

## بهینه‌سازی آزمایشگاهی استخراج فوق بحرانی اصلاح شده اپی گالوکاتچین گالات از چای سبز با کمک حلال اتانول

الهام حیدری<sup>۱</sup>، سید محمد قریشی<sup>۲\*</sup>

۱. کارشناس ارشد، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده مهندسی شیمی  
۲. استاد، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده مهندسی شیمی (ghoreshi@cc.iut.ac.ir)

چکیده	مشخصات مقاله
<p>در این پژوهش به استخراج اپی گالوکاتچین گالات (EGCG) به دو روش فوق بحرانی و سوکسله از چای سبز پرداخته و برای بهبود شرایط استخراج فوق بحرانی از اصلاح‌گر اتانول استفاده شده است. به منظور بررسی تغییرات میزان بازیابی EGCG نسبت به متغیرهای عملیاتی با استفاده از روش رویه‌ی پاسخ، یک مدل چند جمله‌ای مرتبه‌ی دوم ارائه گردیده است. صحت مدل پیشنهادی ارزیابی شده و تأثیر پارامترهای عملیاتی مختلف نظیر دما، فشار، دبی دی‌اکسید کربن و زمان دینامیک بر روی میزان بازیابی EGCG مورد بررسی قرار گرفته است. مقدار بهینه میزان بازیابی EGCG، ۰/۴۶۲، در شرایط عملیاتی <math>۴۳/۷\text{ }^{\circ}\text{C}</math>، ۱۹/۲۹ MPa، ۱/۵ ml/min و ۱۰۶ min (زمان دینامیک) بدست آمده است.</p>	<p>تاریخچه مقاله: دریافت: ۳۰ اردیبهشت ۹۱ دریافت پس از اصلاح: ۱۲ دی ۹۱ پذیرش نهایی: ۲۸ دی ۹۱</p> <p>کلمات کلیدی: استخراج فوق بحرانی اپی گالوکاتچین گالات EGCG سوکسله، اصلاح‌گر طراحی رویه پاسخ</p>
حقوق ناشر محفوظ است.	* عهده دار مکاتبات

## ۱- مقدمه

استخراج آنالیت را افزایش دهند [۱۶-۱۴]. بنابراین به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد سیالات فوق بحرانی مانند انتخاب پذیری بالا، نفوذ پذیری بالا همانند گازها و دانسیته بالا شبیه به مایعات و کشش سطحی بسیار پایین، استفاده از تکنولوژی فوق بحرانی در بسیاری از روش‌های تولید اسانس‌های دارویی و خوراکی به کار گرفته شده‌اند [۱۷، ۱۸]. به طوری که چند مقاله، جداسازی کافئین موجود در چای سبز با تکنولوژی فوق بحرانی را مورد بررسی قرار داده‌اند [۲۰، ۱۹].

روش طراحی آزمایش روشی است که با طرح ریزی مناسب آزمایشات با صرف حداقل هزینه و زمان، بیشترین اطلاعات را از فرایند بدست می‌دهد [۲۱، ۲۲]. بنابراین در این پژوهش بعد از آزمایش‌های غربالی برای بدست آوردن سایز بهینه ذرات و زمان استاتیک بهینه، اثر چهار پارامتر اصلی تأثیر گذار بر میزان استخراج نظیر فشار، دما، زمان دینامیک و دبی دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی به کمک طراحی آزمایش بررسی شده است. قابل ذکر است که زمان استاتیک بهینه با انجام آزمایش‌های غربالی در شرایط یکسان و زمان‌های استاتیک متفاوت ۱۵، ۲۵ و ۳۵ دقیقه و سایز بهینه ذرات نیز با انجام آزمایش در شرایط یکسان با مش سایزهای متفاوت ۱۸-۲۰، ۲۰-۳۵ و ۳۵-۴۰ در نهایت ۲۵ دقیقه و ۲۰-۳۵ بدست آمده و حجم اصلاحگر (اتانول) در همه آزمایش‌ها ۱ میلی‌لیتر و ثابت نگه داشته شده است.

## ۲- مواد و روش تحقیق

اپی‌گالوکاتچین‌گالات از چای سبز لاهیجان تولید شرکت رفاه به دو روش استخراج با حلال (سوکسله) و استخراج بادی اکسید کربن فوق بحرانی اصلاح شده بدست آمده است.

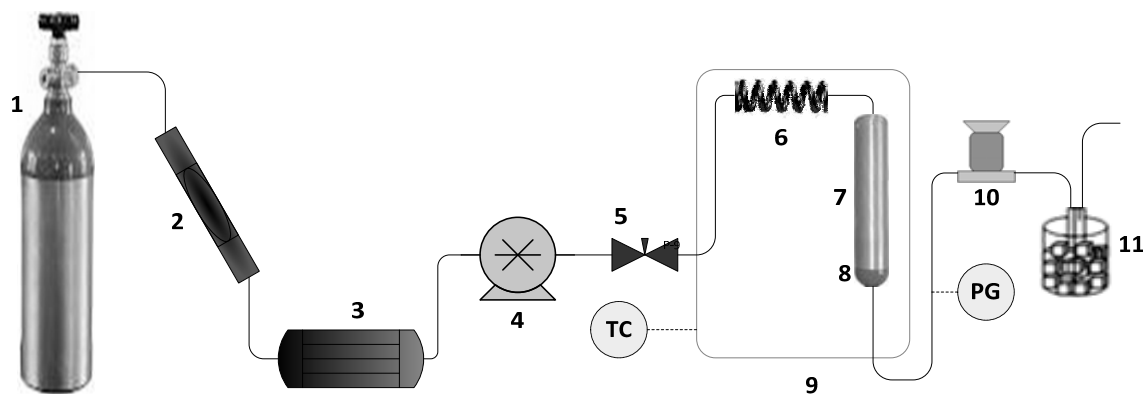
به منظور آماده سازی مواد اولیه، میزان رطوبت موجود در چای سبز اندازه‌گیری شده و سپس از مش ۲۰-۳۵ عبور داده شده است. با توجه به رطوبت کمتر از ۵٪ اثر کمک حلالی این مقدار رطوبت و افزایش نرخ استخراج [۲۳] نیازی به حذف رطوبت نبوده است. برای تهیه خرده شیشه نیز شیشه پیرکس به دلیل ناخالصی کمتر استفاده شده که از مش ۳۵ عبور داده شده است.

## ۲-۱- استخراج با دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی

قسمت‌های اصلی سیستم استخراج فوق بحرانی در شکل ۱ نشان داده شده است:

چای سبز حاوی آنتی‌اکسیدانها، پلی‌فنول‌ها، ال‌تینین و همچنین شامل انواع وسیعی از ویتامین‌ها و مواد معدنی است. پلی‌فنول‌ها گروهی از ترکیبات هستند که در چای سبز به وفور (حدود ۳۰-۴۰٪ وزنی) یافت می‌شوند و کاتچین‌ها نیز از دسته پلی‌فنول‌ها هستند. درمیان کاتچین‌های موجود در چای سبز اپی‌گالوکاتچین‌گالات بیشترین مقدار را داراست و همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن نسبت به بقیه انواع دیگر کاتچین موجود در چای سبز بیشتر می‌باشد. قدرت EGCG ۱۰۰ برابر ویتامین C و ۲۵ برابر ویتامین E است از طرفی دارای اثرات جانبی کم بوده و یا فاقد اثر جانبی است [۱، ۲]. این خصوصیات منحصر به فرد اپی‌گالوکاتچین‌گالات (EGCG) را به عنوان یک ماده مؤثر درمانی مطرح کرده است [۳]. اثرات درمانی چای سبز و به طور خاص EGCG تاکنون بر روی بیماری‌های مختلفی از جمله سرطان سینه [۴]، سرطان روده، کولون، اثنی‌عشر، رکتوم و پانکراس [۵، ۶]، فشار خون [۷]، دیابت [۸]، چاقی [۹]، پوکی استخوان [۱۰] و غیره به اثبات رسیده است. پس برای استفاده از منافع این ماده، این پژوهش به تولید آزمایشگاهی عصاره آنتی‌اکسیدانی از چای سبز و آنالیز EGCG موجود در آن پرداخته است.

روش‌هایی که تا به حال برای استخراج EGCG به کار گرفته شدند اکثراً شامل استخراج با حلال بوده‌اند که از طرفی به دلیل مصرف زیاد انرژی و حلال مقرون به صرفه نیستند و از طرف دیگر تأمین و بازیابی حلال که در مواد غذایی و دارویی بسیار حائز اهمیت هستند نیز به طور کامل امکان پذیر نمی‌باشد. علاوه بر دلایل ذکر شده حلال‌های آلی مخصوصاً حلال‌های کلردار که در روش‌های قدیمی جداسازی مورد استفاده قرار می‌گیرند، برای محیط زیست مضر هستند. لذا با جایگزینی گاز CO<sub>2</sub> به عنوان متداول‌ترین حلال در فرایندهای فوق بحرانی، این مشکل برطرف شده است. زیرا این گاز علاوه بر مزایای ارزانی، داشتن دما و فشار فوق بحرانی پایین، غیر سمی و غیر اشتعال بودن دارای خواص بی‌اثر بر روی محیط زیست است [۱۱-۱۳]. عیب اساسی دی‌اکسیدکربن پایین بودن قطبیت آن به عنوان حلال است که برای غلبه بر این مشکل می‌توان از اصلاح‌گرهای قطبی برای تغییر قطبیت سیال فوق بحرانی و افزایش قدرت حلالیت آن به سمت آنالیت مورد نظر استفاده کرد. همچنین اصلاحگرها می‌توانند بر خوردهای ماتریس - آنالیت را کاهش داده و میزان کمی



شکل (۱) طرحواره‌ای از سیستم استخراج فوق بحرانی (۱-تانک دی‌اکسیدکربن ۲- غربال مولکولی ۳- سردکن گردشی ۴- پمپ فشار بالا ۵- شیر دستی ۶- پیش گرم کن ۷- ستون استخراج ۸- فیلترهای ورودی و خروجی ۹- گرم‌خانه ۱۰- سیستم تنظیم کننده فشار برگشتی ۱۱- ظرف جمع آوری نمونه)

### ۳-۲- آنالیز EGCG موجود در عصاره

جهت تعیین مقدار اپی‌گالوکاتچین‌گالات در نمونه‌های استخراجی، از HPLC ساخت شرکت Jasco مجهز به آشکارساز UV استفاده شده است. ستون مورد استفاده برای آنالیز ستون C<sub>18</sub> (به طول ۳۰۰ میلی‌متر، قطر داخلی ۳/۹ میلی‌متر و ضخامت فاز ساکن ۱۰ میکرومتر)، فاز متحرک مخلوط ۱۴٪ استونیتریل و ۸۶٪ اسید فسفوریک، ۰/۰۵٪، سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، دما برابر دمای محیط، دتکتور UV (طول موج ۲۸۰ نانومتر) و حجم تزریق شده ۲۰ میکرو لیتر بوده است. زمان بازداری برای EGCG، ۶/۱ دقیقه و منحنی کالیبراسیون بدست آمده است.  $y = 190.8x - 482.3$

### ۳- طراحی آزمایش‌ها

طراحی آزمایش با استفاده از نرم‌افزار آماری Minitab 15 به روش رویه‌ی پاسخ (RSM<sup>۱۱</sup>) با چهار فاکتور در پنج سطح مورد بررسی قرار گرفت. تمامی مقادیر از ۲- تا ۲+ کدگذاری شده‌اند به مقدار مرکزی، کد صفر به مقادیر بیشتر، کد مثبت و به مقادیر کمتر، کد منفی نسبت داده شده است. چهار متغیر مؤثر بر این فرایند دما (۴۰-۶۰°C)، فشار (۱۰-۳۰ Mpa)، شدت جریان سیال دی‌اکسید کربن فوق بحرانی (۱/۷-۰/۵ ml/min) و زمان استخراج دینامیک (۱۲۰-۴۰ دقیقه) بوده است. محدوده این پارامترها با توجه به شرایط بحرانی دی‌اکسیدکربن (دمای ۳۱/۱ درجه سانتیگراد و فشار ۷/۳۹

آزمایشات در ستون استخراج با مخلوط ۲ گرم چای سبز با ۳ گرم خرده شیشه (نسبت بهینه شده طبق [۱۵]) و ۱ میلی‌لیتر اتانول (ساخت شرکت غدیر با درجه خلوص ۹۹/۶-۹۹/۹ درصد) انجام شده است. پس از قرار دادن سل در داخل گرم‌خانه و رسیدن به دما و فشار مورد نظر، ابتدا زمان استخراج استاتیک (۲۵ دقیقه) و سپس زمان دینامیک مورد نظر با دبی ثابت از روی بستر سپری می‌گردد. با شکست فشار توسط شیر فشارشکن در خروجی، دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی به حالت زیر بحرانی تبدیل شده و خاصیت حلالیت بالای شبیه مایعات و ضریب نفوذ بالای شبیه گازها را از دست داده بنابراین قادر به جداسازی آسان مواد حل شده بوده است. نمونه‌های استخراجی در بطری کوچک حاوی آب دیونیزه شده که در داخل بشری حاوی مخلوط یخ، نمک و استن. قرار دارد، جمع‌آوری گردیده است. بعد از هر استخراج نمونه حاصل فیلتر و بعد از به حجم رسانده شدن برای آنالیز در مکان خنک و تاریک نگهداری شده است.

### ۲-۲- استخراج با سوکسله

برای محاسبه‌ی درصد بازیابی، نسبت EGCG بدست آمده در استخراج فوق بحرانی به مقدار EGCG حاصله از سوکسله (به عنوان کل EGCG موجود در چای سبز: استخراج صد درصد) در نظر گرفته می‌شود. استخراج به روش سوکسله با سه زمان متفاوت، با سه بار تکرار در هر تست، با ۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول و ۴ گرم چای سبز انجام شده است. که در نتیجه زمان بهینه ۷ ساعت و بازده ۱۶/۷ برابر استخراج ۱۰۰٪ حاصل گردیده است.

<sup>۱۱</sup> Response Surface Methodology

یک از تأثیرات بیانگر چگونگی تأثیر آن عامل بر پاسخ است. علامت مثبت برای این تأثیرها نشان از اثر افزایشی و علامت منفی نشان از اثر کاهشی دارد. ضریب تشخیص ( $R^2$ ) در مدل برابر با ۹۸/۴۰ درصد و ضریب تشخیص اصلاح شده ( $R^2$  (adj) برابر ۹۶/۹۹ درصد می‌باشد.

جدول ۲: طراحی آزمایش به صورت کدگذاری شده

میزان بازبایی EGCG (R)	زمان دینامیک (td)	دبی دی اکسید کربن (F)	دما (T)	فشار (P)	شماره آزمایش
۰/۴۱۰	۰	۰	۰	۰	۱
۰/۳۸۵	-۱	۱	-۱	-۱	۲
۰/۳۸۵	۱	۱	۱	-۱	۳
۰/۴۱۲	۰	۰	۰	۰	۴
۰/۳۴۸	-۱	۱	۱	۱	۵
۰/۴۳۴	۰	۰	-۲	۰	۶
۰/۳۹۴	۱	-۱	-۱	۱	۷
۰/۳۲۵	۱	-۱	۱	-۱	۸
۰/۴۳۴	۱	۱	-۱	۱	۹
۰/۴۳۵	۱	۱	-۱	-۱	۱۰
۰/۴۰۰	۱	-۱	-۱	-۱	۱۱
۰/۳۳۹	-۱	-۱	-۱	-۱	۱۲
۰/۴۲۰	۱	۱	۱	۱	۱۳
۰/۳۶۸	۱	-۱	۱	۱	۱۴
۰/۳۲۶	-۱	-۱	-۱	۱	۱۵
۰/۴۱۱	۰	۰	۰	۰	۱۶
۰/۲۷۷	۰	۰	۰	-۲	۱۷
۰/۳۹۵	۰	۰	۰	۰	۱۸
۰/۳۰۰	-۱	-۱	۱	۱	۱۹
۰/۳۴۶	۰	۰	۲	۰	۲۰
۰/۴۳۴	۰	۲	۰	۰	۲۱
۰/۴۱۷	۰	۰	۰	۰	۲۲
۰/۲۳۰	-۱	-۱	۱	-۱	۲۳
۰/۴۱۵	۰	۰	۰	۰	۲۴
۰/۴۱۵	۰	۰	۰	۰	۲۵
۰/۳۳۰	۰	-۲	۰	۰	۲۶
۰/۳۵۷	۰	۰	۰	۲	۲۷
۰/۳۷۹	-۱	۱	-۱	۱	۲۸
۰/۲۹۸	-۱	۱	۱	-۱	۲۹
۰/۳۱۰	-۲	۰	۰	۰	۳۰
۰/۴۳۹	۲	۰	۰	۰	۳۱

مگاپاسکال)، لزوم استخراج در شرایط فوق بحرانی، عملکرد بهینه در شرایط مناسب و عملی و یک سری آزمایش غربالگری انتخاب شده‌اند. مقادیر کدگذاری شده و نیز مقدار واقعی مربوط به هر کد برای هر کدام از فاکتورها در جدول ۱ آورده شده است. در جدول ۲، آزمایشات طراحی شده و نتایج حاصل از آزمایشات بر حسب کدهای مربوط به سطوح هر پارامتر، نشان داده شده است. طراحی آزمایش‌ها به صورت کاملاً تصادفی انجام شده و همان طور که در این جدول مشخص شده است، آزمایش‌های مربوط به نقاط مرکزی جهت محاسبه خطای خالص، برآورد بهتر واریانس خطای آزمایش و تعیین تفاوت آماری داده‌ها با کد (۰، ۰، ۰، ۰)، هفت بار تکرار شده‌اند.

جدول ۱: سطوح کدگذاری شده و مقادیر واقعی پارامترهای آزمایش

کدگذاری سطوح	فشار P [MPa]	دما T [°C]	دبی جریان F [ml/min]	زمان دینامیک td [min]
-۲	۱۰	۴۰	۰/۵	۴۰
-۱	۱۵	۴۵	۰/۸	۶۰
۰	۲۰	۵۰	۱/۱	۸۰
+۱	۲۵	۵۵	۱/۴	۱۰۰
+۲	۳۰	۶۰	۱/۷	۱۲۰

#### ۴- نتایج و بحث

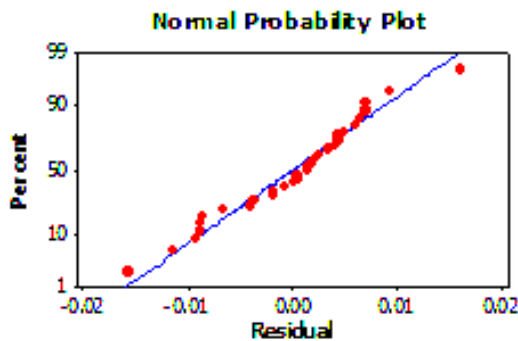
برای بیان رابطه میان بازبایی EGCG و متغیرهای عملیاتی یک رابطه درجه دوم فرض شده است که ضرایب مدل رگرسیون مرتبه‌ی دوم بر اساس متغیرهای کدگذاری شده برای بازبایی EGCG و مقادیر  $p$  متناظر با هر کدام در جدول ۳ ارائه شده است. در این پروژه پارامترهای با  $p < 0.01$  به عنوان پارامترهای بسیار مؤثر، پارامترهای با  $p < 0.05$  به عنوان پارامترهای مؤثر و پارامترهایی که مقدار  $p$  آن‌ها بیشتر از  $0.05$  است به عنوان پارامترهای بی‌اثر شناخته می‌شوند. با توجه به نتایج جدول ۳ می‌توان رابطه ۱ را برای بیان تغییرات بازبایی EGCG نسبت به پارامترهای عملیاتی نوشت.

$$R = 0.4107 + 0.01380P - 0.0248T + 0.0254F + 0.0339t_d - 0.0243P^2 - 0.00609T^2 - 0.00806F^2 - 0.00997t_d^2 + 0.01400(P \times T) + 0.00550(T \times t_d) \quad (1)$$

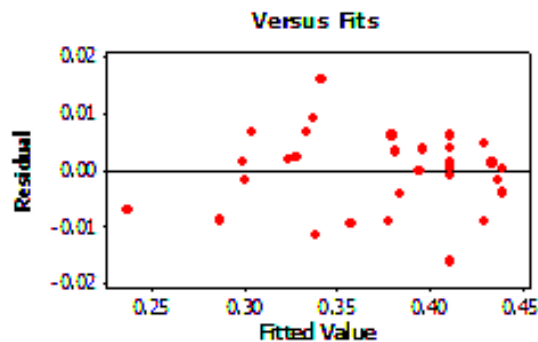
ضرایب رگرسیونی، مقدار تأثیر هر یک از فاکتورها بر میزان بازبایی EGCG را نشان می‌دهد. قدر مطلق اندازه هر

بهینه‌سازی آزمایشگاهی استخراج فوق بحرانی اصلاح شده اپی‌گالوکاتچین گالات از جای سبز با کمک حلال اتانول

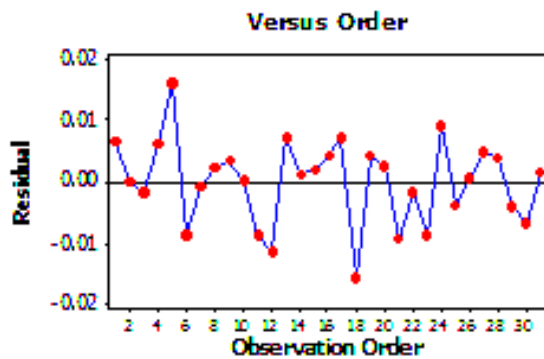
متغیر، نرمال بودن توزیع متغیر وابسته، ثابت بودن واریانس متغیر وابسته برای مقادیر مختلف متغیر مستقل و مستقل بودن مشاهدات است [۲۴].



(الف)



(ب)



(پ)

شکل (۲) نمودار باقی‌مانده میزان بازیابی EGCG

جدول (۳) ضرایب رگرسیونی مدل مرتبه دوم میزان بازیابی EGCG

ترم	ضریب رگرسیونی	p-value
عرض از مبدا	۰/۴۱۰۷۱۴	۰/۰۰۰
فشار	۰/۰۱۳۸۳۳	۰/۰۰۰
دما	-۰/۰۲۴۷۵۰	۰/۰۰۰
نرخ جریان	۰/۰۲۵۴۱۷	۰/۰۰۰
زمان دینامیک	۰/۰۳۳۹۱۷	۰/۰۰۰
فشار × فشار	-۰/۰۲۴۳۴۵	۰/۰۰۰
دما × دما	-۰/۰۰۶۰۹۵	۰/۰۰۳
نرخ جریان × نرخ جریان	-۰/۰۰۸۰۵۹	۰/۰۰۰
زمان دینامیک × زمان دینامیک	-۰/۰۰۹۹۷۰	۰/۰۰۰
دما × فشار	۰/۰۱۴۰۰۰	۰/۰۰۰
نرخ جریان × فشار	۰/۰۰۱۰۰۰	۰/۶۷۴
زمان دینامیک × فشار	-۰/۰۰۱۸۷۵	۰/۴۳۴
نرخ جریان × دما	۰/۰۰۳۳۷۵	۰/۱۶۸
زمان دینامیک × دما	۰/۰۰۵۵۰۰	۰/۰۳۲
نرخ جریان × زمان دینامیک	-۰/۰۰۱۷۵۰	۰/۴۶۵

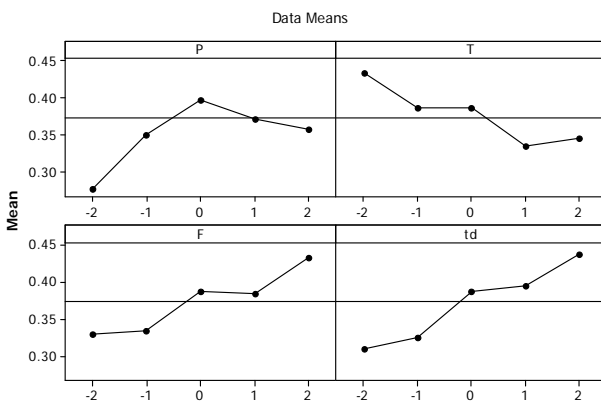
جهت بررسی صحت مدل از  $p$ -value مربوط به جدول آنالیز واریانس داده‌ها (جدول ۴) استفاده می‌شود. نتایج این جدول بیانگر این مطلب است که مدل رگرسیونی (همچنین پارامترهای خطی، مربع و متقابل موجود در مدل) دارای مقدار  $p$  کمتر یا مساوی با  $۰/۰۰۱$  بوده و بنابراین این مدل برای داده‌های آزمایشگاهی مناسب است و همچنین چون مقدار  $p$  مربوط به فقدان برازش بیشتر از  $۰/۰۵$  است، بنابراین میانگین مربعات مربوط به فقدان برازش در مقایسه با میانگین مربعات خطای خالص دارای اهمیت کمتری است و می‌توان نتیجه گرفت که برازش به خوبی انجام شده است.

یکی دیگر از راه‌های بررسی صحت مدل، استفاده از نمودارهای باقی‌مانده می‌باشد. در شکل ۲ نمودارهای باقی‌مانده برای بازیابی EGCG آورده شده است. بخش مهمی از آنالیز رگرسیون، بررسی فرض‌های خطی بودن رابطه بین دو

جدول (۴)  $p$ -value مربوط به آنالیز واریانس داده‌ها

منبع تغییر	مدل رگرسیونی	پارامترهای خطی	مدل رگرسیونی	پارامترهای مربع	پارامترهای متقابل	خطای باقیمانده	عدم برازش	خطای خالص	کل
$p$ -value	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	-	۰/۲۰۹	-	-

کد ۱+ (۵۵ درجه سانتیگراد) به دلیل کاهش دانسیته و کاهش قدرت حلالیت سیال فوق بحرانی سبب کاهش میزان بازیابی می‌شود. اما از دمای ۵۵ به ۶۰ درجه سانتیگراد به دلیل غلبه افزایش فشار بخار اجزاء حل شونده و افزایش قدرت حلالیت عصاره درون دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی، میزان بازیابی EGCG زیاد می‌شود [۱۶]. همچنین مطابق این شکل افزایش فشار تا کد ۰ (۲۰ مگاپاسکال) به دلیل افزایش دانسیته دی‌اکسیدکربن، کاهش فاصله میان مولکول‌ها و افزایش برهم کنش‌های مولکولی میان حلال و عصاره، قدرت حلالیت سیال فوق بحرانی و میزان بازیابی EGCG را افزایش می‌دهد ولی از کد ۰ تا ۲ (۳۰ مگاپاسکال) اثر کاهش نفوذپذیری و ضریب انتقال جرم بر افزایش دانسیته غلبه کرده و با افزایش فشار میزان بازیابی EGCG کاهش می‌یابد [۱۳].



شکل (۳) نمودار اثرات اصلی پارامترهای مؤثر بر میزان بازیابی EGCG

#### ۲-۴- بررسی اثرات متقابل

برای بررسی اثرات متقابل میان فاکتورها از نمودار اثرات متقابل استفاده می‌شود. نمودار اثرات متقابل، نموداری است از میانگین‌ها برای هر سطح از یک فاکتور با سطح دومین فاکتور که ثابت نگه داشته شده است. انحراف خطوط از حالت موازی و میزان این انحراف به ترتیب نشان دهنده اثرات متقابل و درجه‌ی این تقابل است [۲۴]. نمودار شکل ۴ نمودار کلیه اثرات متقابل برای هر جفت از فاکتورها را بر میزان بازیابی EGCG نشان می‌دهد. دما - فشار و زمان دینامیک-دما دارای اثر متقابل هستند. در حالی که بقیه فاکتورها مانند دبی دی‌اکسیدکربن - زمان دینامیک دارای اثر متقابل در سطح معنی‌داری نیستند همانطور که جدول ۳ هم بر این امر دلالت دارد. در شکل ۵ و ۶ اثرات متقابل موجود بین پارامترها بررسی

همانگونه که در شکل ۲ نیز دیده می‌شود نمودار احتمال نرمال (الف) نشان دهنده نرمال بودن باقی مانده‌ها هستند زیرا نقاط در اطراف خط راست پراکنده شده‌اند. در نمودار (ب) باقی مانده‌ها به صورت تصادفی در اطراف خط افقی صفر پراکنده شده‌اند و الگو و ساختار خاصی در نقاط مشاهده نمی‌شود بنابراین فرض ثابت بودن واریانس باقی مانده‌ها نیز قابل قبول می‌باشد. فرض دیگری که برای آزمون فرضیه رگرسیون لازم است مستقل بودن مشاهدات است. نمودارهای باقی مانده که در مقابل ترتیب مشاهدات (پ) رسم شده‌اند از الگو و ساختار خاصی پیروی نمی‌کنند و این نشان دهنده مستقل بودن باقی مانده‌ها و مشاهدات از یکدیگر است که همگی نمودارها بر صحت مدل دلالت دارند.

#### ۴-۱- بررسی اثر فاکتورهای اصلی

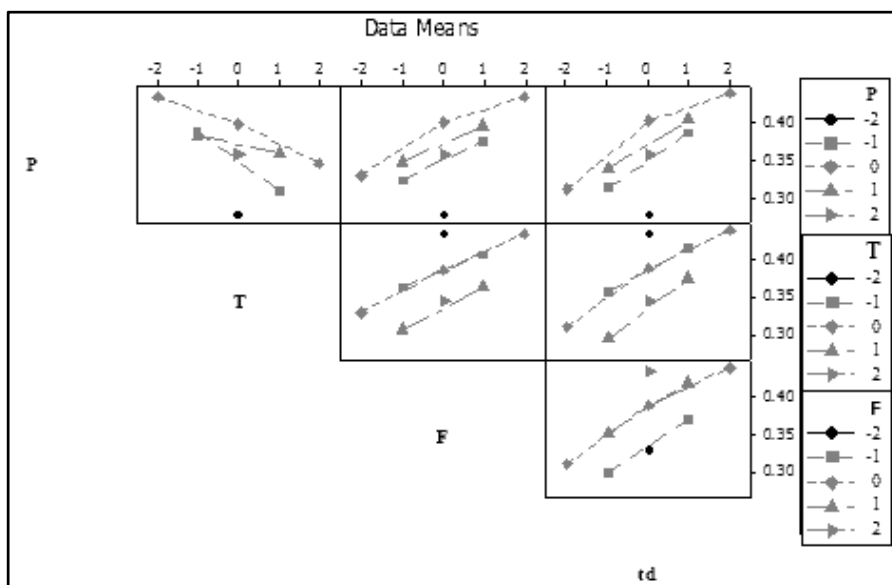
از روند نمودار اثرات اصلی برای بررسی اثر فاکتورها استفاده می‌شود. نقاط این نمودار، میانگین متغیر پاسخ در سطوح هر فاکتور بوده که با یک خط مرجع در میانگین کل داده‌های پاسخ ترسیم شده‌اند [۲۴]. نمودارهای شکل ۳ نشان می‌دهند که دبی دی‌اکسید کربن (F) و زمان دینامیک (td) دارای اثر مثبت، دما (T) دارای اثر منفی و در دماهای بالاتر اندکی مثبت و فشار (P) ابتدا دارای اثرافزایشی و سپس کاهش بر میزان بازیابی EGCG هستند. قابل ذکر است که در هر نمودار بقیه پارامترها در مقدار مرکزی ثابت نگه داشته‌اند. در طی زمان دینامیک حلال تازه از روی نمونه‌ها عبور می‌کند. تا زمانی که نیروی محرکه‌ی مؤثری بین سیال تازه و نمونه برای انتقال جرم وجود داشته باشد افزایش زمان دینامیک باعث افزایش میزان بازیابی EGCG می‌گردد. اما با کاهش نیروی محرکه لازم جهت انتقال جرم در اثر کاهش غلظت حل شونده در نمونه یا اتمام کمک حلال (استخراج بدون کمک حلال انجام نمی‌شود) افزایش زمان دینامیک تغییر قابل ملاحظه‌ای در میزان بازیابی ایجاد نمی‌کند [۱۲] به همین دلیل ادامه زمان دینامیک به بیش از ۱۲۰ دقیقه و مصرف بیشتر حلال (دی‌اکسید کربن) لزومی ندارد.

افزایش نرخ جریان نیز با کاهش ضخامت لایه فیلمی اطراف ذرات جامد و افزایش ضریب انتقال جرم فیلمی، بر مقاومت انتقال جرم اطراف ذرات جامد و مقاومت سطح مشترک مربوط به انتقال جزء حل شونده از ماتریس نمونه به سیال فوق بحرانی غلبه می‌کند و سبب افزایش در میزان بازیابی EGCG می‌شود [۲۵]. مطابق شکل ۳ افزایش دما تا

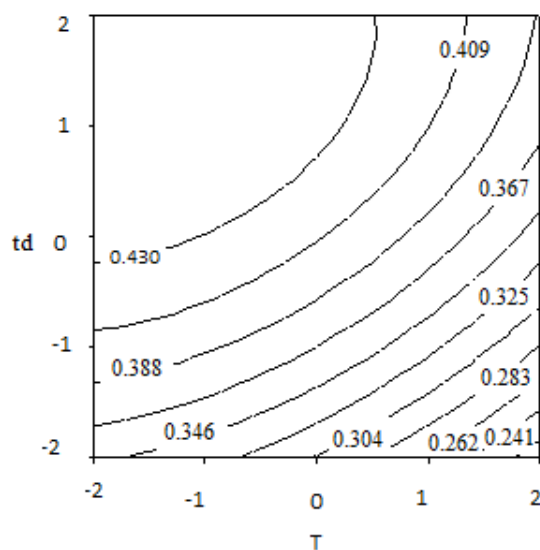
### بهینه‌سازی آزمایشگاهی استخراج فوق بحرانی اصلاح شده اپی‌گالوکاتچین گالات از چای سبز با کمک حلال اتانول

دبی‌دی اکسید کربن به ترتیب دارای مقادیر ثابت ۲۰ MPa و ۱/۱ ml/min می‌باشند. در این شکل دیده می‌شود که در دماهای پایین‌تر در زمان کوتاه‌تری به ماکزیمم میزان بازیابی می‌رسیم و بنابراین میزان مصرف دی‌اکسید کربن کمتر است. این امر می‌تواند به این دلیل باشد که با افزایش دما، کاهش دانسیته سیال فوق بحرانی بر افزایش فشار بخار جز حل‌شونده غلبه کرده و قدرت حلالیت سیال کم می‌گردد، بنابراین برای رسیدن به یک میزان بازیابی مشخص به زمان بیشتری نیاز است همچنین از این شکل می‌توان نتیجه گرفت که بیشترین میزان بازیابی EGCG در دماهای پایین و زمان دینامیک بالا خواهد بود.

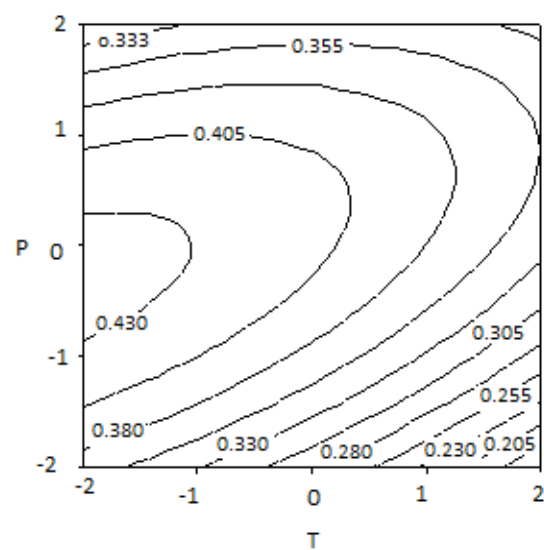
در شکل ۵ نمودار کانتور مربوط به میزان بازیابی EGCG به صورت تابعی از فشار و دما نشان داده شده و زمان دینامیک و نرخ جریان به ترتیب دارای مقادیر ثابت ۸۰ دقیقه و ۱/۱ ml/min می‌باشند. همان‌طور که در این شکل مشخص است تا فشارهای نزدیک به ۲۷ مگاپاسکال با افزایش دما از ۴۰°C به ۶۰°C به دلیل غالب بودن اثر کاهش دانسیته میزان بازیابی EGCG کاهش می‌یابد اما در فشارهای بالاتر با افزایش دما در فشار ثابت به دلیل تأثیر افزایش فراریت جزء حل‌شونده میزان بازیابی EGCG افزایش خواهد یافت. در شکل ۶ نمودار کانتور میزان بازیابی EGCG به صورت تابعی از زمان دینامیک و دما نشان داده شده است. در این نمودارها فشار و



شکل (۴) اثرات متقابل فاکتورهای موثر بر میزان بازیابی EGCG



شکل (۶) نمودار کانتور میزان بازیابی EGCG به صورت تابعی از دما و زمان دینامیک



شکل (۵) نمودار کانتور میزان بازیابی EGCG به صورت تابعی از فشار و دما

## ۴-۳- بهینه سازی میزان بازیابی EGCG

شرایط بهینه سیستم می تواند جهت پیاده سازی فرایند در مقیاس نیمه صنعتی و صنعتی بسیار مورد استفاده قرار گیرد. به منظور بهینه سازی از مدل ارائه شده (رابطه ۱) نسبت به هر یک از متغیرهای مستقل مشتق جزئی گرفته شده و برابر صفر قرار داده می شود. به این ترتیب با حل دستگاه معادلات جبری به دست آمده مقدار هر یک از متغیرها در نقطه بهینه به دست می آید. شرایط بهینه و مقدار بهینه میزان بازیابی EGCG به ترتیب، دمای ۴۳/۷°C درجه سانتی گراد، فشار ۱۹/۲۹ MPa، نرخ جریان ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه و زمان دینامیک ۱۰۶ دقیقه با میزان بازیابی ۰/۴۶۲ بدست آمده است. با توجه به اثر کاهشی دما و اثر افزایشی دبی و زمان دینامیک، دمای بهینه نزدیک به نقطه مینیمم و دبی و زمان دینامیک بهینه نزدیک به نقطه ماکزیمم و فشار بهینه نیز در نزدیکی نقطه عطفی است که پس از آن اثر افزایشی فشار عکس می شود. مشابه این نتایج بهینه سازی در مدل سازی ریاضی این فرایند نیز بدست آمده است [۲۶].

## ۵- نتیجه گیری

در این پروژه نتایج حاصل از طراحی آزمایشها بر اساس طراحی مرکب مرکزی مورد بررسی قرار گرفته است. بدین منظور با استفاده از روش رویه‌ی پاسخ (RSM) یک مدل چند جمله‌ای مرتبه‌ی دوم برای بیان تغییرات میزان بازیابی EGCG نسبت به متغیرهای عملیاتی ارائه شده است. تأثیر پارامترهای عملیاتی مختلف روی میزان بازیابی استخراج EGCG مورد بررسی و با استفاده از مدل ارائه شده، شرایط بهینه سیستم بدست آمده است. نتایج نشان داده که روش رویه پاسخ به خوبی می تواند داده‌های تجربی حاصل از استخراج EGCG را برازش کند و نقطه بهینه نیز تطابق مناسبی با داده‌های آزمایشگاهی داشته است.

## تشکر و قدردانی

از دانشگاه صنعتی اصفهان و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به دلیل تأمین تجهیزات، امکانات لازم و حمایت مالی تشکر و قدردانی می شود.

## مراجع

- [1] L. A. Mitscher, M. J. Jung, D. Shankel, J. Dou, L. Steeleand, and S. P. Pillai (1997) "Chemoprotection: A Review of the Potential Therapeutic Antioxidant Properties of Green Tea (*Camellia sinensis*) and Certain of Its Constituents", *Journal of Medicinal Research Reviews*, 17(4), 327-365.
- [2] D. L. Joshua, and R. J. Elias (2010) "The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention", *Journal of Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501, 65-72.
- [3] D. A. Balentine (1997) *Tea. in: Kroschwitz, J.I. & Howe-Grant, M., eds., Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*, 4th ed. New York: John Wiley & Sons Inc; pp. 746-768.
- [4] A. Moreno-Aspitia, and E. A. Perez (2009) "Treatment options for breast cancer resistant to anthracycline and taxane", *Mayo Clinic Proceedings*, 84, 533-545.
- [5] V.E. Steele, D. Bagheri, D. A. Balentine, C. W. Boone, R. Mehta, M. A. Morse, S. Sharma, C. C. Sigman, G. D. Stoner, M. J. Wargovich, J. H. Weisburger, S. Zhu, and G. J. Kelloff (1999) "Preclinical efficacy studies of green and black tea extracts. Proceedings of the society for experimental biology and medicine", *Journal of Nutrition Cancer*, 220, 210-212.
- [6] T. Kuzuvar, M. Sukanuma, and H. Fujiki (2008) "Green tea catechin as a chemical chaperone in cancer prevention", *Cancer Letters*, 261, 12-20.
- [7] H.X. Negishi, J. Xu, K. Ikeda, M. Njelekela, Y. Nara, and Y. Yamori (2004) "Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats", *Journal of Nutrition*, 34, 38-42.
- [8] M. E. Waltner-Law, X. L. Wang, B. K. Law, R. K. Hall, M. Nawano, and D. K. Granner (2002) "Epigallocatechingalletea, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production", *Journal of Biological Chemistry*, 277, 34933-4940.
- [9] D. Richarda, K. Kefia, U. A. Barbea Poli, P. Bauseroa and F. Visioli (2009) "Weight and plasma lipid control by decaffeinated green tea", *Journal of Pharmacological Research*, 59, 351-354.
- [10] A. Devine, J. M. Hodgson, I. M. Dick, and R. L. Prince (2007) "Tea drinking is associated with benefits on bone density in older women, American", *Journal of Clinical Nutrition*, 86, 1243-47
- [11] J. A. Mendiola, M. Herrero, A. Cifuentes and E. Ibáñez (2007) "Use of Compressed Fluids for Sample Preparation: Food Applications", *Journal of Chromatography A*, 1152, (1-2), 234-246.
- [12] S. M. Ghoreishi and E. Bataghva (2011) "Supercritical Extraction of Evening Primrose Oil: Experimental Optimization via Response Surface Methodology", *Journal of American Institute of Chemical Engineers (AIChE)*, 57 (12), 3378-84.



- “Supercritical fluid extraction of catechins from *Cratoxylum prunifolium* Dyer and subsequent purification by high-speed counter-current chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 898, 75–81.
- [۲۱] علی فرشادفر، ۱۳۸۰، "اصول و روشهای پیشرفته آماری"، کرمانشاه انتشارات طاق بستان، چاپ اول.
- [۲۲] داگلاس سی. مونت گمری، ۱۳۸۰، "طرح و تحلیل آزمایشها"، ترجمه غلامحسین شاهکار، مرکز نشر دانشگاهی، تهران، چاپ اول.
- [23] G. Anitescu, L. L. Tavlarides (2006) "Supercritical extraction of contaminants from soils and sediments", *Journal of Supercritical Fluids*, 38, 167–180.
- [۲۴] علیرضا نگهبان، ۱۳۸۰، "پردازش داده ها با Minitab نگرارش ۱۳"، انتشارات جهاد دانشگاهی فارس، شیراز.
- [25] C. Yi, J. Shi, S. J. Xue, Y. Jiang and D. Li (2009) "Effects of supercritical fluid extraction parameters on lycopene yield and antioxidant activity", *Journal of Food Chemistry*, 113 (4), 1088-1094.
- [26] S. M. Ghoreishi, and E. Heidari (2012) "Extraction of epigallocatechin Gallate from green tea via modified supercritical CO<sub>2</sub>: Experimental, modeling and optimization", *Journal of Supercritical Fluids*, 72, 36-45.
- [13] S. M. Ghoreishi, E. Bataghva and A. A. Dadkhah (2011) "Response Surface Optimization of Essential Oil and Diosgenin Extraction from *Tribulus terrestris* via Supercritical Fluid Technology", *Journal of Chemical Engineering Technology*, 34, 1–10.
- [14] E. Dauksas, P. R. Venskutonis and B. Sivik (2002) "Supercritical fluid extraction of borage (*Borago officinalis* L.) Seeds with pure CO<sub>2</sub> and its mixture with caprylic acid methyl ester", *Journal of Supercritical Fluids*, 22 (3), 211-219.
- [15] S. M. Ghoreishi and S. Sharifi (2001) "Modeling of Supercritical Extraction of Mannitol from Plane Tree Leaf", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 1073-1048.
- [16] S. M. Ghoreishi, E. Mardani and H. S. Ghaziaskar (2011) "Separation of  $\gamma$ -linolenic and other polyunsaturated fatty acids from Boraginaceae via supercritical CO<sub>2</sub>", *Journal of separation science*, 34, 233–240.
- [17] A. Akgerman, C. Erkey, and S. M. Ghoreishi (1992) "Supercritical Extraction of Hexachlorobenzene from Soil", *Journal of Industrial and Engineering Chemistry Research*, 31, 333-339.
- [18] S. M. Ghoreishi, R. Gholami-Shahrestani and H. S. Ghaziaskar (2009) "Experimental and Modeling Investigation of Supercritical Extraction of Mannitol from Olive Leaves", *Chemical Engineering & Technology*, 32, 45-54.
- [19] H. S. Park, H-K. Choi, S. J. Lee, K. W. Park, S. G. Choi, and K. H. Kim (2007) "Effect of mass transfer on the removal of caffeine from green tea by supercritical carbon dioxide", *Journal of Supercritical Fluids*, 42, 205-211.
- [20] X. L. Cao, Y. Tian, T. Y. Zhang, and Y. Ito (2000)

## Experimental Optimization of Modified Supercritical Extraction of Epigallocatechin Gallate from Green Tea with Ethanol Co- Solvent

E. Heidari<sup>1</sup>, S. M. Ghoreishi<sup>2,\*</sup>

1. Department of Chemical Engineering, Isfahan University of Technology, Iran.
2. Department of Chemical Engineering, Isfahan University of Technology, Iran.  
(e-mail: ghoreishi@cc.iut.ac.ir; phone: +98-311-3915604)

---

### ABSTRACT

In this study, Epigallocatechin Gallate (EGCG) extraction from green tea was investigated by modified supercritical CO<sub>2</sub> and Soxhlet extraction. Ethanol (as a co-solvent or entrainer) was used to change the polarity of EGCG-supercritical CO<sub>2</sub> mixture in order to enhance the recovery efficiency. A second order polynomial model was presented to study the variation of EGCG recovery versus operating variables by response surface methodology (RSM). The effects of operating conditions of extraction such as temperature, pressure, flow rate of supercritical CO<sub>2</sub> and dynamic time were investigated via RSM. Optimum recovery of EGCG (0.462 g/g) was obtained at 19.3 MPa, 43.7 °C, 106 min (dynamic) and 1.5 ml/min (CO<sub>2</sub> flow rate).

---

### ARTICLE INFO

Article history:

Received: 19 May 2012

Received in revised form: 1 Jan 2013

Accepted: 17 Jan 2012

---

Key words:

Supercritical extraction

Epigallocatechingallete  
(EGCG)

Soxhlet

Co-Solvent

Response Surface Methodology

---

All right reserved.

---

\* Corresponding author