DOI: http://dx.doi.org/ 10.22104/JIFT.2019.3161.1766

فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، دوره ۶، شماره ۲، صفحه ۳۰۴-۲۹۳، زمستان۱۳۹۷

تأثیر روش‌های استخراج خیساندن و فراصوت بر محتوای ترکیبات فنلی بره‌موم

بی بی مرضیه رضوی زاده [1*]، راضیه نیازمند [2]

۱. دانشیار شیمی، گروه ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

۲. دانشیار شیمی، گروه شیمی مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۱۴، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۷/۹/۱۰، تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۵)

چکیده

در این پژوهش مقدار ترکیبات فنلی کل موجود در عصاره بره‌موم حاصل از استخراج به دو روش خیساندن و فراصوت و نیز تأثیر روش استخراج بر نوع و مقدار هر یک از ترکیبات فنلی به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بررسی شده است. استخراج به روش خیساندن در نسبت‌های مختلف بره‌موم ۱۰، ۳۰ و ۵۰٪w/v به حلال اتانل ۷۰٪ و در مدت‌های مختلف ۲، ۸ و ۲۴ h انجام گرفت. استخراج به کمک فراصوت نیز در مدت‌های صوت‌دهی ۷، ۱۴ و ۲۱min و دامنه‌های نوسانی ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰٪ انجام شد. بیشترین مقدار ترکیبات فنلی در عصاره بره‌موم از روش خیساندن در مدت استخراج ۲۴ h و با نسبت ۱۰٪ w/v بره‌موم به حلال برابر با ۴۴/۸۲٪ به‌دست آمد. در حالی‌که، با روش اعمال فراصوت به مدت ۲۱ min و با دامنه نوسانی ۸۰٪ بیش‌ترین ترکیبات فنلی برابر با ۴۱/۱۹٪ حاصل شد. شناسایی محتوی ترکیبات فنلی عصاره‌ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد که تعداد ۱۵ ترکیب فنلی در عصاره بره‌موم حاصل از روش خیساندن مشخص شدند در حالی که در عصاره به دست‌آمده از روش فراصوت ۱۳ ترکیب شناسایی شدند. بیش‌ترین ترکیب بازیابی و شناسایی شده در عصاره بره‌موم از هر دو روش استخراج پینوسمبرین بود که مقدار آن در عصاره‌ها ۱۵/۱٪ در روش فراصوت و ۱۱/۷٪ در روش خیساندن تعیین شد. نتایج کروماتوگرافی نشان داد که درصد هر یک از ترکیبات شناسایی شده در عصاره استخراج شده به روش فراصوت بیش‌تر از ترکیبات مشابه در روش خیساندن بود.

واژه‌های کلیدی: بره‌موم، ترکیبات فنلی کل، فراصوت، خیساندن، کروماتوگرافی.

* نویسنده مسئول: m.razavizadeh@rifst.ac.ir

۱. مقدمه

بره‌موم ماده‌ای رزینی و چسبنده و به رنگ سبز تا قهوه‌ای تیره است که توسط زنبور عسل تولید می‌شود و به‌عنوان یک عامل ضدعفونی‌کننده در محل ورود زنبور به داخل کندو قرار دارد. ترکیبات شیمیایی بره‌موم بسیار پیچیده و تحت تأثیر منشا جغرافیایی خود بوده و به طور کلی این ترکیبات شامل صمغ، موم، اسیدهای چرب ضروری، گرده گل و ترکیبات آلی، ویتامین‌ها و عناصر معدنی هستند [۱]. مقدار و نوع ترکیبات بره‌موم بسته به مکان و زمان جمع‌آوری و روش تولید آن متفاوت است [۲]. مهم‌ترین اجزای فعال فارماکولوژیکی موجود در بره‌موم عبارت از فلاونز، فلاونولز، فلاوانونز، که جمعاً فلاونوئیدها نامیده می شوند، و سایر ترکیبات فنلی و آروماتیک هستند. به سبب وجود این ترکیبات، بره‌موم دارای خواص درمانی و فعالیت‌های بیولوژیکی متنوعی از جمله خواص ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد ویروسی، التیام دهنده زخم ها، تحریک‌کننده سیستم ایمنی و توقف رشد سلول‌های سرطانی می‌باشد [۵-۳]. استفاده تجاری اصلی بره‌موم به‌عنوان یک مکمل غذایی و درمانی است. هم چنین خصوصیت آنتی اکسیدانی، فعالیت‌های ضد میکروبی و ضد قارچی بره‌موم فرصت هایی را در تکنولوژی مواد غذایی ایجاد می‌کند [۱۲-۶].

بره‌موم را نمی‌توان به‌طور مستقیم و به صورت خام مورد استفاده قرار داد. لذا، به منظور حذف مواد بی فایده و حفظ بخش فعال پلی فنلی، باید آن را خالص‌سازی کرد [۱]. اگر چه، آماده-سازی نمونه و حذف مواد ناخواسته برای اندازه‌گیری دقیق ترکیبات فنلی مهم است، اما روش استخراج تعیین‌کننده اصلی برای جداسازی و بازیابی فنل‌ها است. رایج‌ترین تکنیک‌های استخراج ترکیبات فنلی استفاده از حلال‌های آلی یا غیر معدنی می‌باشد. انتخاب حلال‌های استخراج مانند آب، استون، اتیل استات، الکل‌ها (متانل، اتانل و پروپانول) و مخلوط آن‌ها بر عملکرد ترکیبات فنلی استخراج شده تأثیر می‌گذارد [۱]. در این میان، حلال‌های آبی- الکلی به‌عنوان مناسب‌ترین محیط برای استخراج اجزای فنلی فعال بیولوژیکی از بره‌موم خام توصیف شده‌اند. تکنیک‌های استخراج مورد استفاده برای تجزیه شیمیایی بره‌موم خام، روش خیساندن در دمای اتاق و نیز استخراج رفلاکس گرم روش‌های معمولی هستند که اغلب برای بازیابی ترکیبات فنلی از نمونه‌های بره‌موم نیز استفاده می‌شود. این روش‌های ساده نیازمند دستگاه به‌نسبت ارزان هستند و استخراج ترکیبات فنلی به مقدار قابل توجهی صورت می‌گیرد. با این حال، روش‌های استخراج متعارف اغلب وقت‌گیر و نیازمند حجم بالای حلال، افزایش هزینه‌های فرایند و کاهش پایداری محیطی هستند [۱]. به همین علت، استفاده از روش‌های غیرمتعارف از جمله فراصوت [۱۳، ۱۴]، میدان الکتریکی پالسی [۱۵]، گرمایش مایکروویو [۱۶، ۱۷]، سیال‌های فوق‌بحرانی [۱۸، ۱۹] مورد توجه قرار گرفته‌اند. در عین حال، روش‌های استخراج متعارف مانند سوکسله، خیساندن و تقطیر با بخار آب هنوز هم به‌عنوان روش-های مرجع و برای مقایسه با روش‌های جدید به کار می‌روند [۲۰، ۱]. کوبیلین و همکاران عصاره‌های بره‌موم را در حلال‌های آب-اتانلی، آب- پروپیلن گلایکول و آب- روغن زیتون را به روش خیساندن در دمای اتاق و نیز در دمای ۷۰ °C به‌دست آوردند. با استفاده از روش فولین-سی کالچیو مقدار کل ترکیبات فنلی در عصاره‌های بره‌موم در محدوده ۰/۵ تا mg/L ۱۲/۷ اسید گالیک به‌دست آمد. نتایج ارزیابی نشان داد که محتوی ترکیبات فنلی استخراج شده به شدت به نوع حلال بستگی دارد [۲۱].

فراصوت یک نوع خاص از موج صوتی فراتر از شنوایی انسان و در محدوده ۲۰ کیلو هرتز تا ۱۰۰ مگاهرتز است. امواج فراصوت از طریق فشرده سازی و انتشار از محیط می‌گذرند و این فرایند پدیده ای را به نام حباب‌زایی ایجاد می‌کند که به معنی تولید، رشد و سقوط حباب‌ها است. این امر موجب آزادسازی مقدار زیادی انرژی و بنابراین بالا رفتن دما در محیط شده و حرارت ایجاد شده به محتویات داخل محیط منتقل می‌شود. بر پایه این اصل استخراج به کمک فراصوت توسعه یافته است. استخراج به کمک فراصوت در مایعات و مایعات حاوی مواد جامد توسعه یافته است. مزیت اصلی استخراج به کمک فراصوت در نمونه گیاه جامد مشاهده می‌شود، زیرا انرژی فراصوت، ترشح ترکیبات ارگانیک و غیر آلی را از ماتریکس گیاه تسهیل می‌کند [۲۲]. هنگامی که موج فراصوت با دامنه فرکانسی (شدت) بیش‌تر از محیط مایع عبور می‌کند، فروپاشی حباب‌های ایجاد شده بیش‌تر می‌شود. فروپاشی حباب در نزدیکی غشاهای گیاهی می‌تواند باعث ایجاد نیروهای برشی شدیدی شود و بنابراین، شکاف‌های بسیار ریزی در بافت‌های گیاهی ایجاد می‌کند و بدین ترتیب اختلال در بافت سلولی و بهبود بهره‌وری استخراج افزایش می‌یابد [۲۳-۲۵]. در این شرایط، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و نیز ترکیبات با خواص

آنتی اکسیدانی بیش‌تری به حلال منتقل می‌شود. مقدار رطوبت نمونه، درجه آسیاب، اندازه ذرات و حلال، عوامل بسیار مهمی برای استخراج کارآمد و موثر هستند. علاوه بر این، دما، فشار، فرکانس، دامنه ارتعاش و مدت صوت‌دهی از عوامل موثر در عمل فراصوت هستند [۲۰، ۲۸-۲۶].

طی ۲۵ سال گذشته تحولات قابل توجهی در تحقیق بر استخراج، شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات فنلی مواد طبیعی از جمله برەموم صورت گرفته است. تروشوا و همکاران تکنیک‌های استخراج خیساندن، استخراج فراصوت و استخراج به کمک مایکروویو را در استخراج اجزای بیولوژیکی فعال نمونه‌های برەموم مورد استفاده قرار دادند. این گروه اثربخشی روش‌ها را بر اساس مقدار کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی استخراج شده مقایسه کردند. نتایج نشان داد که MAE بسیار سریع بود، اما منجر به استخراج مقدار زیادی از مواد غیر فنلی و غیر فلاونوئیدی شد. بیش‌ترین مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده از روش UE به دست آمد. در مقایسه با استخراج به روش خیساندن، روش‌های MAE و UE عملکرد استخراج بالایی داشتند، هم‌چنین مدت استخراج کوتاه‌تر بود و حلال کم‌تری مصرف شد. روش UE نشان داد که کارآمدترین روش بر اساس عملکرد، مدت استخراج و انتخابی بودن است [۲۰]. هم‌چنین، سانپا و همکاران عصاره برەموم را با استفاده از فراصوت در مدت‌های ۱۵، ۳۰، ۴۵، و ۶۰ min استخراج کردند و عصاره‌های برەموم را برای مقایسه فعالیت‌های بیولوژیکی مورد بررسی قرار دادند. برەموم‌های استخراج شده با استفاده از فراصوت در مدت استخراج ۱۵ و ۳۰ min اثرات مهارکنندگی بر روی قارچ‌ها و باکتری‌های مورد آزمایش و هم‌چنین فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی نشان دادند [۱۳]. لیما و همکاران عصاره برەموم نقاط مختلف جنوب برزیل را به روش‌های خیساندن، استخراج به کمک فراصوت و سوکسله با حلال اتانل ۸۰-۷۰ ٪ انجام دادند و سپس در غلظت‌های مختلفی ازهیدروژل‌های پلی‌وینیل الکل وپلی‌آکریلیک اسید به‌عنوان سیستم‌های حامل جای‌گذاری کردند. روش‌های خیساندن، سوکسله و فراصوت برای تعیین بازدهی استخراج ترکیبات فنلی از برەموم خام مورد استفاده قرار گرفتند. بر اساس نتایج آن‌ها، عصاره به‌دست آمده از فراصوت بهترین کارایی را برای ممانعت باکتریایی نشان داد [۲۹].

از سوی دیگر، بیسکایا و فریرا از روش سیال فوق بحرانی عصاره برەموم را استخراج در انتها عصاره با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا شناسایی کردند. آن‌ها روش استخراج SCF را به دو صورت فرایند یک مرحله‌ای با CO_2، و CO_2 بعلاوه کمک حلال و نیز فرآیند دو مرحله‌ای با استفاده از اتانل، اتیل استات، کلروفرم، اِن-هگزان، آب و مخلوط آب/ اتانل انجام دادند. بر اساس نتایج به‌دست آمده استفاده از اتانل به‌عنوان حلال در SCF ، عملکرد استخراج در حدود سه برابر نسبت به استخراج CO_2 افزایش یافت. هم‌چنین، آن‌ها پی بردند که برای رسیدن به غلظت مناسب مواد فعال بیولوژیکی شرایط فرایند دو مرحله ای ارجحیت دارد [۳۰]. اگرچه که تاکنون درباره تهیه عصاره برەموم و روش‌های استخراج ترکیبات فنلی تحقیقات زیادی صورت گرفته، اما غالب آن‌ها بر اثر استخراج بر فعالیت بیولوژیکی و اثر ضد میکروبی عصاره استخراج شده متمرکز بوده‌اند، در حالی‌که در رابطه با اثر روش استخراج بر نوع ترکیبات فنلی استخراج شده از برەموم منابع کمی در دسترس می‌باشد. لذا، در این پژوهش نه تنها به مطالعه برخی عوامل مؤثر بر راندمان استخراج ترکیبات فنلی برەموم با دو روش استخراج خیساندن و فراصوت پرداخته شده، بلکه بررسی تأثیر روش استخراج بر نوع ترکیبات فنلی استخراج و شناسایی شده از نمونه برەموم از اهداف اصلی این پژوهش است.

۲. مواد و روش‌ها

برەموم مربوط به منطقه شمال مشهد، از شرکت تعاونی زنبورداران خراسان رضوی- ایران تهیه شد. الکل اتیلیک با رتبه تجاری ۹۶٪ از شرکت تقطیر خراسان در ایران خریداری شد و با آب مقطر یون‌زدایی شده، اتانل ۷۰٪ از آن تهیه شد. معرف فولین-سی کالچیو و اسید گالیک و استانداردهای معتبر اسیدهای فنلی و فلاونوئیدهای رایج‌تر در برەموم برای کروماتوگرافی از شرکت سیگما-آلدریچ ساخت کشور آمریکا خریداری شدند.

۱.۲. آماده سازی برەموم

به منظور استخراج مواد مؤثره برەموم و تهیه عصاره الکلی آن، ابتدا برەموم توسط ازت مایع منجمد و با استفاده از آسیاب برقی از شرکت توس شکن خراسان مدل T8300 ساخت ایران، خرد و سپس پودر به‌دست آمده از الک با مش ۴۰ عبور داده شد. پودر

تهیه شده دور از نور و در دمای ۴ °C برای تهیه عصاره آن نگه‌داری شد [۳۱].

۲.۲. استخراج به روش خیساندن

متناسب با نسبت‌های مورد نظر ۱۰، ۳۰ و ۵۰٪w/v مقدار معینی از بره‌موم پودر شده به یک ارلن به ظرفیت ۵۰۰ mL منتقل و حجم معینی از اتانل ۷۰٪ به آن اضافه شد و در دمای محیط آزمایشگاه در حالی که توسط هم‌زن مغناطیسی دائماً هم-زده شد با حلال مخلوط و استخراج در مدت‌های مختلف ۲، ۸ و ۲۴ h انجام شد. برای جلوگیری از تبخیر و از اتلاف حلال در طول فرایند و نیز محافظت از مواد داخل ظرف در مقابل تابش نور دهانه و اطراف ارلن کاملا با فویل آلومینیمی پوشیده شد. مخلوط‌ها بعد از مدت اعمال شده، توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ و به کمک پمپ خلا دو بار صاف گردیدند. حذف حلال عصاره‌های الکلی به‌دست آمده در محل تاریک و در دمای آزمایشگاه انجام شد. عصاره‌های خشک به‌دست آمده برای استفاده‌های بعدی در ظرف شیشه‌ای تیره و در یخچال در دمای ۴ °C نگه‌داری شدند [۳۱].

۳.۲. استخراج به کمک فراصوت

برای استخراج ترکیبات فنلی به روش فراصوت، از دستگاه فراصوت شرکت Sonics & Material، مدل VCX750 ساخت کشور آمریکا، با بیشینه توان اسمی ۷۵۰ W و فرکانس ۲۰ kHz استفاده شد. به این منظور در ابتدا یک مخلوط همگن از بره‌موم پودر شده و اتانل ۷۰٪ تهیه شد که نسبت بره‌موم به حلال معادل ۳۰ ٪w/v بود و با استفاده از هم‌زن‌های معمولی آماده و در ادامه تحت امواج فراصوت قرار گرفت. اعمال فراصوت در مدت‌های صوت‌دهی ۷ min ,۱۴ ,۲۱ و نیز دامنه‌های نوسانی ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ ٪ در دمای محیط انجام شد. عصاره‌های به‌دست آمده از این روش نیز خشک و در دمای ۴ °C و دور از نور برای آزمون‌های بعدی نگه‌داری شدند [۱۳، ۲۰].

۴.۲. اندازه گیری ترکیبات فنلی

میزان ترکیبات فنلی کل بر اساس روش رنگ سنجی فولین-سی کالچیو و بر حسب اسیدگالیک اندازه‌گیری شد [۳۲، ۳۳]. به این منظور، ابتدا غلظت‌های مختلف اسید گالیک ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ mg/ mL تهیه و ۰/۵ mL از آن‌ها با ۲/۵ mL معرف فولین- سیوکالچو مخلوط و طی مدت ۰/۵ تا ۸ min، مقدار ۲ mL کربنات‌سدیم ۷/۵ ٪ w/v به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ min در دمای محیط نگه‌داری و سپس جذب نوری آن‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر Hach مدل DR5000 ساخت کشور آمریکا در طول موج ۷۶۰ nm خوانده و نمودار استاندارد رسم شد.

برای تعیین مقدار فنل تام نمونه‌های بره‌موم، مقدار ۰/۱ g از عصاره‌خشک‌شده بره‌موم در ۲۵ mL اتانل ۷۰٪ حل و سپس ۱ mL از محلول تهیه شده تا حجم ۵ mL رقیق‌سازی شد. مقدار ۰/۵ mL از محلول رقیق‌شده با ۲ mL کربنات‌سدیم و ۲/۵ mL معرف فولین- سیوکالچو مخلوط و به مدت ۸-۱ min در تاریکی نگه‌داری و سپس جذب آن در طول موج ۷۶۰ nm خوانده و مقدار ترکیبات فنلی بر حسب درصد اسیدگالیک در عصاره خشک محاسبه گردید [۳۲].

۵.۲. تعیین محتوی ترکیبات فنلی عصاره‌های بره‌موم به روش HPLC

جداسازی و شناسایی ترکیبات فنلی عصاره‌های بره‌موم مطابق با روش ملو به کمک دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا از شرکت Agilent مدل HPLC 1100 ساخت کشور آمریکا انجام شد که متصل به یک آشکارساز آرایه دیودی در ۲۶۰ nm بود. برای این منظور ۳۰۰ µL از هر محلول به دستگاه کروماتوگرام تزریق شد. فاز متحرک شامل آب: اسید استیک به نسبت ۱:۱۹ v/v به عنوان حلال A و متانل به عنوان حلال B با سرعت جریان ثابت ۱ mL/ min بود. گرادیان با ۳۰٪ حلال B شروع شد و با ۶۰٪ در ۴۵ min، ۷۵٪ در ۸۵ min، ۹۰٪ در ۹۵ min و بازگشت به ۳۰٪ در ۱۰۵ min ادامه پیدا کرد. دمای ستون در ۳۰ °C ثابت نگه داشته و پردازش کروماتوگرام‌ها با استفاده از نرم افزار رایانه کروماتوگرافی Chemstate از شرکت Agilent ساخت کشور آمریکا انجام گردید [۳۴].

۶.۲. تحلیل آماری

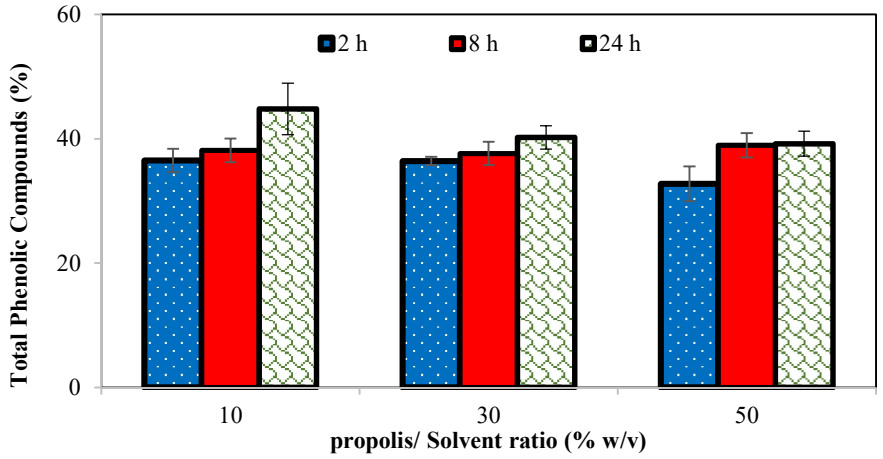
برای مطالعه اثر متغیرهای مورد نظر در هر روش استخراج از طرح کاملا تصادفی ساده در قالب فاکتوریل استفاده شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار مینی‌تب نسخه ۱۶.۲.۴

انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵٪، (p<۰/۰۵) انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۰ رسم شد. لازم به ذکر است که کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد.

۳. نتایج و بحث

۱.۳. استخراج ترکیبات فنلی

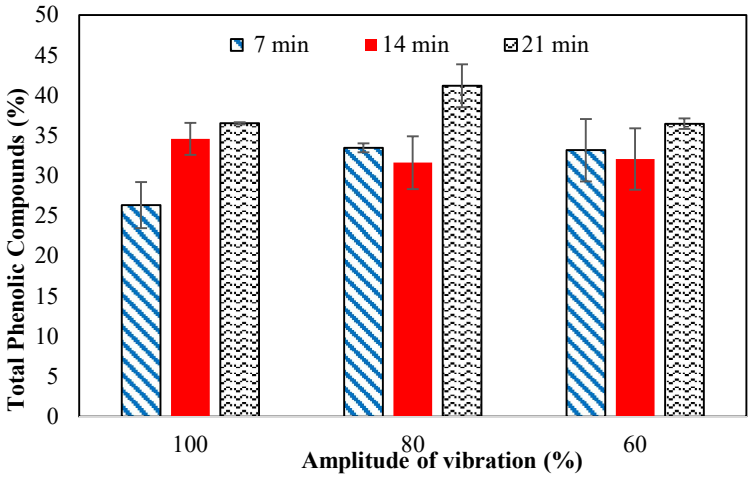
مقدار کل ترکیبات فنلی پارامتر مهمی برای ارزیابی کمی و ظرفیت بیولوژیکی محصول است [۳۵، ۳۶]. مقدار ترکیبات فنلی تعیین شده از استخراج به روش خیساندن در مدت‌های مختلف استخراج و نیز نسبت‌های مختلف برەموم به حلال اتانل در شکل (۱) نشان داده شده است. نتایج استخراج ترکیبات فنلی به روش خیساندن بیانگر این بود که افزایش نسبت برەموم به حلال سبب کاهش مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده می‌شود و از سوی دیگر افزایش مدت استخراج، سبب افزایش مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده می‌گردد. مقایسه میانگین داده‌ها حاکی از آن بود که در نسبت ۱۰ ٪w/v برەموم به حلال در مقایسه با نسبت‌های ۳۰ و ۵۰٪w/v ترکیبات فنلی بیش‌تری استخراج شده بودند. از سوی دیگر، طبق نتایج آماری، در نسبت ۱۰ ٪w/v برەموم به حلال تفاوت معنی‌داری میان مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده در مدت ۲ و ۸ h نسبت به مدت استخراج ۲۴ h وجود دارد (p<۰/۰۵). در حالی‌که در نسبت‌های بالاتر برەموم به حلال یعنی ۳۰ و ۵۰ ٪w/v مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده در مدت ۸ h نسبت به‌مدت استخراج ۲۴ h تفاوت معنی‌دار ندارند (p>۰/۰۵). بر این اساس، در استخراج ترکیبات فنلی به روش خیساندن، تحت شرایط به‌کار برده شده، بیش‌ترین مقدار ترکیبات فنلی در عصاره برەموم در مدت استخراج ۲۴ h و با نسبت ۱۰w/v٪ برەموم به حلال به مقدار ۴۴/۸۲٪ به‌دست آورده شد و به طور معنی‌داری از دیگر غلظت‌های تعیین شده در شرایط زمانی و غلظتی متفاوت بود (p<۰/۰۵). در حالی‌که کم‌ترین مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده در مدت ۲ h و در نسبت ۵۰ w/v٪ برەموم به حلال به مقدار ۳۲/۷۸٪ تعیین شد. این نتایج قابل مقایسه با یافته‌های دیگر محققین است [۹۷-۳۷]. دیاز و همکاران نشان دادند که نمونه‌های برەموم مربوط به سرزمین‌های گرم، محتوای فنلی و فلاونوئیدی بیش‌تر از ۲۳٪ داشتند [۳۶]. توسی و همکاران ترکیبات فنلی کل از عصاره اتانلی برەموم از نقاط مختلف آرژانتین که به روش خیساندن در مدت یک هفته تهیه شده بود را بررسی کرده و مقدار آن را در محدوده ۸/۴۱ تا ۳۲/۳۱ ٪w/w گزارش کردند [۴۰]. آن‌ها نتیجه گرفتند که هرچه مدت خیساندن افزایش یابد، درصد ترکیبات استخراج شده نیز بیش‌تر می‌شود. از سوی دیگر، تروشوا و همکاران مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده به روش خیساندن را بر روی نسبت‌های مختلف برەموم به حلال اتانل بررسی کردند و دریافتند که وقتی که نسبت‌های حلال/ برەموم ۱:۱۰ w/v یا بیش‌تر است بازدهی استخراج بسیار بالا است. آن‌ها مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده به روش خیساندن در نسبت‌های ۱:۱۰ و ۱:۲۰ w/v حلال/ برەموم به ترتیب معادل ۴۳ و ۴۴٪ گزارش کردند [۲۰].



شکل (۱) مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده از روش خیساندن در مقابل نسبت‌های مختلف برەموم به حلال، و در مدت‌های مختلف استخراج

Fig. 1. The amount of extracted phenolic compounds from the maceration method against different ratios of propolis/ solvent, and various times of extraction

در شکل (۲) مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده از روش اعمال فراصوت در نسبت w/v ۳۰٪ برەموم به حلال به صورت تابعی از مدت صوت‌دهی و دامنه نوسان نشان داده شده است. مقایسه میانگین داده‌های حاصل از روش استخراج فراصوت نشان می‌دهد که در مدت min ۲۱ مقدار ترکیبات استخراج شده در تمامی دامنه‌های فرکانسی بیش‌تر از مدت‌های ۱۴ و min ۷ به‌دست آمد. تروشوا و همکاران مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده برەموم را به روش فراصوت در مدت‌های مختلف صوت دهی ۱۰ و min ۳۰ بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که مدت min ۳۰ صوت دهی برای استخراج ترکیبات فنلی مناسب می‌باشد. بر این اساس مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده از برەموم در مدت ۱۰ و min ۳۰ به ترتیب ۳۵/۹ و ۵۰٪ به‌دست آمد [۲۰]. سانپا و همکاران به کمک فراصوت عصاره‌های اتانلی نمونه‌های برەموم تایلند را در مدت‌های min ۶۰-۱۵ استخراج کردند و بر اساس فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های به‌دست آمده دریافتند که بهترین خاصیت ضد میکروبی مربوط به مدت‌های استخراج ۱۵ و min ۳۰ می‌باشد. این گروه مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده را بین mg /g ۱۴/۰۷-۷/۱۳ گزارش کردند [۱۳]. از سوی دیگر، بررسی اثر تغییر دامنه فرکانسی موج فراصوت بر مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده، نشان داد که در مدت min ۱۴ مقدار ترکیبات استخراج شده در دامنه‌های فرکانسی ۶۰ و ۸۰٪ کم‌تر از دامنه فرکانسی ۱۰۰٪ به‌دست آمد ولی تفاوت‌ها معنی‌دار نبودند (P>۰/۰۵). بر اساس شکل ۲، مقدار ترکیبات استخراج شده در مدت min ۷ برای دامنه‌های فرکانسی ۶۰ و ۸۰٪ به طور معنی داری بیش‌تر از مقدار آن در دامنه فرکانسی ۱۰۰٪ بود. حسین و همکاران نشان دادند که با افزایش دامنه موج مقدار پلی‌فنل‌های فرار آنتی اکسیدانی کارنوسیک اسید و کارنوسول افزایش معنی-داری (P<۰/۰۵) می‌یابد. استخراج اسید کارنوسیک از رزماری با افزایش دامنه موج فراصوت نیز افزایش یافت [۲۵, ۴۱]. اگرچه که انتظار می‌رود با افزایش دامنه فرکانس نیروی برشی بیش‌تری ایجاد شده و لذا تخریب سلولی و استخراج با راندمان بالاتر را سبب شود، اما روند مشخصی برای اثر دامنه‌های فرکانسی در این تحقیق مشاهده نمی‌گردد. به‌طور کلی به نظر می‌رسد که اثر اعمال دامنه‌های فرکانسی مختلف در استخراج ترکیبات فنلی برەموم تا سطح ۸۰٪ مناسب باشد. در این رابطه، برخی منابع گزارش کرده‌اند که دامنه‌های بالاتر از ۸۰٪ احتمالا سبب شکست و یا تغییرات ساختاری در برخی از محتویات مولکولی شده و این امر سبب کاهش راندمان استخراج گردد [۲۰, ۲۶-۲۸]. بر اساس داده‌های حاصل از استخراج ترکیبات فنلی به کمک فراصوت کم-ترین مقدار استخراج شده در مدت min ۷ صوت‌دهی با دامنه نوسانی ۱۰۰٪ معادل ۲۶/۳۴٪ به‌دست آورده شد و بیش‌ترین مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده از روش فراصوت در مدت min ۲۱ و با دامنه نوسانی ۸۰٪ با مقداری حدود ۴۱/۱۹٪ به‌دست آمده است. این مقدار قابل مقایسه با درصد ترکیبات فنلی استخراج شـــده از روش خیساندن با نسبت برەموم به حـلال w/v ۳۰ و در مدت h ۲۴ است که معادل w/v ۴۰/۲۲٪ به‌دست آمده و تنها به مقدار ۱٪ بیش‌تر می‌باشد.



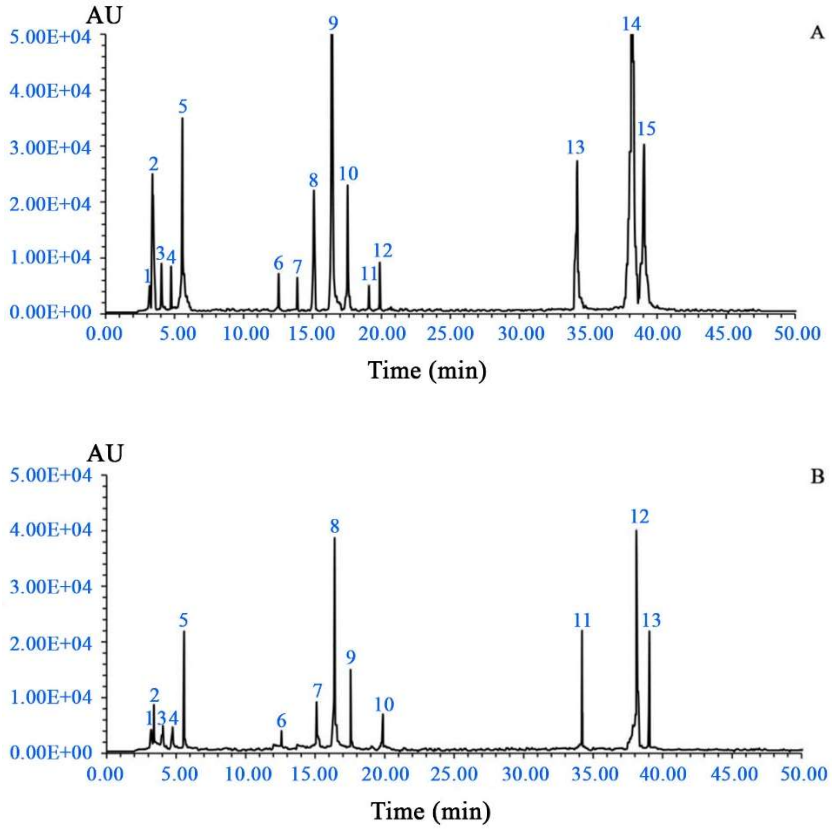
شکل (۲) ترکیبات فنلی کل استخراج شده به کمک فراصوت به صورت تابعی از مدت و دامنه نوسان

Fig. 2. Total phenolic compounds extracted by ultrasound as a function of time and amplitude.

۲.۳. تعیین ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی با HPLC

به منظور تعیین اثر روش استخراج بر نوع و مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده، دو نمونه از عصاره‌های استخراج شده به روش‌های خیساندن و فراصوت را که دارای بیش‌ترین مقدار درصد استخراج بودند برای کروماتوگرافی HPLC انتخاب کرده و جداسازی و شناسایی ترکیبات این دو عصاره انجام شد. شکل (۳) کروماتوگرام ترکیبات فنلی جداسازی و شناسایی شده از عصاره بره‌موم حاصل از استخراج را به روش‌های خیساندن و فراصوت نشان می‌دهد. مقایسه نتایج کروماتوگرافی HPLC نشان داد که روش استخراج خیساندن موجب استخراج تعداد ترکیبات بیش‌تری از بره‌موم شده است. تعداد ترکیبات استخراج شده از بره‌موم در روش خیساندن شامل ۱۵ ترکیب بود در حالی که در روش فراصوت ۱۳ ترکیب شناسایی شدند که در جدول (۱) نام آن‌ها درج شده است. این تفاوت در تعداد به وجود پیک‌های ترکیبات کئورستین- ۳- متیل- اتر، پیک شماره ۷، و کامفرول، پیک شماره ۱۱، در عصاره به‌دست آمده از روش خیساندن مربوط می‌شود که فقدان آن‌ها در عصاره حاصل از استخراج به روش فراصوت مشاهده گشت (شکل۳ و جدول ۱). بر اساس داده‌های کروماتوگرافی HPLC و آنالیز نرم‌افزار آن، مقدار کل ترکیبات فنلی شناسایی شده در کروماتوگرام عصاره حاصل از روش استخراج خیساندن ۱۱/۷۳۷ μg/mL گزارش شد در حالی‌که برای ترکیبات فنلی شناسایی شده در عصاره تهیه شده از استخراج به کمک فراصوت مقدار ۴۶۲ μg/mL /۷ به‌دست آمد.

هم‌چنین، بر اساس داده‌های به‌دست آمده از HPLC غلظت ترکیبات جداسازی و شناسایی شده با کروماتوگرافی بر حسب درصد محاسبه شد. نتایج بیانگر این مطلب بود که درصد هر یک از ترکیبات شناسایی شده در عصاره استخراج شده به روش فراصوت بیشتر از ترکیبات مشابه در عصاره استخراج شده به روش خیساندن می‌باشند. جدول (۲) اولین پنج ترکیب فنلی و فلاونوئیدی از این دو عصاره را نشان می‌دهد که دارای بالاترین غلظت بودند. مشاهده می‌گردد که بیشترین درصد استخراج در هر دو عصاره مربوط به پینوسمبرین، پیک شماره ۱۴، می‌باشد که در روش استخراج به کمک فراصوت و روش خیساندن به ترتیب مقادیر ۱۵/۱۳ و ۱۱/۷۰٪ به‌دست آمد.



شکل (۳) HPLC کروماتوگرام ترکیبات فنلی عصاره بره‌موم حاصل از استخراج به روش: a) خیساندن و b) فراصوت

Fig. 3. HPLC chromatogram of phenolic compounds of propolis extract obtained by extraction of: a) maceration and b) Ultrasound methods

جدول (۱) ترکیبات فنلی شناسایی شده در عصاره‌های بره‌موم حاصل از دو روش استخراج خیساندن و فراصوت بر اساس کروماتوگرام HPLC.

Table 1 The phenolic compounds detected in propolis extracts obtained by two methods of maceration and ultrasound extraction based on HPLC chromatogram.

روش خیساندن Maceration شماره پیک Peak No.	فراصوت Ultrasound شماره پیک Peak No.	ترکیب فنلی Phenolic compound
1	1	اسید گالیک Gallic acid
2	2	کافئیک اسید Caffeic acid
3	3	کاتکین Catechin
4	4	اپی کاتکین Epicatechin
5	5	اسید فرولیک Ferulic acid
6	6	کئورستین Quercetin
7	-	کئورستین- ۳- متیل- اتر Quercetin-3-methyl-ether
8	7	اسید کوماریک Coumaric acid
9	8	نارنجنین Naringenin
10	9	آپی جنین Apigenin
11	-	کامفرول Kaempferol
12	10	لوتئولین Luteolin
13	11	کرایسین Chrysin
14	12	پینوسمبرین Pinocembrin
15	13	گالانجین Galangin

جدول (۲) بیش‌ترین ترکیبات فنلی شناسایی شده از عصاره‌های بره‌موم حاصل از دو روش استخراج خیساندن و فراصوت بر اساس نتایج HPLC.

Table 2 The most phenolic compounds detected from propolis extracts obtained by two methods of maceration and ultrasound extraction based on HPLC chromatography results.

روش خیساندن Maceration			فراصوت Ultrasound		
ترکیب فنلی Phenolic compound	شماره پیک Peak No.	غلظت Concentration (%)	ترکیب فنلی Phenolic compound	شماره پیک Peak No.	غلظت Concentration (%)
پینوسمبرین Pinocembrin	14	11.7	پینوسمبرین Pinocembrin	12	15.1
نارنجنین Naringenin	9	11.1	نارنجنین Naringenin	8	14.4
اسید فرولیک Ferulic acid	5	7.7	کرایسین Chrysin	11	11.0
گالانجین Galangin	15	7.1	اسید فرولیک Ferulic acid	5	10.8
کرایسین Chrysin	13	6.7	گالانجین Galangin	13	10.7

دیگر ترکیبات شناسایی شده نیز روند مشابهی را به لحاظ درصد جداسازی و شناسایی شده نشان دادند. نارنجنین، پیک شماره ۹، که به لحاظ مقداری دومین ترکیب موجود در عصاره برەموم بود نیز دارای مقادیر ۱۴/۴۰ و ۱۱/۱۰٪ به ترتیب از عصاره‌های استخراج شده به روش فراصوت و روش خیساندن به‌دست آمد. ردیف سوم به لحاظ مقدار در روش فراصوت مربوط به کرایسین با ۱۱٪ استخراج به‌دست آمد در حالی‌که در روش خیساندن کرایسین، پیک شماره ۱۳، در رتبه پنجم با ۶/۷٪ قرار گرفت. در مراتب بعدی استخراج به کمک فراصوت، یعنی ردیف چهارم و پنجم، اسید فرولیک، پیک شماره ۵، و گالانجین، پیک شماره ۱۵، با درصدهای ۱۰/۸۰ و ۱۰/۷۰٪ قرار گرفتند و در مقابل، در عصاره استخراج شده به روش خیساندن دو ترکیب اسید فرولیک و گالانجین در ردیف‌های سوم و چهارم و با درصدهای ۷/۷۰ و ۷/۱۰٪ قرار گرفتند. یانگ و همکاران از روش استخراج به کمک فراصوت عصاره‌های برەموم چینی را استخراج کردند و به کمک کروماتوگرافی HPLC ترکیبات فنلی با خاصیت آنتی اکسیدانی استخراج شده را جداسازی و شناسایی نمودند. بر اساس داده‌های آن‌ها ترکیب‌های شناسایی شده به ترتیب بیش-ترین مقدار بازیابی شده عبارت از گالانجین mg/g ۲/۷۸۵، لوتئولین mg/g ۱/۱۷۰، جنستئین mg/g ۰/۸۴۴، کئورستین mg/g ۰/۶۴۳، روتین mg/g ۰/۳۹۸ و کورکومین mg/g ۰/۰۱۴ بودند [۴۲]. کوسالک و همکاران عصاره اتانلی برەموم از ناحیه آدریاتیک کرواسی را به روش HPLC مورد بررسی قرار دادند. این گروه با فلاونوئیدهای پینوسمبرین، اسیدکافئیک، گالانجین، و کرایسین را آنالیز کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که فلاونوئید غالب در تمامی نمونه‌ها پینوسمبرین است و مقدار آن از ۶/۱۴-۰/۰۳٪ گزارش شد. بر اساس یافته‌های این گروه نمونه‌های برەموم مناطق مختلف کرواسی محتوای فلاونوئیدهای کرایسین، پینوسمبرین، نارنجنین و گالانجین تفاوت قابل ملاحظه‌ای نداشتند اما در مقدار اسیدکافئیک متفاوت بودند [۴۳]. اونق و همکاران مقدار ترکیبات فلاونوئیدی کل عصاره الکلی برەموم را به روش کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی اندازه‌گیری کردند و مقدار آن را ۲۶/۲۴ درصد گزارش کردند. آن‌ها خواص ضدقارچی این ترکیب را به ترکیبات فلاونوئیدی و اسید سینامیک موجود در نمونه‌ها مربوط دانستند [۴۴]. هم‌چنین، بروسچی و همکاران روشی بر پایه HPLC و آشکارساز فرابنفش برای تعیین مقدار ترکیبات موجود در عصاره برەموم توسعه داد [۸]. بر اساس روش آن‌ها ناحیه خطی جواب‌ها بر پایه سنجش کرایسین در محدوده mg/mL ۲/۴۰- ۰/۲۴ قرار می‌گرفت و نتایج بیانگر صحت، دقت و کارایی روش آن‌ها بود. ولپی و همکاران عصاره‌های اتانلی برەموم از کشورهای مختلف را به روش هم‌زمانی HPLC و یونش الکترون‌پاشش ترکیب شده با اسپکتروسکوپی جرمی بررسی کردند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که برەموم کشورهای آرژانتین، ایتالیا و اسپانیا دارای بیش‌ترین مقدار پینوسمبرین به ترتیب ۴۹، ۴۸ و ۳۹٪ از کل فلاونوئید شناسایی شده و مقادیر مشابه دیگر اجزا می‌باشد. در حالی‌که برای نمونه‌های برەموم کشورهای چین، آذربایجان و اتیوپی بیش-ترین مقدار پینوسمبرین در آن‌ها به ترتیب ۶۳، ۴۶ و ۶۲٪ به‌دست آمد اما نمونه چین فاقد جنیستئین، کامفرول، آپی‌جنین، و کرایسین، نمونه آرژانتین فاقد جنستئین، کامفرول، آکاستین و کرایسین و نمونه اتیوپی فاقد کامفرول و آکاستین بودند [۴۵].

۴. نتیجه‌گیری

مقدار ترکیبات فنلی موجود در عصاره اتانلی برەموم استخراج شده به روش فراصوت و هم‌چنین به روش خیساندن با طولانی کردن مدت فرایند افزایش یافت. بر این اساس، بهترین راندمان استخراج ترکیبات فنلی به روش خیساندن در مدت h ۲۴ و در روش استخراج به کمک فراصوت در مدت min ۲۱ به‌دست آمد. بنابراین به نظر می‌رسد عامل مدت استخراج صرف‌نظر از نوع روش به‌کار برده شده عاملی مهم و بسیار اثرگذار بر راندمان و کیفیت مواد استخراج شده باشد. داده‌های حاصل از روش‌های استخراج نشان داد که مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده در عصاره اتانلی برەموم بستگی به روش استخراج و شرایط اعمال شده در آن روش دارد از جمله این‌که، در حالی‌که نسبت بیش‌تر حلال به برەموم برای استخراج به روش خیساندن سبب افزایش بیش‌تر ترکیبات فنلی در عصاره برەموم گردید، در استخراج به کمک فراصوت افزایش دامنه فرکانسی موج فراصوت تا ۸۰٪ به استخراج بیش‌تر ترکیبات فنلی منجر شد. بنابراین، بسته به نوع امکانات و کاربرد ترکیبات استخراج شده می‌توان از هریک از این روش‌ها در شرایط بهینه استفاده کرد. هم‌چنین نتایج کروماتوگرافی HPLC نشان داد که اگرچه تعداد ترکیبات استخراج شده به روش خیساندن بیش‌تر از روش فراصوت بود،

لیکن درصد هر یک از ترکیبات فنلی استخراج شده از روش فراصوت بیش‌تر از مقدار استخراج شده همان ترکیب به روش خیساندن به‌دست آمد. این مطلب به این معنی می‌تواند باشد که روش استخراج به کمک فراصوت انتخابی‌تر عمل می‌کند ضمن این‌که استخراج در مدتی کوتاه‌تر و با مقدار کم‌تری از حلال صورت می‌گیرد.

منابع

[1] Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.*, 117, 426-436.

[2] Bankova, V.S., Castro, S.L.d., and Marcucci, M.C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie, 3, 3-15.

[3] Hanifi S., Ahmadi S., and Oromiehei A., (2013). Mechanical Properties and Biodegradability of Polypropylene/Starch Reinforced Nanoclay Blends. *Iranian Journal of Polymer Science and Technology*, 26, 139 - 148.

[4] Chang, Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M,. Chern, J.C., (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J. Food Drug Anal.,* 10, 178-182.

[۵] اشراقی، س.س.؛ والافر، ش.؛ (۱۳۸۲) بررسی اثرات ضدباکتریایی بره‌موم (Propolis) کندوی عسل بر گونه‌های بیماریزای نوکاردیا. *مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید صدوقی یزد*، جلد ۱۱، شماره ۲، ص ۴۸-۴۲.

[6] Khayyal, M.T., el-Ghazaly M.A., el-Khatib A.S., Hatem A.M., de Vries P.J., el-Shafei S., Khattab M.M. (2003). A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. *Fund. Clin. Pharmacol.*, 17, 93-102.

[7] Pastor, C., Sanchez-Gonzalez, L., Chafer, M., Chiralt, A., Gonzalez-Martinez, C., (2010). Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. *Carbohyd. Polym*., 82, 1174-1183.

[8] Bruschi, M.L., Franco, S.L., and Gremião, M.P.D. (2003). Application of an HPLC Method for Analysis of Propolis Extract. J. Liq. *Chromatogr. R. T.*, 26, 2399-2409.

[9] González-Martín, M.I., Escuredo, O., Revilla, I., Vivar-Quintana, A. M., Coell, M. C., Riocerezo, C. P., and Moncada, G. W. (2015). Determination of the Mineral Composition and Toxic Element Contents of Propolis by Near Infrared Spectroscopy. *Sensors*, 15, 27854-27868.

[10] Tosi, E.A., Re´, E., Ortega, M. E., Cazzoli, A. F. (2007). Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon Escherichia coli. *Food Chem.*, 104, 1025-1029.

[11] Kumazawa, S., Hamasaka, T., and Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.*, 84, 329-339.

[12] Sanpa, S., Sutjarittangtham, K., Tunkasiri, T., Eitssayeam, S., Chantawannakul, P. (2012). Antimicrobial Effect of Brazillian Propolis/Polycaprolactone Polymer on some Human Pathogenic Bacteria. *Adv. Mat. Res.*, 506, 537-540.

[13] Sanpa, S., Sutjarittangtham, K., Tunkasiri, T., Eitssayeam, S., Chantawannakul, P. (2012). Ultrasonic Extraction of Thai Propolis for Antimicrobial and Antioxidant Properties. *Adv. Mat. Res*., 506, 371-374.

[14] Alvarez, M.V., Ponce, A. G., Goyeneche, R., and Moreira, M. R. (2017). Physical Treatments and Propolis Extract to Enhance Quality Attributes of Fresh-Cut Mixed Vegetables. *J. Food Process. Pres*., 41, e13127.

[15] Toepfl, S., Toepfl, S., Mathys, A., Heinz, V. & Knorr, D. (2006). Review: Potential of High Hydrostatic Pressure and Pulsed Electric Fields for Energy Efficient and Environmentally Friendly Food Processing. *Food Rev. Int*., 22, 405-423.

[16] Pellati, F., Prencipe, F. P., Bertelli, D., Benvenuti, S. (2013). An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 81-82, 126-132.

[17] Kaufmann, B. and Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. Phytochem. *Analysis,* 13, 105-13.

[18] Marr, R. and Gamse, T. (2000). Use of supercritical fluids for different processes including new developments—a review. *Chem. Eng. Process*., 39, 19-28.

[19] Lang, Q. and Wai, C. M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - a

practical review. *Talanta*, 53, 771-782.
[20] Trusheva, B., Trunkova, D., and Bankova, V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Cent. J.*, 1, 1-4.
[21] Kubiliene, L., Laugaliene, V., Pavilonis, A., Maruska, A., Majiene, D., Barcauskaite, K., Kubilius, R., Kasparaviciene, G., Savickas, A. (2015). Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. BMC Complem. *Altern. M.*,. 15, 156-162.
[22] Herrera, M.C. and de Castro, M.D. (2005). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A*, 1100, 1-7.
[23] Li, H., Pordesimo, L., and Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Res. Int.*, 37, 731-738.
[24] Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. Innov. *Food Sci. Emerg*., 9, 161-169.
[25] Vinatoru, M., (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrason. *Sonochem.*, 8, 303-313.
[۲۶] پورفرزاد، ا.؛ حدادخداپرست، م. ح.؛ حبیبی نجفی، م . ب.؛ حسن زاده خیاط ، م.؛ (۱۳۹۲) کارایی امواج فراصوت در استخراج فروکتان از غده سریش با استفاده از طرح باکس بنکن؛ *پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی*، جلد ۲، شماره ۳، ص ۲۲۸-۲۱۹.
[۲۷] شلماشی، ا.؛ امانی، ف.؛ (۱۳۹۴) کاربرد سطح پاسخ در بهینه سازی استخراج روغن از مغز گردو و هسته میوه انبه با استفاده از امواج فراصوت. *فناوری‌های نوین غذایی*، جلد ۳، شماره ۲، ص ۱۰-۱.
[۲۸] روحانی، ر.؛ عین افشار، س.؛ و احمدزاده، ر.؛ (۱۳۹۴) استخراج ترکیبات آنتوسیانینی و آنتی اکسیدانی پرچم گل زعفران به کمک فناوری امواج فراصوت. *پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران*، جلد ۲، شماره ۱۱، ص ۱۷۰-۱۶۱.
[29] De Lima, G.G., de Souza, R. O., Bozzi, A. D., Poplawska, M. A., Devine, D. M., Nugent, M. J. (2016). Extraction Method Plays Critical Role in Antibacterial Activity of Propolis-Loaded Hydrogels. *J. Pharm. Sci.*, 105, 1248-57.
[30] Biscaia, D. and Ferreira, S.R.S. (2009) Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. *J. Supercrit. Fluid*., 51, 17-23.
[31] Popova, M., Silici, S., Kaftanoglu, O., Bankova, V. (2005). Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, 12, 221-228.
[32] Lima, B., Tapia, A., Luna, L., Fabani, M. P., Schmeda-Hirschmann, G., Podio, N. S., Wunderlin, D. A., Feresin, G. E. (2009). Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the Province of San Juan (Argentina). *J. Agr. Food Chem*., 57, 2691-2698.
[33] Association of Official Analytical, C. and Helrich, K. (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists., Arlington, VA: The Association.
[34] Mello, B.C.B.S., Petrus, J.C.C., and Hubinger, M.D. (2010). Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *J. Food Eng*., 96, 533-539.
[35] Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, J. A., Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 3482-3485.
[36] Dias, L.G., Pereira, A.P., and Estevinho, L.M. (2012). Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food Chem. Toxicol.*, 50, 4246-4253.
[37] Choi, Y.M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H.J., Kim, K.M., Kim, J.M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT Food Sci. Technol.,* 39, 756-761.
[38] Da Silva, Carmen, F.C., Favaro-Trindade, S., de Alencar, S. M., Thomazini, M.,and Balieiro, J. C. C. (2011). Physicochemical properties, antioxidant activity and stability of spray-dried propolis. 3, 94-100.
[39] Woisky, R.G. and Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. J. Apicult. Res., 37, 99-105.
[40] Tosic, S., Stojanovic, G., Mitic, S., Pavlovic, A., Alagic, S. (2017). Mineral Composition of Selected Serbian Propolis Samples. 61.
[41] Hossain, M.B., Brunton, N.P., Patras, A,. Tiwari, B., O'Donnell, C.P., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C. (2012). Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (Origanum majorana L.) using response surface methodology. Ultrason. *Sonochem*., 19, 582-590.
[42] Yang, L., Yan, Q.H., Ma, J.Y., Wang, Q., Zhang, J.W., and Xi, G.X. (2013). High Performance Liquid Chromatographic Determination of Phenolic Compounds in Propolis. Tropical *J. Pharmaceut. Res.*, 12, 771-776.
[43] Kosalec, I., Bakmaz, M., and Pepeljnjak, S. (2003). Analysis of propolis from the continental and Adriatic regions of Croatia. *Acta Pharm*., 53, 275-85.

[۴۴] اونق، ع.؛ توکمه‌چی، ا.؛ ادیب حسامی، م.؛ ابراهیم‌زاده، س.؛ (۱۳۸۹) مطالعه تاثیر عصاره الکلی بره‌موم (پروپولیس) حاصل از کندوهای زنبور عسل آذربایجان غربی علیه رشد قارچ‌های درماتوفیت و غیر درماتوفیت و آنالیز ترکیبات سازنده آن با روش GC-MS. مجله پزشکی ارومیه، جلد ۲۱، شماره ۳، ص ۲۱۴-۲۰۶.

[45]Volpi, N. and Bergonzini, G. (2006). Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry. *J. Pharmaceut. Biomed*., 42, 354-361.