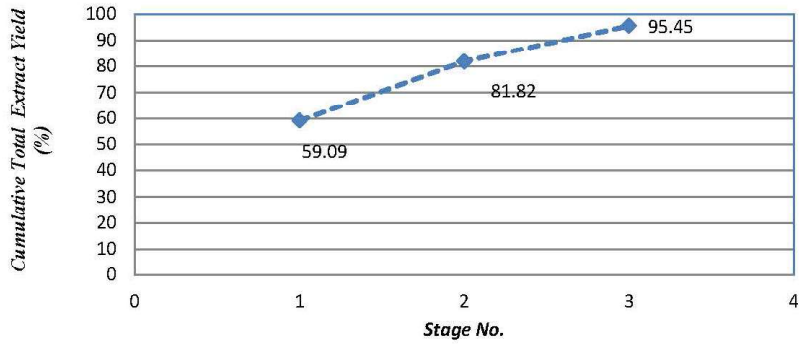
| فرایند<br>process | جریان متقاطع<br>Cross-current |
|---|---|
| تعداد مراحل<br>No. of stages | 3 |
| وزن گیاه<br>Plant weight | 2.5 kg |
| نسبت حلال به جامد<br>Solvent to solid ratio | 12 lit/kg |
| حلال<br>solvent | اتانول |
| درجه حرارت<br>temperature | 70 °C |
| درصد حلال<br>Solvent concentration | 50 (v/v) |
| زمان فرایند<br>Process time | 90 min |

شکل (۱۲) تغییرات بازدهی عصاره کلی تجمعی را بر حسب شماره مرحله استخراج نشان می‌دهد. مشاهده می‌گردد که در پایان مرحله سوم ۹۵/۴۵٪ ماده قابل استخراج از گیاه استخراج شده است.

شکل (۱۳) تغییرات میزان ترکیبات فنلی کل عصاره را بر حسب mg (GAE) /100g (DP) با شماره مرحله استخراج نشان می‌دهد. این اعداد بیانگر میزان ترکیبات فنلی کل استخراج شده (هم ارز با اسید گالیک) از ۱۰۰ گرم گیاه رزماری خشک می‌باشد. چنان‌که مشاهده می‌شود، روند تغییرات مشابه با میزان عصاره خشک کلی استخراج شده است. بیش‌ترین عدد مربوط به عصاره حاصل از مرحله اول استخراج می‌باشد و برابر با ۵۶۸۷/۵۷ mg (GAE) /100g (DP) است. این پارامتر جهت ارزیابی راندمان استخراج اهمیت دارد. در فرایند استخراج جامد- مایع شدت انتقال جرم با افزایش گرادیان غلظت افزایش می‌یابد. بنابراین هم‌چنان‌که غلظت جزء فعال در حلال افزایش می‌یابد شدت انتقال جرم کاهش می‌یابد تا سیستم به تعادل برسد. در این حالت غلظت‌های اجزاء فعال در گیاه و حلال یکسان است. بعد از آن انتقال جرم جزء فعال از گیاه به حلال صورت نمی‌گیرد.

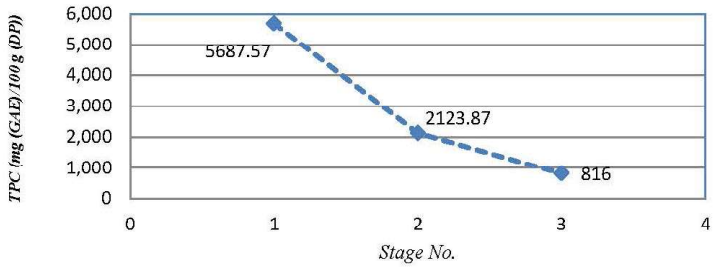
جهت مقایسه نتایج این قسمت با نتایج سایر محققین می‌توان به چند مورد اشاره کرد. امام جمعه و توسلی میزان ترکیبات فنلی عصاره رزماری را ۴/۹۹ بر حسب (برگ خشک) g/100 g به‌دست آوردند [۲۱]. فرناندس و همکاران فعالیت آنتی اکسیدانی ۱۳عصاره گیاهی از جمله رزماری را بررسی کردند. آن‌ها میزان ترکیبات فنلی کل گیاهان شامل پونه کوهی، مرزنجوش، رزماری، بادرنجبویه، برگ بو، مریم گلی، ریحان، خردل، زردچوبه، بابونه، نعناع، زنجبیل، رازیانه را برابر با ۷۴/۱، ۴۸/۶۶، ۴۶/۱۸، ۴۲/۸۶، ۳۷/۲۶، ۲۶/۸۹، ۲۰/۴۲، ۲۰/۴۰، ۱۷/۵۳، ۱۶/۷۷، ۱۰/۶۹، ۸/۹۳، ۵/۹۸ برحسب mg (GAE)/g dw به‌ترتیب بیان کردند[۲۲]. چنان‌که مشاهده می‌شود میزان ترکیبات فنلی عصاره رزماری در دو بررسی فوق برابر با ۴۹۹۰ و mg (GAE)/100 g ۴۶۱۸ می‌باشد. این اعداد از مقدار به‌دست آمده در این مقاله mg (GAE) /100g (DP) ۵۶۸۷/۵۷ کم‌تر است.

شکل (۱۴) تغییرات میزان ترکیبات فنلی کل عصاره خشک را بر حسب mg (GAE) /100g (DE) در مقابل شماره مرحله نشان می‌دهد. این اعداد بیانگر میزان ترکیبات فنلی استخراج شده (هم ارز با اسید گالیک) در ۱۰۰ گرم عصاره خشک است. چنان‌که مشاهده می‌شود با افزایش شماره مرحله این میزان کاهش یافته است. علت آن را می‌توان این‌گونه بیان کرد که گیاه در سه مرحله در درجه حرارت بالا (۷۰ °C) قرار گرفته است و قسمت عمده ترکیبات فنلی در مرحله اول از



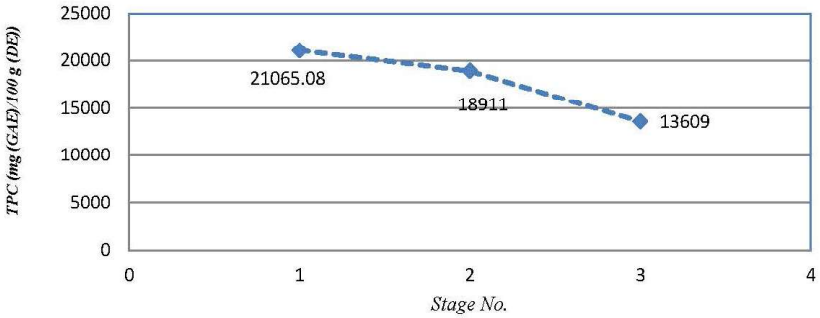

**شکل (۱۲)** تغییرات بازدهی عصاره کلی تجمعی گیاه رزماری بر حسب شماره مرحله استخراج (حلال: اتانول، نوع جریان: متقاطع)

**Fig. 12** Effect of stage number on cumulative total extract yield of rosemary plant (Solvent: Ethanol, Process: Cross-current)




**شکل (۱۳)** تغییرات میزان ترکیبات فنلی کل عصاره گیاه رزماری با شماره مرحله استخراج (حلال: اتانول، نوع جریان: متقاطع)

**Fig. 13** Effect of stage number on TPC of rosemary extract (Solvent: Ethanol, Process: Cross-current)




**شکل (۱۴)** تغییرات میزان ترکیبات فنلی کل عصاره خشک رزماری بر حسب mg (GAE) / 100g (DE) در مقابل شماره مرحله استخراج (حلال: اتانول، نوع جریان: متقاطع)

**Fig. 14** Effect of stage number on TPC-DE of rosemary plant (mg (GAE) / 100g (DE)) (Solvent: Ethanol, Process: Cross-current)

گیاه، به‌واسطه درجه حرارت بالا قادر به خارج شدن هستند. از آن‌جایی که شدت انتقال جرم جزء فعال بستگی به میزان حلالیت در حلال دارد گرمایش سیستم می‌تواند انتقال جرم را افزایش دهد. افزایش درجه حرارت باعث کاهش ویسکوزیته حلال می‌گردد و ویسکوزیته کم نفوذ حلال را در جامد بهبود می‌دهد. درجه حرارت فرایند بایستی برای بهترین شرایط حلالیت، فشار بخار مناسب حلال، افزایش نفوذ پذیری حل شونده و انتخاب پذیری حلال انتخاب گردد.

حداکثر میزان ترکیبات فنلی کل عصاره خشک در ۱۰۰ گرم عصاره خشک از گیاه رزماری با استفاده از حلال اتانول (۵۰٪) برابر با ۲۱۰۶۵/۰۸ میلی گرم GAE می‌باشد. به عبارت دیگر ۲۱/۰۷٪ عصاره خشک را ترکیبات فنلی تشکیل می‌دهند. این پارامتر جهت استاندارد سازی محصول اهمیت دارد.

شکل (۱۵) تغییرات درصد مهار رادیکال آزاد DPPH

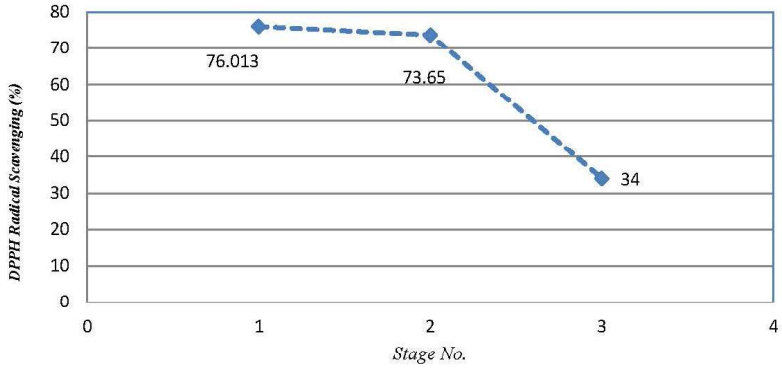
عصاره‌های آبی-الکلی را بر حسب شماره مرحله در حالت جریان متقاطع نشان می‌دهد. چنان‌که مشاهده می‌گردد روند تغییرات کاهشی است. بیش‌ترین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH مربوط به عصاره حاصل از مرحله اول بوده و برابر با ۷۶/۰۱٪ می‌باشد.

شکل (۱۶) درصد مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره رزماری حاصل از حلال اتانول را با درصد مهار رادیکال آزاد DPPH مربوط به آنتی اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT مقایسه می‌کند. چنان‌که مشاهده می‌شود درصد مهار رادیکال آزاد DPPH مربوط به عصاره رزماری بزرگ‌تر از مقدار مربوط به BHT است. ترپنیک و همکاران نیز میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های رزماری را با BHT مقایسه کردند و نتیجه گرفتند که در بعضی از عصاره‌ها میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره رزماری از BHT بیش‌تر است. آن‌ها سینتیک مهار رادیکال آزاد DPPH را برای عصاره رزماری و آنتی اکسیدان سنتزی BHT مقایسه کردند و نتیجه گرفتند که میزان DPPH در حضور عصاره‌های رزماری یک کاهش اولیه سریع نشان می‌دهند. در مراحل بعدی میزان کاهش DPPH آهسته‌تر است [۷].

### ۳-۳- فرایند چند مرحله‌ای با جریان متقابل برای استخراج عصاره گیاه رزماری با حلال اتانول در مقیاس نیمه صنعتی

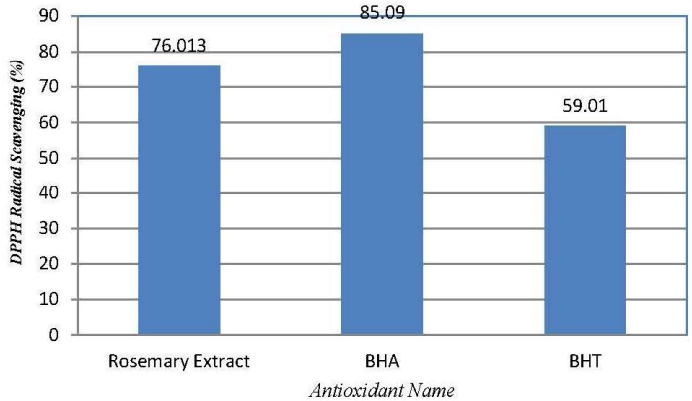
جدول (۳) مشخصات فرایندی استخراج چند مرحله‌ای گیاه رزماری با جریان متقابل را با استفاده از حلال اتانول نشان می‌دهد. لازم به ذکر است که در این سری از آزمایش‌ها، سه آزمایش جداگانه یک مرحله‌ای، دو مرحله‌ای و سه مرحله‌ای صورت گرفته است و در هر کدام محصول جداگانه وجود دارد.

شکل (۱۷) تغییرات میزان عصاره خشک و بازدهی عصاره




**شکل (۱۵)** تغییرات درصد مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های رزماری بر حسب شماره مرحله استخراج (حلال: اتانول، نوع جریان: متقاطع)

**Fig. 15** Effect of stage number on DPPH radical scavenging of rosemary extract (Solvent: Ethanol, Process: Cross-current)




**شکل (۱۶)** مقایسه درصد مهار رادیکال DPPH عصاره گیاه رزماری حاصل از سه مرحله استخراج با دو آنتی اکسیدان استاندارد BHA و BHT (حلال: اتانول، نوع جریان: متقاطع)

**Fig. 16** Comparison of product DPPH radical scavenging with standard synthesis antioxidants, BHA, BHT (Solvent: Ethanol, Process: Cross-current)

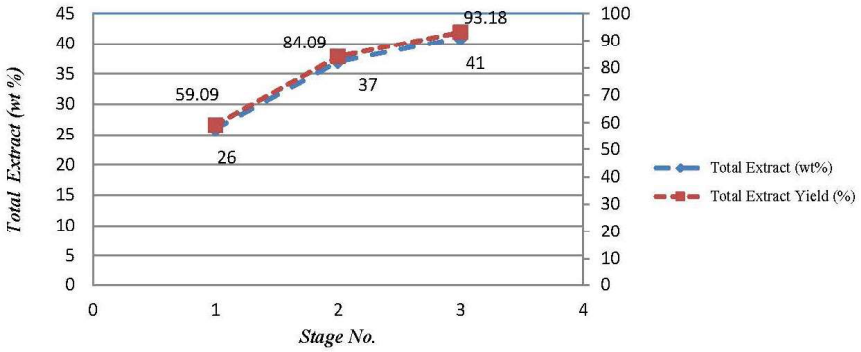
خشک را بر حسب تعداد مرحله در مورد استخراج با حلال اتانول (۵۰٪) با جریان متقابل نشان می‌دهد. میزان بازدهی عصاره خشک بر اساس روابط (۱) و (۲) محاسبه گردیده است. چنان‌که مشاهده می‌شود با افزایش تعداد مراحل استخراج میزان عصاره کلی و بازدهی عصاره خشک افزایش می‌یابد. نرخ افزایش در اولین مرحله بیش‌ترین مقدار است و با افزایش تعداد مراحل، رشد آن کاهش یافته و به سمت ماکزیمم مقدار پیش می‌رود.

شکل (۱۸) تغییرات میزان ترکیبات فنلی کل عصاره را بر حسب mg (GAE)/ 100g (DP) در مقابل تعداد مراحل استخراج با حلال اتانول با جریان متقابل نشان می‌دهد. این اعداد بیانگر میزان ترکیبات فنلی کل استخراج شده (هم ارز با اسید گالیک) از ۱۰۰ گرم گیاه رزماری خشک می‌باشد. چنان‌که مشاهده می‌شود با افزایش تعداد مراحل استخراج، میزان ترکیبات فنلی کل افزایش یافته است. بیش‌ترین مقدار مربوط به جریان سه مرحله‌ای است و برابر با ۸۳۷۸/۳۲ mg (GAE)/ 100g (DP) می‌باشد. مشاهده می‌گردد که نرخ تغییرات نیز با افزایش تعداد مراحل کاهش یافته است.

جهت مقایسه با نتایج سایر مراجع در خصوص گیاه رزماری و سایر گیاهان می‌توان به موارد زیر اشاره کرد. کونگ و همکاران ترکیبات فنلی کل عصاره‌های گیاهان میخک ، پرک هندی، رزماری ، جوز هندی ، فاخره ، شیرین بیان ، تخم رازیانه ، هل، پونه کوهی ، فلفل ، سنبل خطایی ، رازیانه را برابر با ۷۹/۵ ، ۷۸/۱ ، ۶۹/۲ ، ۶۶/۹ ، ۵۶/۲ ، ۴۵ ، ۳۹/۴ ، ۳۶/۸ ، ۳۲/۴ ، ۲۶/۵ ، ۲۴/۸ ، ۲۲/۵ بر حسب mg (GAE)/g به‌دست آوردند[۱۶] . دماسیوس و همکاران (۲۰۱۱) ترکیبات فنلی کل عصاره‌های گیاهان پونه کوهی ، ریحان ، رزماری، مرزنجوش ، آویشن ، مرزه، علف شیرین ، گشنیز را با استفاده از حلال اتانول ۷۰٪ برابر با ۱۳۶، ۷۵/۵، ۱۴۲، ۱۰۴، ۷۷/۸، ۶۸/۲ ، ۸۷/۹ ، ۹۷/۱ بر حسب mg (GAE)/g بیان کردند[۱۹]. ناگ و همکاران میزان ترکیبات فنلی رزماری، رازیانه، شوید را برابر با ۳۳۶۷، ۱۰۱۷/۲۹، ۷۷۳/۱۴ بر حسب mg (GAE)/ 100 g dw به‌دست آوردند[۱۲]. میزان ترکیبات فنلی عصاره رزماری ایتالیا ۴۹۸۰ mg (GAE)/100 g گزارش گردیده است [۲۴]. اسکندی و همکاران (۲۰۱۷) میزان ترکیبات فنلی گیاهان از خانواده نعناعیان با استفاده از روش اسید گالیک شامل پونه کوهی، آویشن، مرزه، بادرنجبویه و رزماری را برابر با ۵۵، ۳۸/۲، ۴۳/۳ ، ۷۰/۴ ، ۴۰/۲ بر اساس mg (GAE)/g dw به‌دست آوردند [۲۵]. جمشیدی و همکاران میزان ترکیبات فنلی کل عصاره رزماری را با استفاده از حلال متانول ۵۹/۱۴ بر حسب mg (GAE)/g گزارش کردند [۲۶]. آن‌ها هم‌چنین میزان ترکیبات فنلی کل عصاره نعناع، گونه پونه آبی، بادرنجبویه، فراسیون، زولنگ ، اناریجه ، زبان بره را برابر با ۳۸/۲۷، ۴۷/۹۰، ۴۲/۶۳،

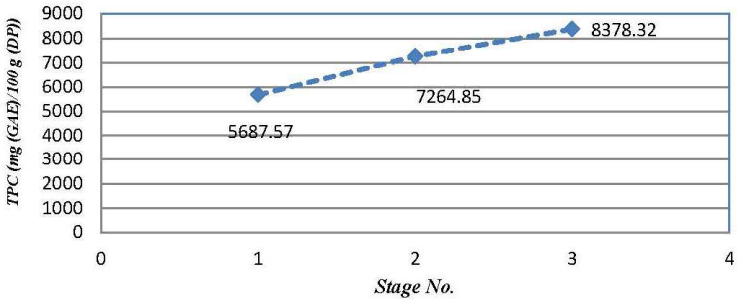
**جدول (۳)** مشخصات فرایندی استخراج چند مرحله‌ای گیاه رزماری با جریان متقاطع با استفاده از حلال اتانول
**Table 2** Process specifications of multistage cross-current extraction of rosemary using ethanol solvent

| فرایند process | جریان متقابل Counter-current |
|---|---|
| تعداد مراحل No. of stages | 1, 2, 3 |
| وزن گیاه Plant weight | 2.5 kg |
| نسبت حلال به جامد Solvent to solid ratio | 12 lit/kg |
| حلال solvent | اتانول |
| درجه حرارت temperature | 70 °C |
| درصد حلال Solvent concentration | 50 (v/v) |
| زمان فرایند Process time | 90 min |




**شکل (۱۷)** تغییرات میزان عصاره خشک و بازدهی عصاره خشک گیاه رزماری بر حسب تعداد مرحله استخراج (حلال: اتانول، نوع جریان: متقابل)

**Fig. 17** Effect of stage number on total extract and total extract yield of rosemary (Solvent: Ethanol, Process: Counter-current)




**شکل (۱۸)** تغییرات میزان ترکیبات فنلی کل عصاره گیاه رزماری بر حسب ((mg (GAE) / 100g (DP)) در مقابل تعداد مراحل استخراج (حلال: اتانول، نوع جریان: متقابل)

**Fig. 18** Effect of stage number on TPC-DP of rosemary plant mg (GAE) / 100g (DP) (Solvent: Ethanol, Process: Counter-current)

۵۸/۴۵، ۴۳/۷۸، ۳۸/۷۳ و ۵۱/۸۰ بر حسب mg (GAE)/g به‌دست آوردند [۲۶].

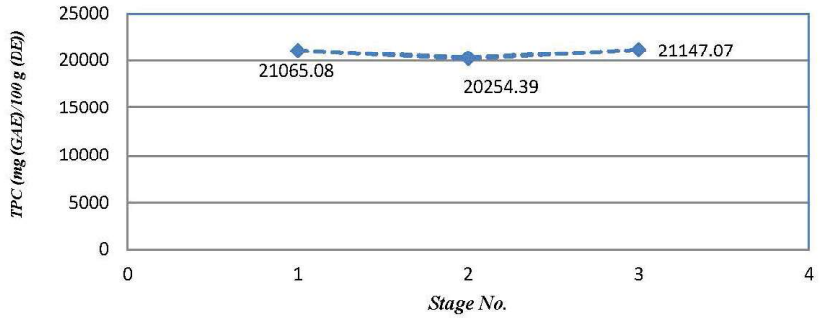
شکل (۱۹) تغییرات میزان ترکیبات فنلی کل عصاره خشک را بر حسب mg (GAE)/100g (DE) با تعداد مراحل استخراج با حلال اتانول با سیستم جریان متقابل نشان می‌دهد. این اعداد بیانگر میزان ترکیبات فنلی استخراج شده (هم ارز با اسید گالیک) در ۱۰۰ گرم عصاره خشک است. چنان‌که مشاهده می‌شود بیش‌ترین مقدار مربوط به جریان سه مرحله‌ای است و برابر با mg (GAE)/ 100g (DE) ۲۱۱۴۷/۰۷ می‌باشد.

ویراکودی و همکاران مقادیر TPC گیاهان انبه، نوعی زنجبیل، فلفل سیاه، رزماری، پونه کوهی، اکالیپتوس و فلفل کوهی را با استفاده از حلال اتانول برابر با ۳۲/۲۱، ۴/۸۷، (Nd)، ۵۶/۷۶، ۲۶/۱۶، ۳۸۶/۴۳، (Nd) بر حسب mg (GAE)/g (dE) گزارش کردند[۱۷]. بوبنجا و همکاران میزان ترکیبات فنلی کل عصاره رزماری، روغن زیتون و کاکائو را برابر با ۴۵۰، ۰/۲۷۹ و mg/g ۴۸ /۳۲ گزارش کردند [۱۸].

شکل (۲۰) تغییرات درصد مهار رادیکال آزاد DPPH را بر حسب تعداد مراحل استخراج در حالت جریان متقابل نشان می‌دهد. چنان‌که مشاهده می‌گردد با افزایش تعداد مراحل استخراج درصد مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش یافته است. بیش‌ترین مقدار ۸۴/۰۹٪ است.

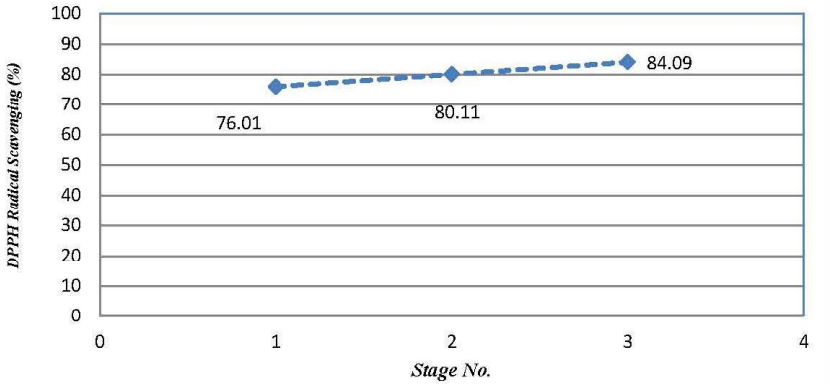
ناگ و همکاران فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری را ۵۵/۰۸٪، رازیانه را ۱۶/۵۶٪ و شوید را ۱۳/۴۳٪ به‌دست آوردند [۱۲].

شکل (۲۱) درصد مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره رزماری حاصل از استخراج با تعداد مراحل مختلف جریان متقابل با حلال اتانول با مقادیر مربوط به آنتی اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT را مقایسه می‌کند. چنان‌که مشاهده می‌شود درصد مهار رادیکال آزاد استخراج سه مرحله‌ای از BHT بیش‌تر بوده و به BHA بسیار نزدیک است.



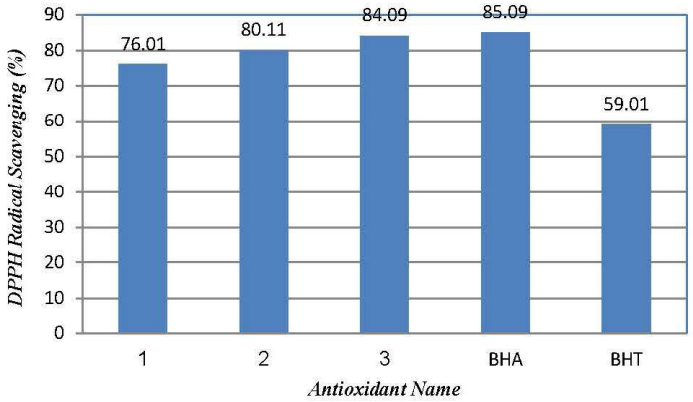

**شکل (۱۹)** تغییرات میزان ترکیبات فنلی کل عصاره خشک رزماری بر حسب mg (GAE) / 100g (DE) با تعداد مراحل استخراج (حلال: اتانول، نوع جریان: متقابل)

**Fig. 19** Effect of stage number on TPC-DE of rosemary plant (mg (GAE) / 100g (DE)) (Solvent: Ethanol, Process: Counter-current)




**شکل (۲۰)** تغییرات درصد مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره گیاه رزماری بر حسب تعداد مراحل استخراج (حلال: اتانول، نوع جریان: متقابل)

**Fig. 20** Effect of stage number on DPPH radical scavenging of rosemary extract (Solvent: Ethanol, Process: Counter-current)




**شکل (۲۱)** مقایسه درصد مهار رادیکال DPPH عصاره گیاه رزماری حاصل از سه مرحله استخراج با دو آنتی اکسیدان استاندارد BHA و BHT (حلال: اتانول، نوع جریان: متقابل)

**Fig. 21** Comparison of DPPH radical scavenging of rosemary extract with standard synthesis antioxidants, BHA and BHT (Solvent: Ethanol, Process: Counter-current)

### ۳-۴- مقایسه بین نتایج جریان متقاطع و جریان متقابل

جدول (۴) نتایج مربوط به سه گروه از آزمایش‌ها در مقیاس پایلوت را شامل استخراج سه مرحله‌ای جریان متقاطع با حلال استن خالص در درجه حرارت محیط، استخراج سه مرحله‌ای جریان متقاطع با حلال اتانول ۵۰٪ در درجه حرارت ۷۰°C، استخراج سه مرحله‌ای جریان متقابل با حلال اتانول ۵۰٪ در درجه حرارت ۷۰ °C را با یکدیگر مقایسه می‌کند. از بررسی جدول فوق نتایج زیر حاصل می‌گردد.

۱-میزان بازدهی عصاره کلی و ترکیبات فنلی کل استخراج شده (TPC-DP) در حالت جریان متقاطع با حلال اتانول بیش‌ترین مقدار است و به ترتیب برابر با ۹۵/۴۵٪ و ۸۶۲۷/۴۴ mg (GAE)/100g (DP) است. علت آن را می‌توان این‌گونه بیان کرد که در جریان متقاطع در هر مرحله گیاه با حلال تازه در تماس قرار می‌گیرد و بنابراین راندمان انتقال جرم افزایش می‌یابد. مقایسه با حلال استن نشان می‌دهد که حلال اتانول ۵۰٪ برای استخراج ترکیبات فنلی مناسب‌تر است.

۲- درصد مهار رادیکال DPPH و میزان ترکیبات فنلی کل استخراج شده (TPC-DE) در مورد استخراج با حلال اتانول ۵۰٪ در حالت جریان متقابل بیش‌ترین مقدار است و به ترتیب برابر با ۸۴/۱٪ و ۲۱۱۴۷/۰۷ mg (GAE)/100g (DE) است.

۳-میزان حلال مصرفی در سه گروه آزمایش نشان می‌دهد که حلال مصرفی در دو حالت جریان متقاطع سه برابر حالت جریان متقابل است و میزان برتری استخراج با جریان متقابل را نشان می‌دهد.

## ۴- نتیجه گیری

در این مقاله تاثیر فناوری‌های استخراج چند مرحله‌ای با جریان متقاطع و متقابل در استخراج ترکیبات موثره از گیاه رزماری در مقیاس پایلوت مورد ارزیابی قرار گرفته است. در سال‌های اخیر علاقه فزاینده‌ای به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی برای حفاظت مواد غذایی ایجاد شده است. در این میان عصاره‌های رزماری در صنایع غذایی به‌عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی مورد توجه قرار گرفته است. روش‌های چند مرحله‌ای شامل متقاطع و متقابل با استفاده از حلال‌های استن و اتانول مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان می‌دهد که روش استخراج چند مرحله‌ای با جریان متقابل به‌عنوان یک فناوری کارآمد استخراج مواد موثره برای گیاهان دارویی با مصرف انرژی و حلال کم‌تر و کیفیت محصول بالاتر در مقیاس صنعتی قابل استفاده است.

**جدول (۴)** مقایسه نتایج مربوط به سه گروه از آزمایش‌ها در مقیاس پایلوت
**Table 4** The comparison between the results of three group of experiments at pilot plant scale

| شماره No. | فرایند process | حلال solvent | تعدادمراحل No. of stages | عصاره کلی Total Extract (wt%) | بازدهی عصاره کلی Total Extract Yield (%) | *TPC-DP | **TPC-DE | درصد مهار DPPH Scavenging percentage | حلال Solvent (lit) | گیاه plant (kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | متقاطع -Cross current | استن acetone | 3 | 16.4 | 37.27 | 2662.75 | 16344.4 | 70.72 | 90 | 2.5 |
| 2 | متقاطع -Cross current | اتانول ethanol | 3 | 42 | 95.45 | 8627.44 | 17861.69 | 77.09 | 90 | 2.5 |
| 3 | متقابل -Counter current | اتانول ethanol | 1 | 26 | 59.09 | 5687.57 | 21065.08 | 76.01 | 30 | 2.5 |
| 4 | متقابل -Counter current | اتانول ethanol | 2 | 37 | 84.09 | 7264.85 | 20254.39 | 80.11 | 30 | 2.5 |
| 5 | متقابل -Counter current | اتانول ethanol | 3 | 41 | 93.18 | 8378.32 | 21147.07 | 84.1 | 30 | 2.5 |

* mg (GAE)/100 g (DP)
** mg (GAE)/100 g (DE))

## منابع

[1] Flavex Naturextrakte GMBH. Rosemary Antioxidant Extract 25, 2017. http://www.flavex.com/fileadmin/flavex.de/user_upload/Spezifikation/Englisch/Spezi_Rosemary_Antioxidant_extract_25_027_020.pdf. Accessed 08.01.2018.

[2] Vitiva. VivOX descriptive sheet, 2008. http://www.vitiva.eu/ . Accessed 23.12.2010.

[3] Range Products Pty Ltd. Rosemary Extract. http://www.rangeproducts.com.au/wp-content/uploads/2014/04/RMRosemaryExtract.pdf. Accessed 08.01.2018.

[4] D., Pratt, I. , Rietjens, I., Tobback, P., Speijers, G., Toldra, F. (2008). Use of rosemary extracts as a food additive, Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with Food. *The EFSA* (*European Food Safety Authority) J*., 721, 1-29.

[5] Puangsombat, K. (2010). Formation and inhibition of heterocyclic amines in meat products. *Dissertation, Doctor of Philosophy*, Kansas State University, Manhattan, Kansas.

[6] Cascone, A. (2005). Study and prevention of lipid oxidation in meat. *Doctoral thesis in Food Science and Nutrition, Department of Food Science*, University of Naples.

[7] Terpinc, P., Bezjak, M., Abramovic, H. (2009). A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chem*. 115 (2), 740-744.

[8] Wellwood, C.R.L., Cole, R.A. (2004). Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, rosmarinus officinalis (L.), accessions for optimization of antioxidant yield. *J. Agric. Food Chem*., 52, 6101-6107.

[9] Del Bano, M. J., Lorente, J., Castillo, J.N., Benavent-Garcia, O., Del Rio, J.A., Ortun, A., Quirin, K., Gerard, D. (2003). Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of rosmarinus officinalis. Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem*., 51, 4247-4253.

[10] Hernández-Hernández , E., Ponce-Alquicira, E., Jaramillo-Flores, M.E., Guerrero Legarreta, I. (2009). Antioxidant effect rosemary (Rosmarinus officinalis L.) and oregano (Origanum vulgare L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Sci*., 81, 410–417.

[11] Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus Officinalis L.) extract, blackseed (Nigella sativa L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem*., 110, 76–82.

[12] Nagy, M., Tofana, M., Socaci, S.A., Pop, A.V., Bors, M. D., Farcas, A., Moldovan, O. (2014). Total phenolic, flavonoids and antioxidant capacity of some medicinal and aromatic plants. *Food Sci. Technol. Bull*., 71(2), 209-210.

[13] Yesil-Celiktas, O., Nartopb, P., Gurelb, A., Bedirb, E., Vardar-Sukanb, F. (2007). Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from Rosmarinus officinalis' calli. *J. Plant Physiology* 164, 1536-1542.

[14] Genena, A.K., Hense, H., Junior, A.S., Souza, S.M.d. (2008). Rosemary (Rosmarinus officinalis) – A study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 28(2), 463-469.

[15] Paniwnyk, L., Cai, H., Albu, S., Mason, T.J., Cole, R. (2009). The enhancement and scale up of the extraction of anti-oxidants from Rosmarinus officinalis using ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry,* 16, 287–292.

[16] Kong, B., Zhang, H., Xiong, Y.L. (2010). Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action. *Meat Sci*., 85, 772–778.

[17] Weerakkody, N.S., Caffin, N., Turner, M.S., Dykes, G.A. (2010). In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control,* 21, 1408–1414.

[18] Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., Abram, M. (2011). Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chem*., 127, 1821–1827.

[19] Damašius, J., Venskutonis, P. R., Ferracane, R., Fogliano, V. (2011). Assessment of the influence of some spice extracts on the formation of heterocyclic amines in meat. *Food Chem*., 126, 149–156.

[20] Hossain, M.B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A.B., Brunton, N.P. ( 2011). Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (Rosmarinus officinalis L.), marjoram (Origanum ajorana L.) and oregano (Origanum vulgare L.) using response surface methodology. *Food Chem*., 126, 339–346.

[21] Tavassoli, S., Djomeh, Z.E. (2011). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of methanol extract of rosemary (Rosmarinus officinalis L.). *Global Veterinaria*, 7(4), 337-341.

[22] Fernandes, R.P.P., Trindade, M.A., Tonin, F.G., Lima, C.G., Pugine, S.M.P., Munekata, P.E.S., Lorenzo, J.M., de Melo, M.P. (2016). Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *J. Food Sci. Technol*., 53(1), 451–460.

[23] Hendel, N., Larous, L., Belbey, L. (2016). Antioxidant activity of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) and its in vitro inhibitory effect on penicillium digitatum. *Int. Food Res. J.*, 23(4), 1725-1732.

[24] Rose, A. Antioxidants in Rosemary, 2011. http://www.traditional-foods.com/antioxidants/rosemary/. Accessed 1.08.2018.

[25] Skendi, A., Irakli, M., Chatzopoulou, P. (2017). Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. *J. Appl. Res. Med. Aromatic Plants*. 6, 62-69.

[۲۶] جمشیدی، م.؛ احمدی آشتیانی، ح.؛ رضازاده، ش.؛ فتحی آزاد، ف.؛ مازندرانی، م.؛ خاکی، آ. (۱۳۸۹) بررسی و مقایسه ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی چند گونه گیاهی بومی مازندران. *فصلنامه گیاهان دارویی*، جلد ۲، شماره ۳۴، ص ۱۷۷-۱۸۳.

[27] Karamac, M. and Amarowicz, R. (1997). Antioxidant activity of BHA, BHT and TBHQ examined with IVIiiler's test. *Grasas y Aceites*, 48, 83-86.

[28] Schweitzer, P.A. (1979). Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers: McGraw-Hill.

[29] Waterhouse, A.L. (2002). Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, I1.1.1-I1.1.8.

[30] Commission Directive 2010/67/EU amending Directive 2008/84/EC laying down specific purity criteria on food additives other than colours and sweeteners (Text with EEA relevance), Official Journal of the European Union, L 277/17, 21.10.2010.32)

[31] Zhang, Y., Yang, L., Zu, Y., Chen, X., Wang, F., Liu, F. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chem*. 118, 656–662.