



مقاله پژوهشی

بررسی پیش فرآیند برگ چای سیاه با امواج میکروویو و فراصوت برای استخراج ترکیبات مؤثره

انور شلماشی^{۱*}، فاطمه امانی^۲

۱. دانشیار، گروه شیمی آلی، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
 ۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیمی آلی، دانشکده شیمی، مجتمع پیامبر اعظم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز

(تاریخ دریافت: ۹۹/۶/۲۲، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۹/۷/۲۴، تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۲۰)

چکیده

در مطالعه حاضر اثر دو روش پیش فرآیند شامل تابش‌دهی با امواج میکروویو و فراصوت، بر درصد وزنی بازدهی استخراج ترکیبات مؤثره از نمونه پودر برگ چای سیاه (*Camelia Sinensis*) در روش استخراج متوالی با حلال طی سه مرحله استخراج با آب مقطر مقایسه شد. حداکثر درصد بازدهی استخراج از نمونه چای پیش فرآیند نشده، در استخراج متوالی با حلال در شرایط بهینه (مدت زمان ۱۳۵ min، دمای ۶۵°C و نسبت حلال به جامد ۲۵ ml/g) مقدار 24.53 ± 0.28 w/w به دست آمد. در پیش فرآیند با امواج میکروویو، نمونه پودر برگ چای بعد از ۸۰ min خیساندن در آب مقطر در دمای محیط، ۱ min با امواج میکروویو در توان ۶۰۰ w مورد تابش‌دهی قرار گرفت. حداکثر درصد بازدهی از این نمونه توسط روش استخراج متوالی با حلال در شرایط بهینه (زمان ۹۰ min، دمای ۴۰°C و نسبت حلال به جامد ۲۰ ml/g) مقدار 37.06 ± 0.34 w/w به دست آمد. در پیش فرآیند با امواج فراصوت، نمونه پودر برگ چای در یک شرایط متوسط (مدت زمان ۱۰ min در شدت امواج ۷۰٪ و پالس ۰/۷ S) با امواج فراصوت مورد تابش‌دهی قرار گرفت. حداکثر درصد بازدهی از این نمونه توسط روش استخراج متوالی با حلال در شرایط بهینه (زمان ۱۰۸ min، دمای ۵۵°C و نسبت حلال به جامد ۱۸ ml/g) مقدار 31.47 ± 0.38 w/w به دست آمد. هر دو روش پیش فرآیند، تأثیر به‌سزایی در افزایش درصد بازدهی و متعادل کردن شرایط در استخراج متوالی با حلال داشتند؛ ضمن اینکه پیش فرآیند با امواج میکروویو مؤثرتر از پیش فرآیند با امواج فراصوت بود. درصد بازدهی دست آمده در روش‌های ترکیبی بود اما مقدار ترکیبات فنولی کل و ایزوفلاونوئیدی در عصاره حاصل به روش سوکسله از مقدار آن در عصاره‌های به دست آمده با روش‌های بررسی شده در این مطالعه کمتر بود.

کلید واژه‌ها: برگ چای سیاه، استخراج متوالی با حلال، پیش فرآیند با امواج میکروویو، پیش فرآیند با امواج فراصوت، ترکیبات فنولی، ترکیبات فلاونوئیدی

۱. مقدمه

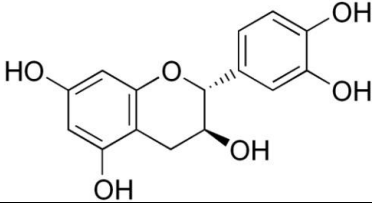
چای با نام علمی *Camellia Sinensis* گیاهی از خانواده *Theaceae* و بومی آسیای جنوب شرقی است. این گیاه به صورت درختچه‌ای همیشه سبز با شاخه‌هایی منشعب و با ارتفاعی در حدود ۱/۵ m است که در بسیاری از مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر در جهان قابلیت کشت دارد [۱،۲]. دم کرده این گیاه با نام چای، یک نوشیدنی محبوب و مفید با قدمت چند هزار ساله در جهان است. مصرف این دمنوش در بین حدود دو سوم از مردم جهان رایج است و به عبارت دیگر بعد از آب محبوب‌ترین نوشیدنی محسوب می‌شود [۳-۵]. برگ‌های چای حدوداً حاوی ۲/۵ تا ۴٪ کافئین است و به این دلیل چای یک نوشیدنی محرک محسوب می‌شود [۶]. چهار نوع نوشیدنی مشهور چای در جهان وجود دارد که همگی آنها از همان برگ گیاه چای به دست می‌آیند و تفاوت آنها با یکدیگر در نوع فرآیند نمودن برگ چای است [۷، ۸]. چای سیاه به عنوان یک نوشیدنی محبوب و رایج از طریق اکسایش و تخمیر کامل برگ چای به دست می‌آید. فرآیند اکسایش سبب افزایش مقدار ترکیبات معطر در چای می‌شود [۹]. فرآیند کلی و اصلی برای تهیه این نوع چای شامل چهار مرحله است. مرحله اول مرحله پژمرده کردن برگ‌ها است که این کار جهت منعطف کردن و تا حدودی کاهش محتوای آب موجود در برگ‌ها صورت می‌گیرد. مرحله دوم عبور دادن غلطک‌ها از روی برگ‌ها جهت آزادسازی آنزیم‌ها و خارج‌سازی شیرابه برگ‌ها است. در این مرحله تا حدودی دیواره سلول‌ها از هم گسیخته می‌شود و با آزادسازی محتویات شیمیایی، غذایی و دارویی و ترکیب شدن آنها با آنزیم‌های اکسید کننده آزاد شده از چای، فرآیند تخمیر در چای شروع می‌شود که در نهایت سبب تشکیل ترکیبات شیمیایی مسبب عطر، طعم و رنگ در دم کرده چای می‌شود. مرحله سوم فرآیند تکمیل تخمیر و اکسایش برگ‌ها است که از طریق قرار دادن آنها در مجاورت هوا انجام شود و مرحله آخر مرحله خشک کردن برگ‌ها در آون از طریق جریان هوای گرم بر روی آنها است [۱۰]. خواص دم کرده چای سیاه نظیر خواص

ضد باکتریایی، ضد ویروسی، آنتی‌اکسیدانی، ضد جهش^۱ از جمله فواید مهم این نوشیدنی برای سلامتی است [۹،۱۱]. مصرف دم نوش چای سیاه برای بهبود وضعیت ایمنی بدن، سلامت دهان و دندان، بهبود جریان خون مؤثر است [۱۲]. مصرف منظم سه الی چهار لیوان چای در روز می‌تواند ریسک ابتلا به بیماری‌های قلبی و از جمله بروز سکت را کاهش دهد [۱۳]. مقدار ترکیبات با خواص زیستی در چای مانند سایر گیاهان، تابع عوامل مختلفی نظیر منطقه رویش، شرایط کشت، کیفیت فرآیند نمودن چای و چگونگی نگهداری آن است. کاتچین‌ها اصلی‌ترین ترکیبات زیستی در چای تازه و چای سبز هستند که در طی فرآیند تخمیر، عمدتاً به دلیل اکسیده شدن و پلیمریزه شدن به رنگدانه‌های زرد-نارنجی تبدیل می‌شوند [۱۶-۱۴،۶]؛ بنابراین مقدار این ترکیبات در چای سیاه کمتر از چای سبز است. چهار مشتق اصلی کاتچین‌ها در چای سیاه و ساختار کلی آنها در جدول (۱) آورده شده است [۱۷].

شیوه‌های مناسب برای استخراج ترکیبات زیستی از گیاهان، روش‌هایی است که سبب تخریب ترکیبات مفید زیستی در گیاه نشوند، سریع و مؤثر باشند و حداقل مصرف انرژی را داشته باشند. استفاده از امواج میکروویو برای سرعت و سهولت بخشیدن به استخراج ترکیبات زیستی از گیاهان، روش بسیار مؤثری است. تأثیر این روش در سرعت بخشیدن به استخراج، از طریق برهمکنش امواج میکروویو با آب درون سلول صورت می‌گیرد [۲۰-۱۸]. این برهمکنش حرارت فوق‌العاده‌ای را در سلول ایجاد می‌کند که سبب تبخیر آب موجود در سلول و ایجاد تورم و فشار در داخل سلول می‌شود که در نهایت سبب شکست دیواره سلول و رها شدن ترکیبات مؤثره آن می‌شود. روش مؤثر دیگر برای سرعت بخشیدن به استخراج، استفاده از امواج فراصوت است. استفاده از امواج فراصوت نیز از روش‌های نوین استخراج محسوب می‌شود. در این روش انتشار امواج فراصوت در محلول باعث ایجاد کاویتاسیون یا به عبارتی حباب‌زایی در محلول می‌شود که از این اثر می‌توان برای شکستن دیواره سلولی و سرعت بخشیدن به فرآیند استخراج

استفاده کرد [۲۱، ۲۲].

جدول (۱) چهار مشتق اصلی کاتچین‌ها در چای سیاه و ساختار کلی آنها
 Table 1. Main four derivatives of catechins in black Tea leaves and their general structure

ساختار کلی کاتچین‌ها General Structure of Catechins	چهار مشتق اصلی کاتچین در چای سیاه Four Main Catechin Derivatives in Black Tea
	اپی گالاتوچین-۳-گالات (EGCG) اپی کاتچین-۳-گالات (ECG) اپی گالاتوچین (EGC) اپی کاتچین (EC) کاتچین (C)

مش ۲ تا ۳ خرد شد. این پودر به مدت دو روز در زیر سایه خشک شد و سپس در زیپ کیپ در دمای ۴°C نگهداری شد. معرف فولین سیوکالتو، گالیک اسید، سدیم کربنات بدون آب، آلومینیوم کلراید، سدیم نیترات و سدیم هیدروکساید از شرکت مرک و کوئرستین از سیگما آلدریج استفاده شدند. از آب مقطر به عنوان حلال برای استخراج استفاده شد.

۱.۲. استخراج توسط سوکسله

برای استخراج توسط سوکسله به عنوان یک روش مرسوم و مرجع، ۵ g از نمونه پودر برگ چای سیاه در کاغذ صافی معمولی در سوکسله قرار گرفته شد و با ۱۵۰ ml آب مقطر در دمای جوش آب استخراج شد. بررسی و بهینه‌سازی مدت زمان استخراج در این روش در گستره زمانی ۷-۲ h انجام شد.

۲.۲. پیش فرآیند با امواج میکروویو

پیش فرآیند نمونه پودر برگ چای سیاه با امواج میکروویو با استفاده از یک دستگاه آون میکروویو خانگی (مدل UP LG, MOD 8084WR) در توان تابش‌دهی ۶۰۰W انجام شد. برای این فرآیند ۱۰ ml آب مقطر به ۱ g پودر برگ چای در یک ارلن ۵۰ ml اضافه شده و بعد از مدتی خیس خوردن در دمای محیط، ظرف حاوی نمونه در آون میکروویو قرار گرفت و در مدت زمان کوتاه ۱ min مورد تابش‌دهی قرار

با توجه به قدرت روش‌های نوین میکروویو و فراصوت در استخراج، همیشه احتمال تجزیه ترکیبات مؤثره گیاهی در استفاده طولانی مدت از این روش‌ها وجود دارد. برای جلوگیری از این تأثیرات مخرب، بهتر است که از ترکیب این روش‌ها با روش‌های مرسوم استخراج استفاده کرد. به این ترتیب که با استفاده محدود از روش تابش‌دهی با امواج فراصوت و یا میکروویو از تأثیر آن‌ها برای شکست دیواره سلولی استفاده نمود و سپس برای کامل کردن فرآیند استخراج، از روش‌های مرسوم استخراج استفاده کرد.

مطابق با دانش ما تاکنون مقاله‌ای در ارتباط با استخراج ترکیبات فنولی از برگ چای سیاه با روش ترکیبی شامل استخراج متوالی با حلال از نمونه برگ چای پیش فرآیند شده با امواج میکروویو و یا امواج فراصوت وجود ندارد. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی و مقایسه این دو روش نوین شامل تابش‌دهی با امواج میکروویو و فراصوت برای پیش فرآیند نمودن نمونه برگ چای سیاه و تأثیر آن بر درصد وزنی بازدهی استخراج ترکیبات مؤثره و محتوای ترکیبات فنولی عصاره حاصل از نمونه چای در روش استخراج متوالی با حلال طی سه مرحله استخراج با آب مقطر و همچنین متعادل کردن شرایط استخراج بود.

۲. مواد و روش‌ها

برگ چای سیاه کشت شده در شمال ایران از یک مرکز خرید محلی تهیه شد. نمونه چای توسط یک آسیاب برقی در

کننده دوار تحت خلاء^۱ (مدل BUCHI R-114) تحت فشار کاهش یافته در دمای ۴۰°C تا رسیدن به وزن ثابت خشک شدند.

۳. روش‌های بررسی کمی

۱.۳. درصد وزنی بازدهی استخراج

تمام فرآیندهای بهینه‌سازی بر مبنای درصد وزنی بازدهی استخراج ترکیبات مؤثره انجام شد. درصد وزنی بازدهی با توجه به وزن عصاره خشک به وزن نمونه پودر برگ چای خشک و از طریق معادله (۱) محاسبه شد. وزن سنجی‌ها با استفاده از یک ترازوی دیجیتال (مدل METTLER MP 600) با دقت ۰/۰۱ g انجام شد.

$$EY\% = (C_1/C_0) \times 100 \quad (1)$$

در این معادله C_0 وزن نمونه چای خشک برحسب mg، C_1 وزن عصاره خشک بر حسب mg و EY درصد وزنی بازدهی استخراج است.

۲.۳. اسپکتروفوتومتری

در این مطالعه برای اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در عصاره حاصل از نمونه چای از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل Perkin Elmer Lambda 25) استفاده شد. برای این آنالیز، ۰/۳ g از عصاره خشک حاصل از استخراج، با آب مقطر به حجم ۱۰ ml رسانده شد و بلافاصله برای آنالیز مورد استفاده قرار گرفت.

۱.۲.۳. تعیین محتوای ترکیبات فنولی

روش رنگ‌سنجی فولین سیوکالتو برای تعیین محتوای ترکیبات فنولی کل (TPC)^۲ در عصاره چای مطابق با روش معرفی شده توسط سینگلتن^۳ و با کمی تغییر مورد استفاده قرار گرفت [۲۳]. برای انجام این تست، ۲/۵ ml از معرف فولین سیوکالتو (۱۰ برابر رقیق شده) به ۱۰ µl محلول آبی عصاره اضافه و همزده شد. بعد از گذشت ۵ min، ۲ ml

گرفت. خیساندن پودر برگ چای سیاه در آب مقطر برای تأثیر بهتر امواج میکروویو در حین تابش‌دهی انجام شد. در این روش مدت زمان خیساندن نمونه در آب مقطر بررسی و بهینه‌سازی شد.

۳.۲. پیش‌فرآیند با امواج فراصوت

پیش‌فرآیند نمونه پودر برگ چای سیاه با امواج فراصوت با استفاده از یک دستگاه فراصوت (UP 200H) در توان W ۲۰۰ و فرکانس ۲۴ kHz انجام شد. برای این فرآیند ۱۰ ml آب مقطر به ۱ g از نمونه پودر برگ چای در یک ارلن ۵۰ ml اضافه شد و تابش‌دهی در یک شرایط متوسط شامل مدت زمان ۱۰ min، شدت امواج ۷۰٪ و پالس ۰/۷ s و از طریق قرار گرفتن پروب دستگاه در مخلوط آب و نمونه پودر چای انجام شد.

۴.۲. استخراج متوالی با حلال

استخراج متوالی با حلال طی سه مرحله استخراج با آب مقطر از نمونه‌های پیش‌فرآیند نشده و پیش‌فرآیند شده با امواج میکروویو و فراصوت و با استفاده از سه ارلن در حجم ۵۰ ml هر کدام حاوی ۱ g از نمونه پودر برگ چای سیاه انجام شد. شرایط استخراج در هر سه ارلن به لحاظ دمای حلال، سرعت هم‌خوردن مخلوط، مدت زمان استخراج و مقدار حلال یکسان انتخاب شدند. دمای حلال در ارلن‌ها توسط ترمومتر با دقت $\pm 1^\circ\text{C}$ کنترل می‌شد. برای انجام این استخراج، مقدار معینی آب مقطر در دمای مورد نظر بر روی نمونه در ارلن اول ریخته شد و توسط مگنت در دور rpm ۶۰۰ در مدت زمان معین هم‌زده شد. سپس حلال از ارلن ۱ به ارلن ۲ و سپس به ارلن ۳ و نهایتاً به ظرف جمع‌کننده منتقل شد. این فرآیند سه بار و هر بار با حلال تازه انجام شد. عصاره حاصل توسط یک کاغذ صافی معمولی صاف شد و توسط حرارت‌دهی در تبخیر کننده دوار تحت خلاء خشک شد. در این روش، دمای استخراج، مدت زمان کل استخراج و نسبت حلال به جامد بررسی و بهینه‌سازی شد.

۵.۲. روش خشک کردن عصاره

عصاره‌های حاصل از استخراج، با حرارت‌دهی در تبخیر

1. Rotary
2. Total Phenolic Content (TPC)
3. Singleton

انحراف معیار^۵ برای نتایج درصد وزنی بازدهی استخراج ترکیبات مؤثره در محدوده ۰/۳۹-۰/۱۶± و برای نتایج آنالیز اسپکتروفتومتر در محدوده ۰/۵۱-۰/۲۲± بود.

۴. نتایج و بحث

بررسی و بهینه‌سازی مدت زمان در استخراج ترکیبات مؤثره از پودر برگ چای سیاه در روش سوکسله با استفاده از آب مقطر به عنوان حلال در دمای جوش آب و در بازه زمانی ۷-۲ h انجام شد. همانطور که در نمودار (۱) آورده شده است درصد وزنی بازدهی استخراج ترکیبات مؤثره از چای با افزایش مدت زمان استخراج افزایش یافته است و نهایتاً در مدت زمان ۵ h به حداکثر درصد بازدهی (۰/۱۹w/w±۰/۳۷) رسیده است. این حداکثر درصد بازدهی به عنوان معیاری برای سنجیدن عملکرد دیگر روش‌های استخراج بررسی شده در این مطالعه در نظر گرفته شد. مکانیسم استخراج توسط سوکسله مانند سایر روش‌های مرسوم استخراج، بر پایه اینفیوژن^۶ یا به عبارتی نفوذ حلال از طریق منافذ روی دیواره سلولی به داخل سلول، انحلال ترکیبات قابل انحلال و سپس انتشار حلال حاوی مواد حل شده از طریق منافذ روی دیواره سلولی به خارج از سلول و به حجم حلال صورت می‌گیرد. در این روش، بسته به سرعت گرمایش حلال، استخراج از نمونه چند بار در ساعت و هر بار با حلال تازه انجام می‌شود.

در استخراج متوالی با حلال طی سه مرحله استخراج با آب مقطر از نمونه پودر برگ چای سیاه پیش فرآیند نشده، تأثیر نسبت حلال به جامد، دما و زمان استخراج بر درصد وزنی بازدهی استخراج ترکیبات مؤثره بررسی و بهینه‌سازی شد. همانطور که در نمودار (۲) نشان داده شده است در این روش، بهینه‌سازی نسبت حلال به جامد در گستره ۳۰-۱۰ ml/g در دمای ۵۵°C و مدت زمان استخراج min ۹۹(۳×۳۳) انجام شد و مقدار بهینه نسبت حلال به جامد ۲۵ ml/g به دست آمد. در این روش استخراج، اثر مثبت افزایش نسبت حلال به نمونه چای بر افزایش درصد وزنی بازدهی استخراج به دلیل افزایش ظرفیت بیشتر برای انحلال

سدیم کربنات w/v ۰/۷۵٪ به مخلوط اضافه شد و در دور rpm ۱۰۰ در دمای ۴۰°C هم زده شد. بعد از ۳۰ min جذب نمونه در طول موج ۷۶۰ nm توسط اسپکتروفتومتر اندازه گرفته شد. غلظت ترکیبات فنولی کل در عصاره از طریق نمودار کالیبراسیون جذب بر حسب غلظت گالیک اسید^۱ تعیین شد و بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن نمونه چای خشک (mg GA/g DW) بیان شد. معادله خط این نمودار کالیبراسیون $y=0.0059x+0.0399$ با ضریب رگرسیون (R^2) مساوی ۰/۹۹ بود.

۲.۳.۳. تعیین محتوای ترکیبات فلاونوئیدی

روش آلومینیوم کلراید برای اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی (TFC)^۲ در عصاره چای مطابق با روش اولاجیر^۳ و با کمی تغییر استفاده شد [۲۴]. برای انجام این تست ۰/۳ ml نیترات سدیم w/v ۰/۵٪ و ۴ ml آب مقطر به ۱۰ ml محلول آبی عصاره اضافه و همزده شد. بعد از ۵ min، ۰/۳ ml آلومینیوم کلراید w/v ۰/۱۰٪ به مخلوط اضافه شد و برای مدت ۵ min با دور rpm ۱۰۰ همزده شد. بعد از گذشت ۳ min، ۲ ml سدیم هیدروکساید ۱ N به آن اضافه شد و حجم کل نمونه با افزایش آب مقطر به ۱۰ ml رسانده شد. سپس جذب نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۰ nm اندازه گرفته شد. محتوای کل ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره با استفاده از نمودار کالیبراسیون جذب بر حسب غلظت کوئرستین^۴ تعیین شد و بر حسب میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن چای خشک (mg QUE/g DW) بیان شد. معادله خط این نمودار کالیبراسیون $y=0.1063x+0.0205$ با ضریب رگرسیون (R^2) مساوی ۰/۹۹ بود.

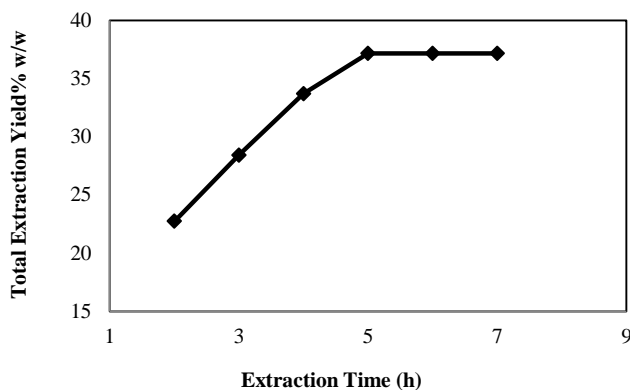
۴.۳. بررسی آماری

برای اطمینان از صحت نتایج، هر آزمایش و تست، سه بار تکرار شد و نتیجه به صورت میانگین سه بار تکرار بیان شد.

5. Standard Deviation
6. Infusion

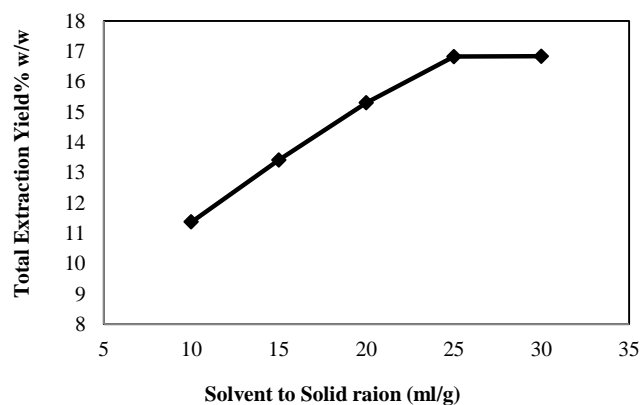
1. Gallic Acid (GA)
2. Total Flavonoid Content (TFC)
3. Olajir
4. Quercetin (QUE)

مواد حل شونده موجود در نمونه چای اتفاق افتاده است. بازدهی پایینی در استخراج به دست خواهد آمد و اگر زیاد بهینه‌سازی درست این فاکتور بسیار مهم است زیرا اگر کم باشد ظرفیت برای انحلال مواد، کم خواهد بود و در نتیجه



شکل (۱) بهینه‌سازی مدت زمان استخراج با سوکسله از نمونه پودر برگ چای سیاه

Fig 1. Optimizing of extraction time in Soxhlet extraction from the black tea leave powder sample



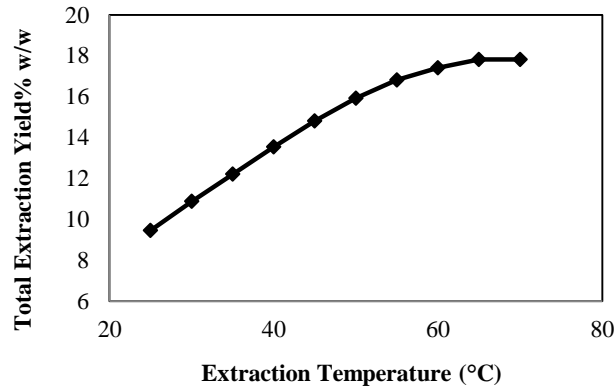
شکل (۲) بهینه‌سازی نسبت حلال به جامد (ml/g) در استخراج متوالی با حلال (آب مقطر) از نمونه پودر برگ چای سیاه در زمان ۹۹ min (۳×۳۳) و دمای ۵۵°C

Fig 2. Optimizing of solvent to solid ratio (ml/g) in MSSE (with distilled water) from the black tea leave powder sample at time of (3×33) 99 min and temperature of 55°C

افزایش درصد وزنی بازدهی استخراج، به دلیل کاهش ویسکوزیته حلال و همچنین تأمین آنتالپی انحلال اتفاق افتاده است. در مورد ویسکوزیته می‌توان این طور بیان کرد که با کاهش ویسکوزیته حلال، روان‌روی آن افزایش می‌یابد و در نتیجه راحت‌تر و سریع‌تر می‌تواند از طریق منافذ دیواره سلولی وارد سلول شود و همچنین برعکس خروج حلال از داخل سلول به بیرون نیز سریع‌تر و راحت‌تر صورت می‌گیرد که این سبب بهبود سرعت و بازدهی استخراج می‌شود. مزیت استخراج متوالی با حلال نسبت به روش سوکسله این است که در این روش می‌توان استخراج را در دمایی کمتر از دمای

همانطور که در نمودار (۳) نشان داده شده است در استخراج متوالی با حلال طی سه مرحله استخراج با آب مقطر از نمونه پودر برگ چای سیاه پیش فرایند نشده، بهینه‌سازی دما در گستره ۲۵-۷۰°C در نسبت حلال به جامد ۲۵ ml/g و در مدت زمان ۹۹ min (۳×۳۳) انجام شد و مقدار دمای بهینه، ۶۵°C به دست آمد. در این روش، تأثیر مثبت افزایش دما بر افزایش درصد وزنی بازدهی استخراج، به دلیل کاهش ویسکوزیته حلال و همچنین تأمین آنتالپی انحلال اتفاق

جوش حلال انجام داد و به این ترتیب مانع از تجزیه احتمالی
ترکیبات مؤثره در مواجهه با گرمادهی طولانی مدت در دمای

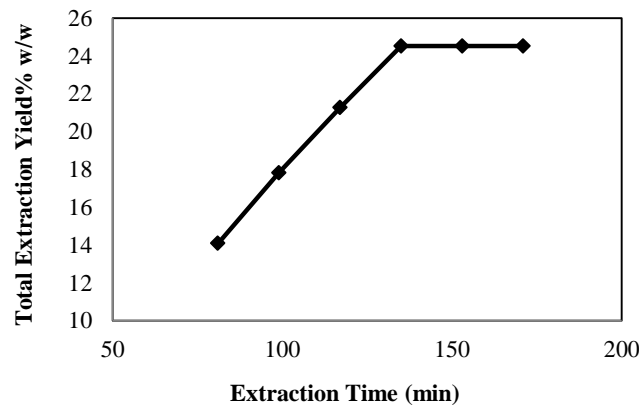


شکل (۳) بهینه‌سازی دما (°C) در استخراج متوالی با حلال (آب مقطر) از نمونه پودر برگ چای سیاه در زمان ۹۹ min (۳×۳۳) و نسبت حلال به جامد ۲۵ ml/g

Fig 3. Optimizing of extraction temperature (°C) in MSSE (with distilled water) from the black tea leave powder sample at time of (3×33) 99 min and solvent to solid ratio of 25 ml/g

استخراج متوالی با حلال از روش‌های مرسوم استخراج است که در آن استخراج مانند روش سوکسله بر پایه مکانیسم اینفیوژن انجام می‌شود که روشی زمان‌بر است و در نتیجه افزایش مدت زمان استخراج سبب افزایش درصد وزنی بازدهی استخراج شده است.

همانطور که در نمودار (۴) آورده شده است در استخراج متوالی با حلال طی سه مرحله استخراج با آب مقطر از نمونه پودر برگ چای سیاه پیش فرآیند نشده، بهینه‌سازی مدت زمان استخراج در بازه ۸۱-۱۷۱ min در نسبت حلال به جامد ۲۵ ml/g و در دمای ۶۵°C انجام شد و مقدار بهینه مدت زمان استخراج ۱۳۵ min (۳×۴۵) به دست آمد.



شکل (۴) بهینه‌سازی زمان (min) در استخراج متوالی با حلال (آب مقطر) از نمونه پودر برگ چای سیاه، در نسبت حلال به جامد ۲۵ ml/g و دمای ۶۵°C

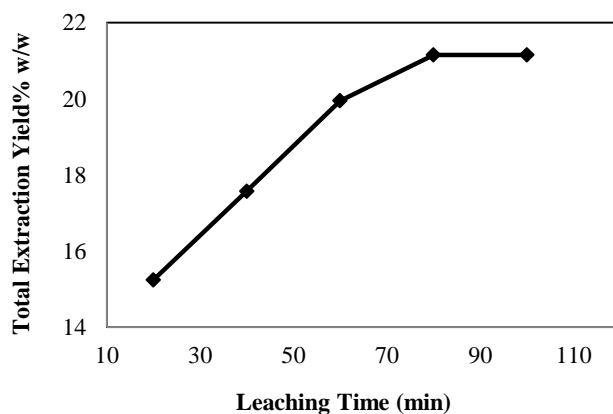
Fig 4. Optimizing of extraction time (min) in MSSE (with distilled water) from the black tea leave powder sample at solvent to solid ratio of 25 ml/g and temperature of 65°C

مرحله استخراج با آب مقطر، تأثیر مثبت بر افزایش درصد وزنی بازدهی استخراج ترکیبات مؤثره از نمونه پودر برگ

به این ترتیب بنا بر نتایج به دست آمده افزایش دما، زمان و نسبت حلال به جامد در استخراج متوالی با حلال طی سه

ترکیبات مؤثره، تنها حاصل از ۱ min تابش‌دهی نمونه با امواج میکروویو انجام شد. همانطور که در نمودار (۵) آورده شده است افزایش مدت زمان خیساندن نمونه چای در آب مقطر، تأثیر زیادی بر افزایش درصد وزنی بازدهی استخراج با فرآیند میکروویو دارد. با افزایش مدت زمان خیساندن، مقدار بیشتری آب به داخل سلول‌های چای نفوذ می‌کند که ضمن برهمکنش با امواج میکروویو به دلیل گرمای ایجاد شده، بخار می‌شود. این بخار سبب بالا رفتن فشار داخلی سلول و نهایتاً سبب شکستن دیواره سلولی و رهاسازی ترکیبات مؤثره به خارج از سلول می‌شود [۲۵]. مطابق با نتایج در این بخش، ۸۰ min مدت زمان بهینه برای نفوذ مقدار کافی آب مقطر به داخل سلول‌های چای بود.

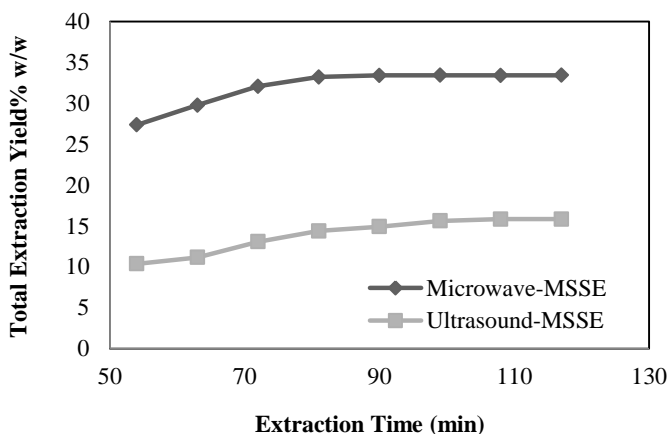
چای سیاه پیش فرایند نشده داشته است و بیشترین درصد بازدهی ($0.24/53 \pm 0.28$ w/w) در شرایط بهینه شامل دمای 65°C ، مدت زمان ۳۵ min (3×45) و نسبت حلال به جامد ۲۵ ml/g به دست آمده است. همین‌طور نتایج نشان داد که در مقایسه با روش سوکسله، در استخراج متوالی با حلال با وجود طولانی بودن فرآیند، استخراج کمی و کامل از نمونه چای پیش فرآیند نشده صورت نگرفته است. برای انجام استخراج متوالی با حلال طی سه مرحله استخراج با آب مقطر از نمونه پودر برگ چای سیاه پیش فرآیند شده با امواج میکروویو، ابتدا بهینه‌سازی مدت زمان خیساندن نمونه پودر برگ چای سیاه در آب مقطر در بازه زمانی ۱۰۰-۲۰ min از طریق بررسی درصد وزنی بازدهی استخراج



شکل (۵) بهینه‌سازی مدت زمان خیساندن نمونه پودر برگ چای سیاه در آب مقطر برای انجام ۱ min تابش‌دهی با امواج میکروویو
Fig 5. Optimizing of leaching time of the black tea leave powder sample in distilled water for 1 min microwaves irradiation

در استخراج متوالی با حلال طی سه مرحله استخراج با آب مقطر از نمونه پودر برگ چای سیاه پیش فرآیند شده با امواج میکروویو و نمونه پودر برگ چای سیاه پیش فرآیند شده با امواج فراصوت، تأثیر نسبت حلال به جامد، دما و زمان استخراج بر درصد وزنی بازدهی استخراج ترکیبات مؤثره بررسی و بهینه‌سازی شد. همانطور که در نمودار (۶) آورده شده است بررسی و بهینه‌سازی مدت زمان در استخراج متوالی با حلال از نمونه پودر برگ چای سیاه پیش فرآیند شده با امواج میکروویو و نمونه پودر برگ چای سیاه پیش فرآیند شده با امواج فراصوت در بازه زمانی ۱۱۷ min -

در استخراج متوالی با حلال طی سه مرحله استخراج با آب مقطر از نمونه پودر برگ چای سیاه پیش فرآیند شده با امواج میکروویو و نمونه پودر برگ چای سیاه پیش فرآیند شده با امواج فراصوت، تأثیر نسبت حلال به جامد، دما و زمان استخراج بر درصد وزنی بازدهی استخراج ترکیبات مؤثره بررسی و بهینه‌سازی شد. همانطور که در نمودار (۶) آورده شده است بررسی و بهینه‌سازی مدت زمان در استخراج متوالی با حلال از نمونه پودر برگ چای سیاه پیش فرآیند شده با امواج میکروویو و نمونه پودر برگ چای سیاه پیش فرآیند شده با امواج فراصوت در بازه زمانی ۱۱۷ min -

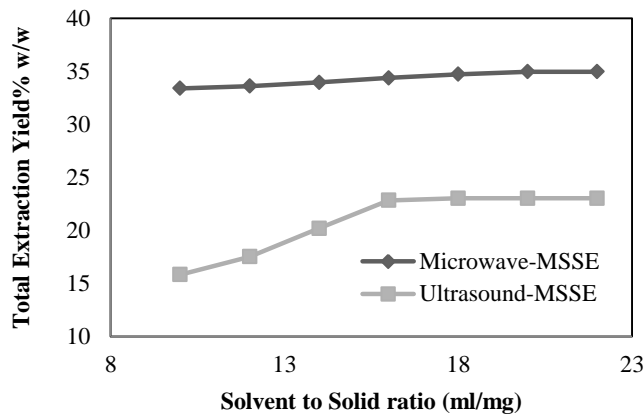


شکل (۶) بهینه‌سازی مدت زمان (min) استخراج متوالی با حلال (آب مقطر) از نمونه پودر برگ چای سیاه (پیش فرآیند شده با امواج میکروویو و فراصوت) در دمای 30°C و نسبت حلال به جامد 10 ml/g

Fig 6. Optimizing of extraction time (min) in MSSE (with distilled water) from the black tea leave powder samples (pre-treated by microwave and ultrasound) at temperature of 30°C and solvent to solid ratio of 10 ml/g

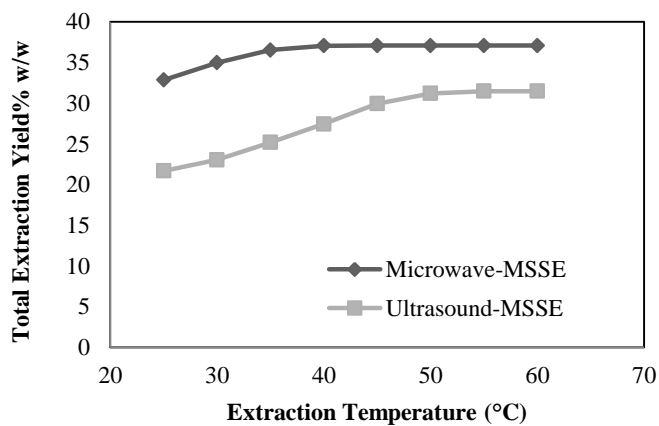
بازدهی استخراج مشاهده نشد. همانطور که در نمودار (۸) آورده شده است بررسی و بهینه‌سازی دما در استخراج متوالی با حلال طی سه مرحله استخراج با آب مقطر از نمونه پودر برگ چای سیاه پیش فرآیند شده با امواج میکروویو و از نمونه پودر برگ چای سیاه پیش فرآیند شده با امواج فراصوت، در گستره $20-60^{\circ}\text{C}$ انجام شد. این بهینه‌سازی برای نمونه چای پیش فرآیند شده با امواج میکروویو، در نسبت حلال به جامد 20 ml/g و مدت زمان استخراج 90 min (3×10) و برای نمونه چای پیش فرآیند شده با امواج فراصوت، در نسبت حلال به جامد 18 ml/g و مدت زمان استخراج 108 min (3×36) انجام شد. در نهایت، دمای بهینه استخراج برای نمونه چای پیش فرآیند شده با امواج میکروویو و برای نمونه چای پیش فرآیند شده با امواج فراصوت به ترتیب 40°C و 55°C به دست آمد. در هر دو مورد، یعنی استخراج از نمونه چای پیش فرآیند شده با امواج میکروویو و استخراج از نمونه چای پیش فرآیند شده با امواج فراصوت، درصد وزنی بازدهی استخراج ترکیبات مؤثره با افزایش دمای استخراج تا مقدار بهینه، افزایش داشت که علت آن کاهش ویسکوزیته حلال و همین‌طور تأمین آنتالپی انحلال است.

همانطور که در نمودار (۷) آورده شده است بررسی و بهینه‌سازی نسبت حلال به جامد در استخراج متوالی با حلال طی سه مرحله استخراج با آب مقطر از نمونه پودر برگ چای سیاه پیش فرآیند شده با امواج میکروویو و از نمونه پودر برگ چای سیاه پیش فرآیند شده با امواج فراصوت، در گستره $10-22\text{ ml/g}$ انجام شد. این بهینه‌سازی برای نمونه چای پیش فرآیند شده با امواج میکروویو، در دمای 30°C و مدت زمان استخراج 90 min (3×10) و برای نمونه چای پیش فرآیند شده با امواج فراصوت، در دمای 30°C و مدت زمان استخراج 108 min (3×36) انجام شد. در نهایت نسبت بهینه حلال به جامد برای استخراج از نمونه چای پیش فرآیند شده با امواج میکروویو و نمونه چای پیش فرآیند شده با امواج فراصوت به ترتیب 20 ml/g و 18 ml/g به دست آمد. در هر دو مورد، یعنی استخراج از نمونه چای پیش فرآیند شده با امواج میکروویو و استخراج از نمونه چای پیش فرآیند شده با امواج فراصوت، درصد وزنی بازدهی استخراج ترکیبات مؤثره با افزایش نسبت حلال به جامد تا رسیدن به مقدار بهینه افزایش داشت که این به دلیل تأمین حلال مورد نیاز جهت انحلال ترکیبات مؤثره و تکمیل کردن فرآیند استخراج است و بعد از آن با افزایش بیشتر نسبت حلال به جامد، افزایش قابل توجهی در درصد



شکل (۷) بهینه‌سازی نسبت حلال به جامد (ml/g) در استخراج متوالی با حلال (آب مقطر) در مدت زمان $3 \times 30(90)$ min و دمای 30°C برای نمونه پودر برگ چای سیاه پیش فرآیند شده با امواج فراصوت و در مدت زمان $3 \times 36(108)$ min و دمای 30°C برای نمونه پیش فرآیند شده با امواج فراصوت

Fig 7. Optimizing of solvent to solid ratio (ml/g) in MSSE (with distilled water) at time of $3 \times 30(90)$ min and temperature of 30°C for the pre-treated black tea leave powder samples by microwave and at time of $3 \times 36(108)$ min and temperature of 30°C for the pre-treated black tea leave powder samples by ultrasound



شکل (۸) بهینه‌سازی دما ($^\circ\text{C}$) در استخراج متوالی با حلال (آب مقطر) در مدت زمان $3 \times 30(90)$ min و نسبت حلال به نمونه 20 ml/g برای نمونه پیش فرآیند شده با امواج میکروویو و در مدت زمان $3 \times 36(108)$ min و نسبت حلال به جامد 18 ml/mg برای نمونه پیش فرآیند شده با امواج فراصوت

Fig 8. Optimizing of extraction temperature ($^\circ\text{C}$) in MSSE (with distilled water) at time of $3 \times 30(90)$ min and solvent to solid ratio of 20 ml/g for the pre-treated black tea leave powder samples by microwave and at time of $3 \times 36(108)$ min and solvent to solid ratio of 18 ml/g for the pre-treated black tea leave powder samples by ultrasound

امواج فراصوت، بیشترین درصد بازدهی استخراج $(31.47 \pm 0.38\% \text{ w/w})$ در مدت زمان $3 \times 36(108)$ min، دمای 55°C و نسبت حلال به جامد 18 ml/g به دست آمد. با مقایسه این نتایج با نتایج حاصل از استخراج متوالی با حلال از نمونه چای پیش فرآیند نشده، مشخص می‌شود که هر دو روش پیش فرآیند بررسی شده، در افزایش درصد

بنابراین در استخراج ترکیبات مؤثره توسط روش استخراج متوالی با حلال از طریق استخراج سه مرحله‌ای با آب مقطر از نمونه چای پیش فرآیند شده با امواج میکروویو، بیشترین درصد بازدهی استخراج $(37.06 \pm 0.34\% \text{ w/w})$ در مدت زمان $3 \times 30(90)$ min، دمای 40°C و نسبت حلال به جامد 20 ml/g به دست آمد و در مورد نمونه پیش فرآیند شده با

استخراج استفاده می‌شود [۲۱،۲۲]. همانطور که در نمودار (۷) مشخص است مقدار بهینه نسبت حلال به جامد، برای نمونه پیش فرآیند شده با امواج فراصوت کمتر از مقدار آن برای نمونه پیش فرآیند شده با امواج میکروویو به دست آمده است که به نظر می‌رسد این به دلیل مقدار کمتر ترکیبات استخراج شده از نمونه چای در این روش پیش فرآیند و در نتیجه نیاز به مقدار کمتر حلال بوده است.

همانطور که در جدول (۲) آورده شده است مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در عصاره چای حاصل از استخراج با روش سوکسله کمتر از مقدار آن در عصاره به دست آمده در روش استخراج متوالی با حلال از نمونه پیش فرآیند نشده و استخراج متوالی با حلال از نمونه پیش فرآیند شده با امواج میکروویو و فراصوت بود که این به دلیل مدت زمان کم گرمادهی در این روش‌ها نسبت به روش سوکسله است. به عبارتی به نظر می‌رسد در روش سوکسله مقداری از این ترکیبات به دلیل فرآیند طولانی مدت گرمادهی تجزیه می‌شوند.

بازدهی استخراج ترکیبات مؤثره از نمونه برگ چای سیاه و متعادل کردن شرایط در روش استخراج متوالی با حلال مؤثر بوده‌اند. روش پیش فرآیند با امواج میکروویو در افزایش میزان بازدهی و متعادل کردن شرایط در استخراج متوالی با حلال بخصوص در مورد زمان و دمای استخراج مؤثرتر از روش فراصوت عمل کرد. دلیل این مسئله مکانیسم خاص گرمایش با استفاده از امواج میکروویو است که این گرمایش با تبخیر آب درون سلول‌ها سبب افزایش فشار داخلی سلول و از هم پاشیده شدن دیواره آن می‌شود که با توجه به نتایج حاصل در این مطالعه این اثر از اثر امواج ضربتی حاصل از فرآیند کاویتاسیون در تابش‌دهی با امواج فراصوت در شکست دیواره سلولی مؤثرتر عمل کرده است. قابل ذکر است که در روش تابش‌دهی با امواج فراصوت، عبور امواج انبساطی و انقباضی فراصوت از داخل یک مایع سبب ایجاد حباب‌زایی در آن مایع می‌شود؛ وقتی ترکیدن این حباب‌ها، در کنار ذرات جامد موجود در آن مایع اتفاق می‌افتد، ضربات قوی بر سطح آن ذرات وارد می‌شود که از این اثر برای شکستن دیواره سلولی جهت سرعت و سهولت بخشیدن به فرآیند

جدول (۲) مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در عصاره برگ چای سیاه به دست آمده توسط استخراج متوالی با حلال (آب مقطر) در شرایط بهینه از نمونه پیش فرآیند نشده و نمونه‌های پیش فرآیند شده با امواج میکروویو و فراصوت و عصاره به دست آمده توسط روش سوکسله

Table 2. Total phenolic and flavonoid compounds extracted by MSSE (with distilled water) from the un-pretreated, microwave and ultrasound pre-treated black tea leave powder samples at the optimum conditions and the extract obtained by soxhlet extraction

ترکیبات فلاونوئیدی (mg QUE/g DW) Flavonoid Compounds	ترکیبات فنلی (mg GA/g DW) Phenolic Compounds	روش استخراج
7.14±0.22	9.33±0.43	استخراج توسط سوکسله از نمونه پودر برگ چای سیاه Soxhlet extraction from the black tea leave powder sample
9.32 ±0.47	11.77±0.24	استخراج متوالی با حلال از نمونه پودر برگ چای پیش فرآیند نشده MSSE from the un-pretreated black tea leave powder sample
9.24 ±0.38	11.81±0.50	استخراج متوالی با حلال از نمونه چای پیش فرآیند شده با امواج میکروویو MSSE from the microwave- pretreated black tea leave powder sample
9.35 ±0.47	11.86±0.49	استخراج متوالی با حلال از نمونه چای پیش فرآیند شده با امواج فراصوت MSSE from the ultrasound-pretreated black tea leave powder samples

[۲۶، ۱۹، ۱۸]. این در حالی است که با توجه به قدرت این امواج در برهمکنش با ترکیبات قطبی، همواره احتمال تجزیه برخی ترکیبات مؤثره و از جمله ترکیبات فنولی طی فرآیند تابش‌دهی طولانی مدت با این امواج وجود دارد [۲۰]. همچنین با توجه به مقالات، برای به دست آوردن عصاره‌ای

با توجه به مقالات اگرچه مدت زمان بهینه تابش‌دهی با امواج میکروویو برای به دست آوردن عصاره‌ای غنی از ترکیبات فنولی از چای به عوامل مختلفی مانند حلال و قدرت تابش‌دهی امواج بستگی دارد اما مدت زمان تابش‌دهی لازم برای این استخراج معمولاً بیشتر از ۱ min گزارش شده است



بازدهی استخراج ترکیبات مؤثره نشان داد تأثیر استفاده از پیش فرایند با امواج میکروویو در افزایش میزان بازدهی و متعادل کردن شرایط در فرآیند استخراج متوالی با حلال از نمونه چای، بیشتر از تأثیر امواج فراصوت است. این مسئله به دلیل مکانیسم مؤثرتر این امواج در شکست دیواره سلولی است. مقایسه نتایج حاصل در ارتباط با بررسی محتوای ترکیبات فنولی در عصاره استخراج شده از نمونه پودر برگ چای نشان داد که مقدار این ترکیبات در عصاره به دست آمده از استخراج متوالی با حلال از نمونه پیش فرآیند نشده و استخراج متوالی با حلال از نمونه‌های پیش فرآیند شده با امواج میکروویو و فراصوت بیشتر از مقدار آن در عصاره به دست آمده با روش سوکسله است که این به دلیل مدت زمان کوتاه‌تر گرمادهی در این روش‌ها نسبت به روش سوکسله بوده است. در کل مطابق با نتایج حاصل، دو روش استخراج ترکیبی بررسی شده در این مطالعه شامل استخراج متوالی با حلال از نمونه پیش فرایند شده با امواج میکروویو و استخراج متوالی با حلال از نمونه پیش فرایند شده با امواج فراصوت، روش‌های مناسبی برای استخراج کمی ترکیبات مؤثره و به دست آوردن عصاره‌ای غنی از ترکیبات فنولی از برگ چای سیاه در شرایط ملایمی از استخراج بودند.

قدردانی

به این وسیله از حمایت مالی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تشکر می‌شود.

غنی از ترکیبات فنولی از چای با امواج فراصوت، معمولاً به تابش‌دهی در مدت زمانی بیشتر از ۱۰ min نیاز است که این کار سبب استهلاک دستگاه، افزایش در مصرف انرژی و افزایش هزینه‌های استخراج می‌شود [۱۸، ۲۷، ۲۸]. همچنین در روش‌های مرسوم استخراج نیز به دلیل فرآیند طولانی مدت حرارت‌دهی، همواره احتمال اکسیده شدن و تجزیه ترکیبات فنولی و کاهش تأثیرات مثبت زیستی عصاره حاصل وجود دارد [۲۹]. بنابراین همانطور که نتایج این مطالعه نشان داد با استفاده از امواج میکروویو و فراصوت به عنوان مرحله پیش فرآیند نمونه پودر برگ چای سیاه و سپس استخراج با روش مرسوم و سنتی استخراج متوالی با حلال طی سه مرحله استخراج با آب مقطر، می‌توان ضمن انجام یک استخراج کامل، به بازدهی بالایی در استخراج ترکیبات فنولی از برگ چای سیاه طی شرایط ملایمی از استخراج رسید.

۵. نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که هر دو روش بررسی شده برای پیش فرآیند نمونه پودر برگ چای سیاه شامل پیش فرایند با امواج میکروویو و پیش فرایند با امواج فراصوت می‌تواند درصد بازدهی استخراج ترکیبات مؤثره و شرایط استخراج را در فرآیند استخراج متوالی با حلال طی سه مرحله استخراج با آب مقطر بهبود ببخشد که این تأثیر به دلیل اثر قدرتمند این امواج در شکستن دیواره سلولی و رهایش مواد موجود در سلول اتفاق می‌افتد. مقایسه نتایج

منابع

- [1] Mahmood, T., Naveed, A., & Ali Khan, B. (2010). The morphology, characteristics, and medicinal properties of *Camellia sinensis*' tea. *J. Med. Plant Res.*, 4, 2028-2033.
- [2] H-mahmoodi, M., Hanifeh, M., Oveisi, M. R., Sadeghi, N., & Jannat, B. (2008). Deterioration of total antioxidant capacity of green teas by the ferric reducing/antioxidant power assay, Iran. *J. Environ. Health Sci. Eng.*, 5, 167-172.
- [3] Khanum, H., Shanediwan, A. N., Sulochanamma, G., & Borse, B. B. (2015). Effect of Types of Extractions on Antioxidant Activity of Varieties of Black teas from India. *JEBAS*, 3, 37-43.
- [4] Khokhar, S., & Magnusdottir, S. G. M. (2002). Total Phenol, Catechin, and Caffeine Contents of Teas Commonly Consumed in the United Kingdom, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 565-570.
- [5] Nadiyah, N. I., & Uthumporn, U. (2015). Determination of Phenolic and Antioxidant Properties in Tea and Spent Tea under Various Extraction Method and Determination of Catechins, Caffeine and Gallic Acid by HPLC. *IJASEIT*, 5, 158-164.
- [6] Bharadwaz, A., & Bhattacharjee, C. (2012). Extraction of Polyphenols from Dried Tea Leaves. *Int. J. Sci. Eng. Res.*, 3, 1-5.
- [7] Gan, P.T., & Yien Ting, A. S. (2017). Our Tea-Drinking Habits: Effects of Brewing Cycles and Infusion Time on Total Phenol Content and Antioxidants of Common Teas. *J. Culinary Scienc. Technol.*, 17, 1-14.

- [8] Zhao, F., Lin, H., Zhang, S., Lin, Y., Yang, J., & Ye, N. (2014). Simultaneous determination of caffeine and some selected polyphenols in Wuyi Rock Tea by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 2772–2781.
- [9] Jolvis Pou, K. R. (2016). Fermentation: The Key Step in the Processing of Black Tea. *J. Biosyst. Engin.* 41, 85-92.
- [10] Deb, S., & Jolvis Pou, K. R. (2016). A Review of Withering in the Processing of Black Tea. *J. Biosyst. Eng.*, 41, 365-372.
- [11] Turkmen, N., & Velioglu, Y. S. (2007). Ferda Sari and Gokce Polat, Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *J. Molecules*, 12, 484-496.
- [12] E-Sheikh, R., S-Amin, A., A-Atwa, M., A-Gouda, A., & A-Abdullah, A. (2015). Determination of Phenolic Components and Antioxidant Activity of Some Egyptian Tea Samples. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 7, 198-202.
- [13] Larsson, S.C, Virtamo, J., & Wolk, A. (2013). Black tea consumption and risk of stroke in women and men. *J. Ann. Epidemiol.*, 23, 157-60.
- [14] Fan, F. (2016). Iron deficiency anemia due to excessive green tea drinking. *J. Cli. Case Rep.*, 4, 1053–1056.
- [15] Setyopratomo, P. (2014). Extraction of phenolic compounds from green tea using ethanol. *JEAS.*, 9, 1516-1521.
- [16] Bailey, R. G., & Nursten H. E. (1993). The Chemical Oxidation of Catechins and Other Phenolics: A Study of the Formation of Black Tea Pigments. *J. Sci. Food Agric.*, 63, 455-464.
- [17] Hea, Q., Yaoa, K., Jiaa, D., Fanb, H., Liaob, X., & Shib, B. (2009). Determination of total catechins in tea extracts by HPLC and spectrophotometry. *Nat. Prod. Res.*, 23, 93-100.
- [18] G-mohammadi, V., Zamani, B., Afsharpou, M., & Mohammadi, A. (2017). Extraction of caffeine and catechins using microwave-assisted and ultrasonic extraction from green tea leaves: an optimization study by the IV-optimal design. *Food Sci. Biotechnol.*, 26, 1281–1290.
- [19] Sedar, G., Demir, E., Bayarak, S., & Sokmen, M. (2016). New approaches for effective microwave assisted extraction of caffeine and catechins from green tea. *IJSM.*, 3, 3-13.
- [20] Alara, O.R, Abdurahman, N.H., & Olalere, O. (2017). Optimization of microwave-assisted extraction of flavonoids and antioxidants from Vernonia amygdalina leave using response surface methodology. *Food Bioprod. Process.*, 107,36–48.
- [21] Ebringerová, A., & Hromádková, Z. (2010). An overview on the application of ultrasound in extraction, separation and purification of plant polysaccharides. *Cent. Eur. J. Chem.*, 8, 243–257.
- [22] Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., F-Tixier, A.S., & A-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.*, 34, 540-560.
- [23] Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.*, 299, 152-178.
- [24] Olajire, A. A., & Azeez, L. (2011). Total antioxidant activity, phenolic, flavonoid and ascorbic acid contents of Nigerian vegetables. *AJFST*, 2, 22-29.
- [25] Yahya, N. A., Attan, N., & Wahab, R.A. (2018). An overview of 29 relevant plant extracts and strategies for extraction of plant-based bioactive compounds. *Food Bioprod. Process.*, 112, 69–85.
- [26] Pan, X., Niu, G., & Liu, H. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chem. Eng. Process.*, 42, 129-133.
- [27] A-Bakht, M, H-Geesi, M., Riadi, Y., Imran, M., I-Ali, M., Ahsane, M.J., & Ajmal, N. (2019). Ultrasound-assisted extraction of some branded tea: Optimization based on polyphenol content, antioxidant potential and thermodynamic study. *Saudi J. Biol. Sci.*, 26, 1043-1052.
- [28] Lee, L.S., Lee, N., Kim, Y.H., Lee, C.H., Hong, S.P., Jeon, Y.W., & Kim, Y.E. (2013). Optimization of Ultrasonic Extraction of Phenolic Antioxidants from Green Tea Using Response Surface Methodology. *Molecules*, 18, 13530–13545.
- [29] Dai, J., & Mumper, R.J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313–7352

Research Article
Investigation of Black Tea Leave Pre-treatment by Microwave and Ultrasound to Extract Effective Compounds

Anvar Shalmashi^{1,*}, Fatemeh Amani²

1. Associate Professor, Department of Organic Chemistry, Institute of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST)

2. MSc in Organic Chemistry, Chemistry Faculty, Payambar Azam Department, Islamic Azad University- Central Tehran

Abstract

In this paper, microwave and ultrasound irradiation were compared for pre-treating the black tea (*Camelia Sinensis*) leaves powder to increase the extraction yield (%w/w) of effective compounds in multi stage solvent extraction (MSSE) via three stage extraction with distilled water. Maximum extraction yield by MSSE from the un-pretreated tea sample at optimum condition (135 min extraction time, 65°C extraction temperature and 25 ml/g solvent to solid ratio) was obtained 24.53±0.28 % w/w. For microwave pre-treating, the tea samples were leached in distilled water at room temperature for 80 min and then exposed to microwaves at 600 W for 1 min. Maximum extraction yield from the microwave pre-treated sample by MSSE at optimum condition (90 min extraction time, 40°C extraction temperature and 20 ml/g solvent to solid ratio) was obtained 37.06±0.34 % w/w. For ultrasound pre-treating, the tea samples were irradiated by ultrasonic waves at a mild condition including of 10 min irradiation time at amplitude of 70% and pulse of 0.7 s. Maximum extraction yield from the ultrasound pre-treated sample by MSSE at optimum condition (108 min extraction time, 55°C extraction temperature and 18 ml/g solvent to solid ratio) was obtained 31.47±0.38 %w/w. So both of the pre-treating methods had significant effect on improving the extraction yield and softening the extraction condition in MSSE and the microwave pre-treating was the better one. The extraction yield (37.15±0.19 %w/w) obtained by SOX at optimum operating condition (5h extraction time at boiling point of water) was close to those obtained by MSSE from the pre-treated samples, but amounts of the total phenolic and flavonoid compounds in the SOX extract were less than those obtained by other extraction methods considered in this study that was due to prolong heating process in the soxhlet extraction.

Key Words: Black Tea leave, Multi-stage solvent extraction, Microwave pre-treatment, Ultrasound pre-treatment, Phenolic Compounds, Flavonoid compounds

*Corresponding author: shalmashi@irost.ir