

بهینه یابی شرایط استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی و پلی فنولی عصاره گیاه متکا (*Ferulla Persica*) با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)

بهداد شکرالهی^۱، یانچشمه^۱، محمد علی حصاری نژاد^۲، نگار رضایی^۳، آزاده سلیمی^۴، غزل شمشادی^۳، مهناز کاظم زاده^۳، اشکان جلی جوان^{۵*}

۱ دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲ استادیار، گروه فرآوری مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد

۳ دانش آموخته دکتری حرفه ای دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان

۴ استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان

۵ دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۱/۲۸)

چکیده

نظر به اهمیت روز افزون نقش آنتی اکسیدانها بر سلامتی و افزایش پایداری و نگهداری محصولات غذایی و اثرات سوء اثبات شده حاصل از آنتی اکسیدان-های سنتزی، امروزه استفاده از آنتی اکسیدانهای طبیعی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه معرفی پتانسیل های عصاره گیاه متکا به عنوان یک منبع بومی و جدید آنتی اکسیدانی و پلی فنولی بوده است. در این راستا به منظور بهینه یابی شرایط عصاره گیری از برگ گیاه متکا، از روش سطح پاسخ (RSM) در ۳ سطح دمایی (۲۰، ۴۰ و ۶۰ درجه سانتی گراد)، زمانی (۲، ۳ و ۴ ساعت) و نسبت آب به اتانول (۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد) مورد بررسی قرار گرفت. پاسخ های مورد بررسی برای بهینه یابی شرایط استخراج عصاره شامل تعیین بازده استخراج، میزان فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای کل ترکیبات فنولی بودند. بر اساس نتایج حاصل از نرم افزار، مدل چندجمله ای درجه ی دوم برای بهینه سازی شرایط استخراج، به عنوان بهترین مدل تعیین گردید. شرایط بهینه با توجه به شاخص های مورد نظر، زمان ۲ ساعت و دمای ۲۰°C و نسبت حلال ها به هم نیز ۷۹/۵۸ درصد به دست آمد که در این شرایط بهینه بازده ۱۷/۶۱۰۵ درصد و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی با EC₅₀ برابر ۸۷/۲۰۹۵ (μg/ml) و مقدار فنول کل ۰/۱۴۰۴۲۸ (mg GAE/g) محاسبه گردید.

کلید واژگان: گیاه متکا، ترکیبات پلی فنولی، فعالیت آنتی اکسیدانی، استخراج، روش سطح پاسخ

* نویسنده مسئول: jebellija@profs.semnan.ac.ir

۱- مقدمه

آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که از تشکیل رادیکال های آزاد در سلول ها جلوگیری می کنند و بنابراین نقش مهمی در پیشگیری از سرطان، بیماری های قلبی و عروقی دارند. علاوه بر این آنتی اکسیدان ها با حذف رادیکال آزاد در مواد غذایی باعث افزایش پایداری و ماندگاری محصولات غذایی می گردند [۲۱]. در سال های اخیر علیرغم کارایی و پایداری بالا و نیز ارزانی نسبی آنتی اکسیدان های سنتزی، به دلیل خاصیت سرطان زایی و اثرات سو مصرف این ترکیبات، مصرف آن ها کاهش یافته است [۵-۳]. از این رو تمایل به استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی به طور گسترده ای رو به افزایش بوده است. تحقیقات نشان داده است که گیاهان علاوه بر تامین انرژی و مواد مغذی مورد نیاز بدن، به دلیل دارا بودن ترکیبات آنتی اکسیدانی تاثیر مثبت بر سلامت انسان دارند. تحقیقات بسیاری نشان داده اند که ترکیبات گیاهی دارای اثرات ضد التهابی، ضد توموری، ضد سرطانزایی، ضد ویروسی و ضد باکتریایی می باشند [۶]. با توجه به اینکه درصد قابل توجهی از گونه های گیاهی ایران را گیاهان دارویی تشکیل می دهند، لذا شناسایی و معرفی گیاهان جدید به منظور استخراج این ترکیبات از اهمیت بالایی برخوردار است.

گیاه متکا با نام علمی *Ferula Persica* از خانواده ی چتریان می باشد که از گیاهان بومی استان سمنان بوده و به عنوان غذا و نیز در طب سنتی به منظور کاهش فشار خون، رفع بیماری های با منشأ عصبی و اثرات ضد سرطانی استفاده می گردد [۷]. اکثر گونه های این گیاه اثرات ضد سرطانی، فعالیت آنتی اکسیدانی و نیز فعالیت ضد میکروبی از خود نشان داده اند [۸]. تاکنون هیچ مطالعه و پژوهشی روی خصوصیات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی گیاه متکا صورت نگرفته است لذا با توجه به گستردگی و مقدار فراوان این گیاه دارویی، بررسی علمی، شناسایی ترکیبات این گیاه بومی ضروری به نظر می رسد.

استخراج اولین مرحله اساسی را در تحقیقات گیاهان دارویی تشکیل می دهد [۶]. بنابراین به کارگیری یک روش استخراج مناسب و بهینه سازی شرایط آن، جهت استحصال حداکثر این ترکیبات بدون آسیب حرارتی، بسیار حائز اهمیت است، زیرا

روش استخراج و شرایط استخراج عصاره بر کارایی استخراج و نوع ترکیبات عصاره حاصل نقش به سزایی دارند [۹]. روش سطح پاسخ (RSM) مجموعه ای از تکنیک های آماری و ریاضی است که برای توسعه، بهبود و بهینه سازی فرآیندهایی به کار می رود که پاسخ مورد نظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تاثیر قرار می گیرد و هدف، توصیف رابطه میان پاسخ و متغیرهای مستقل توسط مدل های ریاضی و بهینه سازی این پاسخ می باشد [۱۱ و ۱۲].

در سال های اخیر این روش، توجه بسیاری را در رابطه با بهینه کردن فرآیندها به خود معطوف کرده است نتایج به دست آمده از تحقیقات مختلف، بیانگر کارایی مفید روش سطح پاسخ در بهینه سازی فرایند استخراج بوده است [۱۵-۱۳]. در سال های اخیر مطالعات زیادی در زمینه بهینه یابی استخراج آنتی اکسیدان های گیاهی مانند پالم آکنه [۱۶]، قارچ ژله ای [۱۷]، سیوس برنج [۱۸]، مرزنجوش [۱۹] و برگ لوبیای بستنی [۲۰] با استفاده از روش سطح پاسخ صورت گرفته است. بنابراین هدف از این مطالعه معرفی پتانسیل های عصاره گیاه متکا به عنوان یک منبع بومی جدید آنتی اکسیدانی و پلی فنولی و بهینه یابی و یافتن مناسب ترین شرایط استخراج عصاره گیاه متکا با استفاده از روش سطح پاسخ می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد اولیه

گیاه متکا از حوالی مناطق سرسبز شهرستان سمنان (پرور و شهمیرزاد)، در اوایل فصل بهار جمع آوری شد و در اداره جهاد کشاورزی تایید جنس و گونه صورت گرفت. قسمت های هوایی گیاه متکا بلافاصله پس از جمع آوری و جداسازی ناخالصی ها در سایه خشک گردید و تا زمان آزمایش در کیسه های محافظ در برابر هوا و رطوبت در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگه داری شدند تا ترکیبات فنولی موجود در گیاه دچار آسیب نگردند. در زمان آزمایش های مربوطه نمونه های خشک شده توسط آسیاب مکانیکی به ذرات بسیار ریز تبدیل و از الک با مش ۴۰ گذرانده شدند. کلیه معرف ها، استانداردها، مواد شیمیایی و

۲-۲-۳- ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد

DPPH

فعالیت احیای رادیکال آزاد با اندازه‌گیری فعالیت احیای ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) توسط عصاره و مقدار رنگبری محلول بنفش DPPH به رنگ زرد ارزیابی می‌شود. توانایی مهار رادیکال آزاد به روش Sarker و همکاران [۲۳] با کمی تغییرات انجام شد. برای این منظور، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۳۰۰-۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از عصاره‌ها در حلال متانول آماده شدند. یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت یک میلی‌مولار) به ۳ میلی‌لیتر از عصاره افزوده و مخلوط حاصله به شدت هم‌زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند و سپس میزان جذب محلول‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. لازم به ذکر است که در نمونه کنترل، عصاره با ۳ میلی‌لیتر متانول جایگزین شد.

معمولاً برای مقایسه فعالیت ضد رادیکالی عصاره‌های مختلف از فاکتوری تحت عنوان EC50 استفاده می‌شود. طبق تعریف EC50 به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در آن ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار شوند. بنابراین هر چه این غلظت کم‌تر باشد، نشان‌دهنده این است که عصاره مورد نظر فعالیت ضد رادیکالی بیش‌تری دارد.

۲-۳- طرح آزمایش

در این پژوهش بهینه‌سازی عوامل استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی و پلی فنولی گیاه مورد آزمایش با استفاده از RSM صورت گرفته است. در این تحقیق طرح مرکب مرکزی متمرکز شده^۵ (FCCD) با ۳ متغیر مستقل و شش تکرار در نقطه مرکزی طرح، به منظور یافتن اثر متغیرهای مستقل (نسبت اتانول به آب، دما و زمان) بر بازده استخراج، میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی و میزان فنول کل مورد استفاده قرار گرفت. سطوح متغیرهای مستقل به صورت حقیقی و کد شده برای این پژوهش در جدول ۱، ارایه شده است. زمان‌های استخراج دو، سه و چهار ساعت، دماهای استخراج شامل ۲۰، ۴۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد و همچنین نسبت حلال‌ها به هم ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد بود که منظور از ۱۰۰ درصد

حلال‌های مورد نیاز این پژوهش از شرکت سیگما^۳، شرکت مرک^۴ و مجللی با بالاترین خلوص تهیه شدند.

جهت استخراج عصاره گیاه، با توجه به پیش تیمارهای آزمون شده و براساس تیمارهای تعیین شده با استفاده از نرم افزار و طرح RSM ۲۰ گرم پودر گیاه متکا به نسبت ۱:۱۰ وزنی/حجمی با ۲۰۰ میلی لیتر حلال) مشابه روش سیلوا و همکاران [۲۰]، توسط دستگاه همزن مغناطیسی در دماها و زمان‌های مشخص مخلوط گردید و عمل استخراج صورت پذیرفت.

۲-۲- اندازه‌گیری پاسخ‌های مورد نظر

۲-۲-۱- محاسبه بازده استخراج

عصاره‌های حاصله پس از صاف شدن، با دستگاه روتاری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و سپس در آون تخت خلا و در همان دما تارسیدن به وزن ثابت خشک شد. مقدار کل ماده خشک استخراج شده در مرحله استخراج محاسبه شد و به صورت درصد (گرم به صد گرم نمونه خشک) بیان گردید [۲۱].

۲-۲-۲- اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل

میزان کل ترکیبات فنولی بر اساس روش فولین سیوکالتیو مورد بررسی قرار گرفت [۲۲]. ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۱/۱۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتیو مخلوط شد. بعد از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم (۲۰ درصد) به آن‌ها افزوده شد. لوله‌های آزمایش بعد از تکان دادن، درون حمام آب با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل یو وی ۲۶۰۱، شرکت رای لی چین) در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. جهت رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک استفاده شد. میزان کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره بر حسب معادل اسید گالیک و با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره بیان شد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و میانگین آن‌ها گزارش شد.

3. Sigma

4. Merck

5. Face-Centered Central Composite Design

یعنی به طور کامل از حلال اتانول استفاده شده است. بر طبق نتایج سایر محققین اتانول و ترکیب اتانول با آب به عنوان مناسب ترین مخلوط حلال انتخاب گردید [۲۴ و ۲۵].

در این پژوهش از نرم افزار Design Expert نسخه ۶،۰،۲ (Stat-Ease Inc., Minneapolis, Minn., USA) جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات و رسم نمودارهای مربوط به بهینه یابی استفاده شد.

Table 1 Independent process variables and their values

Independent Variables	Symbols	Code and levels		
		-1	0	+1
Time (h)	A	2	3	4
Temperature (°C)	B	20	40	60
Ethanol to water ratio* (%)	C	50	75	100

*The proportion of 100%, ie, the solvent, is completely ethanol.

۳- نتایج

مقدار بازده استخراج در محدوده (۲/۸۵ تا ۲۰/۸۷ درصد)، میزان فنول کل در محدوده (۰/۰۵۸ تا ۰/۲۱) و میزان DPPH در محدوده (۷۶/۱۲ تا ۱۱۳/۲۳) بود. بیشترین مقدار بازده در شرایط مدت زمان ۳ ساعت، دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و نسبت اتانول به آب ۷۵ درصد مشاهده شد. بیشترین میزان فنول کل در شرایط مدت زمان استخراج ۲ ساعت، دمای ۲۰ درجه سانتی گراد و نسبت حلال ۱۰۰ درصد و کمترین مقدار DPPH در شرایط مدت زمان ۴ ساعت، دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و نسبت اتانول ۷۵ درصد بدست آمد. بنابراین بر اساس تیمارهای مشخص شده، تعیین بهترین شرایط بر اساس بیشترین مقدار بازده استخراج، بالاترین مقدار فنول کل و کمترین مقدار DPPH با استفاده از نرم افزار سطح پاسخ می تواند کمک شایانی در بهینه یابی شرایط استخراج برای نیل به اهداف مورد نظر داشته باشد.

۳-۱- گزینش مدل مناسب

به منظور یافتن بهترین مدل و بررسی تاثیر متغیرهای مستقل بر پاسخ های این پژوهش، مدل های مختلفی (خطی، درجه دوم و درجه سوم) بر داده های حاصل از آزمون های طراحی شده، برازش داده شد و مورد آنالیز آماری قرار گرفت که در جدول ۲

بازده، فنول کل و DPPH مشاهده می شود. بالا بودن مقدار ضریب تبیین (R^2), $R^2_{adjusted}$ ، معنی دار بودن خود مدلو عدم معنی داری آزمون ضعف برازش (عدم تطبیق) در مدل مذکور مؤید قدرت بالای مدل در برازش داده های آزمون می باشد [۱۰]. با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس، مدل چند جمله ای درجه دوم^۷ به عنوان مناسب ترین مدل در تمامی پاسخ ها تعیین و در نتیجه برای بررسی روند تغییرات پارامترهای اندازه گیری شده در این مطالعه انتخاب گردید.

۳-۲- بررسی متغیرهای استخراج بر پاسخ ها

طبق نتایج حاصل از آنالیز واریانس، مدت زمان استخراج و حالت درجه دوم آن تاثیر معنی داری بر مقدار بازده نداشتند. سایر پارامترها تاثیر معنی داری بر میزان بازده استخراج داشتند که در این میان نسبت اتانول به آب و حالت درجه دوم آن معنادارترین تاثیر را نشان دادند ($P < 0.0001$).

با توجه به نتایج آنالیز واریانس و مدل ارایه شده، به جز حالت درجه دوم زمان استخراج، تمامی متغیرها و برهمکنش آنها تاثیر بسیار معنادار بر میزان فنول کل داشتند. دما، مدت زمان استخراج، نسبت اتانول به آب، حالت درجه دوم این متغیرها و برهمکنش آنها تاثیر معنی داری بر میزان فعالیت مهار رادیکال DPPH دارند که در این میان تاثیر دما و مدت زمان استخراج معنی دارتر از اثر متغیر نسبت حلال ها بود.

6. Lack of Fit
7. Quadratic

Table 2 Statistical analysis of fitted models on extraction yield, total phenolic content and DPPH

<i>Lack of fit</i>	$R^2_{predicted}$	$R^2_{adjusted}$	R^2	<i>p value</i>	Model
Extraction yield					
0.0001	-0.5692	-0.0572	0.1097	0.5901	Linear
0.0001	-4.1024	-0.1879	0.1872	0.7463	2FI
0.5267	0.9899	0.9966	0.9982	0.0001	Quadratic
0.1672	0.4015	0.9955	0.9986	0.7954	Qubic
Total phenolic content					
0.0001	-0.1153	0.3824	0.4799	0.0131	Linear
0.0001	-0.2061	0.7404	0.8224	0.0024	2FI
0.1958	0.9835	0.9920	0.9958	0.0001	Quadratic
0.0329	-1.7014	0.9890	0.9965	0.8641	Qubic
DPPH					
0.0001	-0.2808	0.0770	0.2237	0.2456	Linear
0.0001	0.0608	0.1558	0.4243	0.2614	2FI
0.1799	0.9894	0.9971	0.9985	0.0001	Quadratic
0.1833	0.7374	0.9979	0.9993	0.2218	Qubic

USA) رسم گردید. در هر نمودار اثر دو متغیر در حالیکه متغیر سوم و چهارم در نقطه مرکزی قرار داشت، بررسی شد.

۳-۳- بررسی مدل های برازش یافته و نمودارهای سه بعدی

شکل ۱-الف تأثیر متقابل دو متغیر زمان و دما را در سطح ثابت نسبت حلالها (۷۵ درصد) بر بازده استخراج عصاره نشان می-دهد. همانطور که مشاهده می-شود، افزایش زمان از ۲ ساعت تا ۴ ساعت در دماهای پایین تغییر خاصی روی بازده ایجاد نکرده است، اما در دماهای بالاتر افزایش زمان، باعث افزایش راندمان استخراج می-گردد. از سوی دیگر افزایش دما از ۲۰ درجه سانتی-گراد به ۶۰ درجه سانتی-گراد در تمام زمانهای استخراج موجب افزایش بازده شده است و همانطور که مشاهده می-شود بیشترین بازده مربوط به زمان ۴ ساعت و دمای ۶۰ درجه سانتی-گراد می-باشد.

با توجه به جداول ۳ و ۲، مدل های آماری که پاسخ های این پژوهش را به عنوان تابعی از متغیر های وابسته در محدوده مورد مطالعه ارایه می-دهد، در ذیل مشاهده می-گردد. بهترین مدل با حذف عوامل و برهم کنش های غیر معنادار برای هر پاسخ به دست آمد.

بازده استخراج:

$$20.39 + 0.28B - 2.82C - 0.91B^2 - 10.24C^2 + 0.43AB + 1.25AC + 2.31BC$$

میزان ترکیبات فنولی:

$$0.083 - 0.014A - 0.0093B + 0.026C + 0.013A^2 + 0.015C^2 + 0.013AB + 0.013AC + 0.023BC$$

مقدار DPPH:

$$94.58 - 5.19A - 3.26B - 0.63C - 13.07A^2 - 1.08B^2 + 17.41C^2 - 4.57AB - 3.61AC - 2.93BC$$

به منظور بررسی اثر متغیرهای مستقل بر پاسخها، نمودار سه بعدی برای هر پاسخ با استفاده از نرم افزار Design Expert نسخه ۶.۰.۲ (Stat-Ease Inc., Minneapolis, Minn.,)

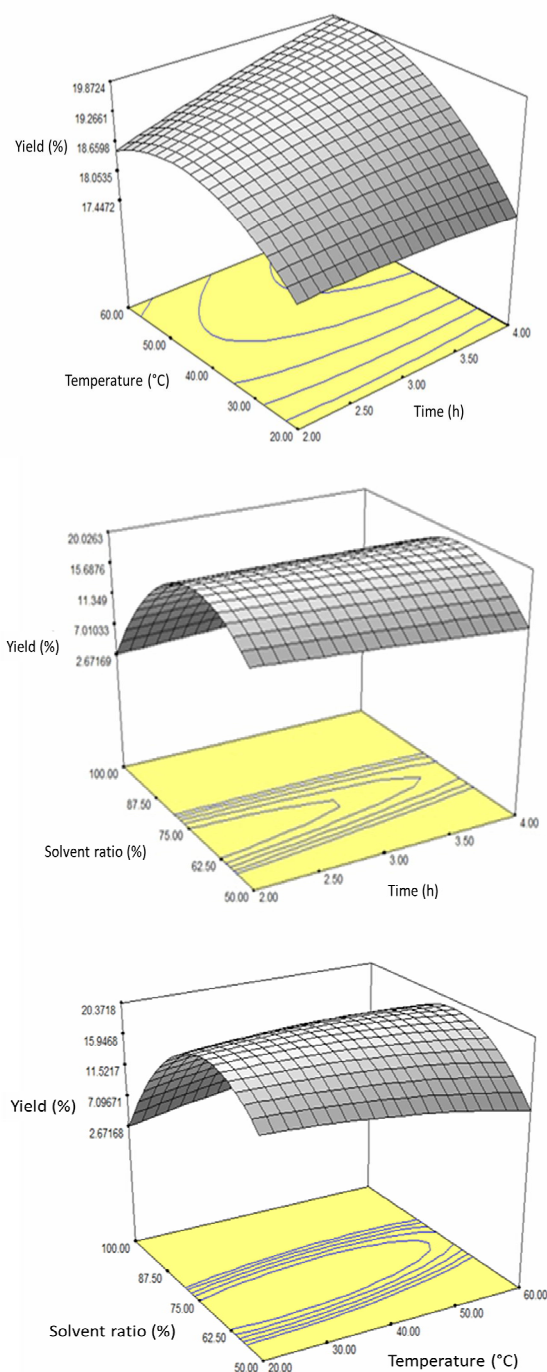


Fig 1 Response surface for the effect of temperature and time (a); solvent ratio and time (b); solvent ratio and temperature (c); on the extraction yield

Table 3 ANOVA results for response parameters

	value P		
	TPC	Yield	DPPH
A (Time)	0.0001	0.7736	0.0001
B (Temperature)	0.0001	0.0352	0.0001
C	0.0001	0.0001	0.0029
A²	0.0001	0.5287	0.0001
B²	0.2652	0.0019	0.0057
C²	0.0001	0.0001	0.0001
AB	0.0001	0.0072	0.0001
AC	0.0001	0.0001	0.0001
BC	0.0001	0.0001	0.0001

شکل ۱-ب تأثیر دو متغیر زمان و نسبت حلال‌ها را در سطح ثابت دما (۲۰ °C) بر بازده استخراج نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش نسبت حلال‌ها از ۵۰ درصد تا ۷۵ درصد، بازده روند افزایشی داشته است ولی با تغییر نسبت حلال‌ها از ۷۵ درصد به ۱۰۰ درصد، بازده روند کاهشی نشان داد. افزایش زمان از ۲ ساعت به ۴ ساعت تغییر محسوسی را بر بازده ایجاد نکرد. با توجه به شکل بیش‌ترین بازده در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد، زمانی خواهد بود که مدت زمان استخراج، ۳ ساعت و نسبت حلال‌ها ۷۵ درصد باشد.

شکل ۱-ج نیز تأثیر دو متغیر دما و نسبت حلال‌ها را در سطح ثابت زمان (۲ ساعت)، بر بازده استخراج نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در این شرایط با افزایش نسبت حلال‌ها از ۵۰ درصد به ۷۵ درصد بازده روند افزایشی داشته است ولی با روند افزایشی نسبت حلال‌ها از ۷۵ درصد به ۱۰۰ درصد بازده روند کاهشی داشته است و همچنین با افزایش دما از ۲۰ درجه سانتی گراد به ۶۰ درجه سانتی گراد تغییر محسوسی در بازده مشاهده نشد.

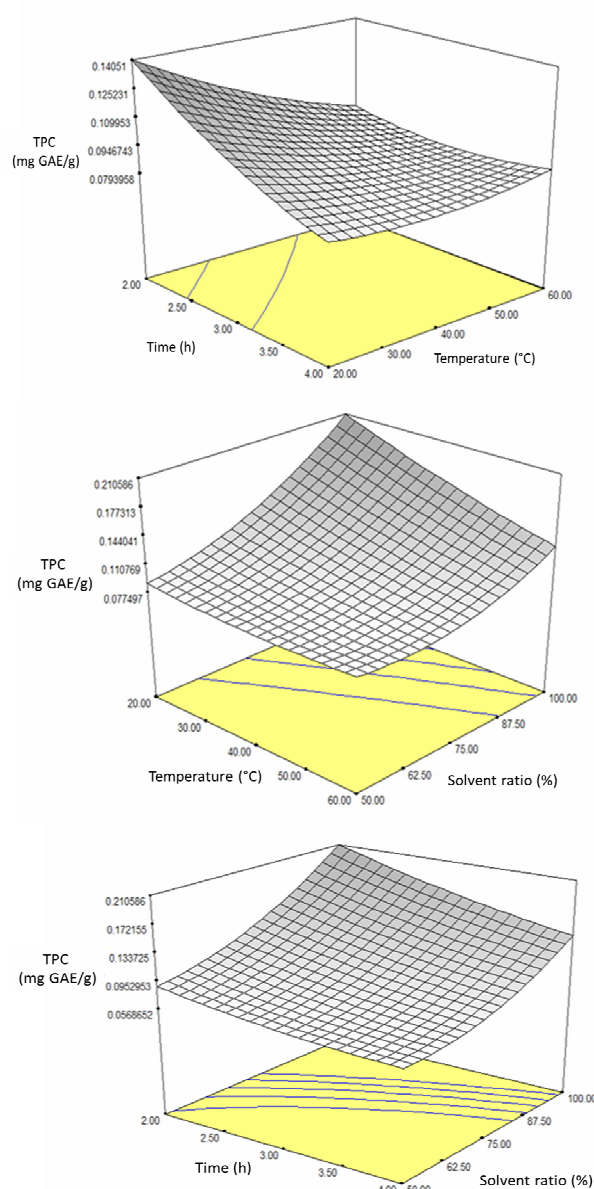


Fig 2 Response surface for the effect of temperature and time (a); solvent ratio and time (b); solvent ratio and temperature (c); on the total phenolic content

۳-۵- بررسی مدل‌های برازش یافته و نمودارهای

سه بعدی بر میزان فعالیت مهار رادیکال DPPH

در شکل ۳-الف اثر دو متغیر دما و زمان استخراج بر میزان DPPH در سطح ثابت نسبت حلال‌ها (۷۵ درصد)، نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌کنید با افزایش دما از ۲۰

۳-۴- بررسی مدل‌های برازش یافته و نمودارهای

سه بعدی برای پاسخ میزان فنول کل

تأثیر دو متغیر دما و زمان استخراج بر میزان فنول کل در سطح ثابت نسبت حلال‌ها (۷۹/۵۲ درصد) در شکل ۲-الف مشاهده می‌شود. در این نمودار، با افزایش زمان از ۲ ساعت به ۴ ساعت، میزان فنول کل بطور محسوسی کاهش یافته است، هم‌چنین با افزایش دما از ۲۰ درجه سانتی‌گراد به ۶۰ درجه سانتی‌گراد میزان فنول کل کاهش یافته است به‌طوری که بیش‌ترین میزان فنول کل در دمای ۲۰ °C استخراج می‌گردد که کاهش سریع این ترکیبات نشان دهنده حساسیت ترکیبات فنولی گیاه متکا به دما و افزایش زمان استخراج در این دماها است و همان‌طور که در شکل ۲-الف مشاهده می‌شود بیش‌ترین میزان فنول کل (mg GAE/g) (۰/۲۱ در دمای ۲۰ °C و زمان ۲ ساعت استخراج شده است.

در شکل ۲-ب نیز، اثر دو متغیر زمان و نسبت حلال‌ها در سطح ثابت دما (۲۰ °C) بر میزان فنول کل نشان داده شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، با افزایش زمان از ۲ ساعت به ۴ ساعت، کاهش نامحسوسی در میزان فنول کل مشاهده می‌شود، اما با افزایش نسبت حلال‌ها از ۵۰ درصد به ۱۰۰ درصد افزایش معنی‌داری در میزان فنول کل مشاهده می‌گردد، به‌طوری که بیش‌ترین میزان فنول کل در زمان ۲ ساعت و نسبت حلال ۱۰۰ درصد استخراج می‌گردد.

تأثیر متغیرهای دما و نسبت حلال‌ها در سطح ثابت زمان (۲ ساعت) بر میزان فنول کل، در شکل ۲-ج مشاهده می‌شود. افزایش نسبت حلال‌ها از ۵۰ درصد به ۱۰۰ درصد به تدریج افزایش ترکیب‌های فنولی را در پی داشت، درحالی که در این شرایط، با افزایش دما تغییر محسوسی در میزان فنول کل مشاهده نشد. بر اساس شکل ۲-ج، بیش‌ترین میزان فنول کل در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و نسبت حلال ۱۰۰ درصد استخراج گردید.

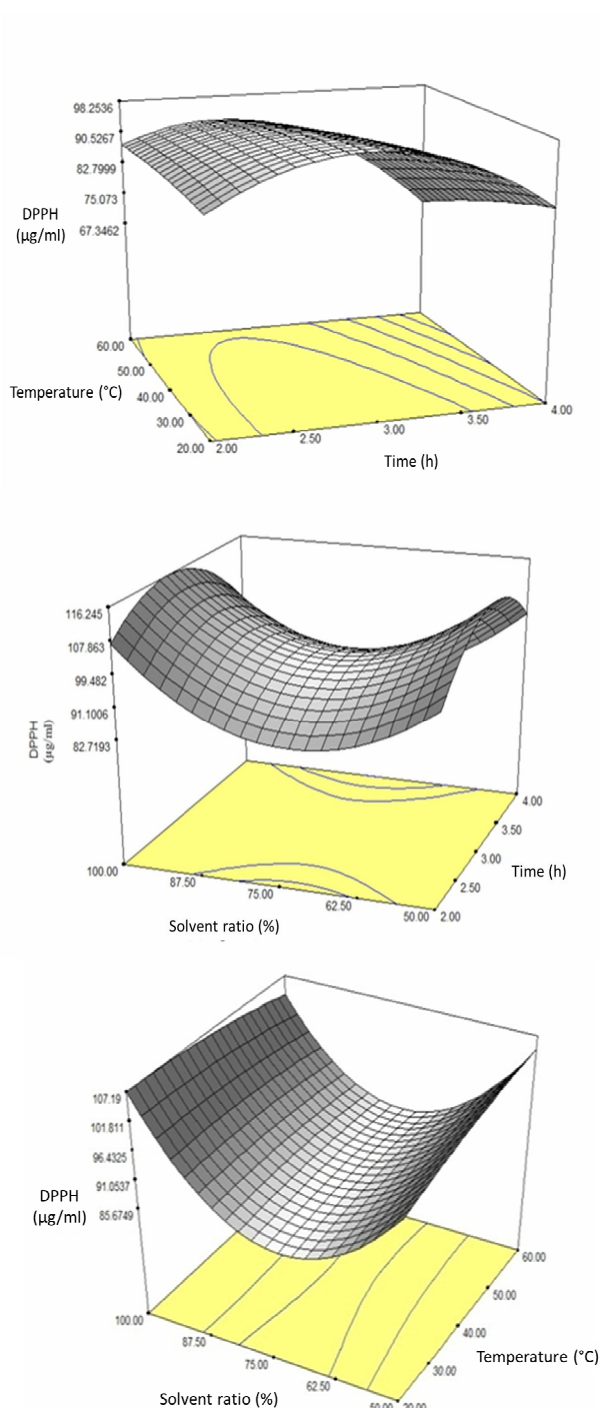


Fig 3 Response surface for the effect of temperature and time (a); solvent ratio and time (b); solvent ratio and temperature (c); on the DPPH

در همین مدت زمان، با افزایش نسبت حلال از ۵۰ درصد به ۷۵ درصد، میزان DPPH روند کاهشی داشته به طوری که در نسبت

درجه تا ۶۰ درجه تغییر محسوسی بر میزان DPPH مشاهده نشده ولی تأثیر زمان بر میزان DPPH بسیار چشمگیر بود. به طوری که با افزایش زمان از ۲ ساعت به ۳ ساعت، EC_{50} در تست DPPH افزایش یافته که نشان دهنده کاهش خاصیت آنتی اکسیدانی می باشد اما با افزایش زمان تا ۴ ساعت میزان DPPH کاهش یافته و خاصیت آنتی اکسیدانی به حداکثر مقدار خود در کمترین میزان DPPH ($76/12 \mu\text{g/ml}$) می رسد. در این منحنی بیشترین میزان DPPH در دمای ۴۰ درجه سانتی-گراد و زمان ۳ ساعت ($113/23 \mu\text{g/ml}$) بوده که خاصیت آنتی-اکسیدانی به حداقل مقدار خود می رسد و کمترین میزان DPPH با مقدار ($76/12 \mu\text{g/ml}$) در دمای ۴۰ درجه سانتی-گراد و زمان ۴ ساعت است که خاصیت آنتی اکسیدانی به حداکثر مقدار خود می رسد.

شکل ۳-ب نشان دهنده تأثیر دو متغیر زمان استخراج و نسبت حلالها در سطح ثابت دما (20°C) می باشد. با افزایش زمان از ۲ ساعت به ۳ ساعت روند افزایشی در مقدار DPPH مشاهده می شود و با افزایش زمان از ۳ ساعت به ۴ ساعت، روند کاهشی در مقدار DPPH مشاهده می شود که مقدار DPPH در زمان ۴ ساعت در کمترین مقدار خود قرار دارد. همچنین با افزایش نسبت حلالها از ۵۰ درصد به ۷۵ درصد (یعنی با افزایش میزان حلال اتانول) کاهش محسوسی در مقدار DPPH مشاهده می شود به طوری که در این نسبت حلالها (۷۵ درصد) DPPH به کمترین مقدار خود رسیده است اما با افزایش درصد نسبت حلالها از ۷۵ درصد به ۱۰۰ درصد روند افزایشی در مقدار DPPH مشاهده می شود. شایان به ذکر است که کمترین مقدار DPPH ($76/12 \mu\text{g/ml}$) در زمان ۴ ساعت و نسبت حلال ۷۵ درصد مشاهده شد که در این محدوده ترکیبات آنتی اکسیدانی بیشتری استخراج شد و بیشترین مقدار DPPH در زمان ۳ ساعت و نسبت حلال ۵۰ درصد مشاهده گردید.

برهمکنش دو عامل دمای استخراج و نسبت حلالها در سطح ثابت زمان (۲ ساعت) بر میزان DPPH نیز در شکل ۳-ج بررسی شده است. همان طور که در شکل مشاهده می شود با افزایش دما از 20°C به 60°C به صورت آهسته DPPH افزایش داشت.

میزان اتانول، نسبت حلال به ماده خشک افزایش یافته و راندمان استخراج بیشتر می‌گردد [۲۸].

نتایج مربوط به اندازه‌گیری فنل کل و بررسی تاثیر متغیرهای دما، زمان استخراج و نسبت حلال‌ها به هم، بر آن که در شکل ۲ نشان داده شد بیانگر آن بودند که افزایش دما باعث کاهش میزان فنول کل شد به طوری که بیشترین میزان فنول کل در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۲۰ استخراج گردید. این روند کاهشی نشان دهنده حساسیت ترکیبات فنولی گیاه متکا به دماهای بالا است. این پدیده که در پژوهش‌های متعدد دیگری نیز گزارش گردیده است، احتمالاً در اثر تخریب و اکسیداسیون برخی فنول‌های حساس به حرارت در دماهای بالاتر می‌باشد [۲۹ و ۳۰]. هم‌چنین کاهش ترکیبات فنولی با افزایش دما را می‌توان به تشکیل ترکیبات سونو شیمیایی نسبت داد که این ترکیبات سونو شیمیایی می‌توانند از طریق اکسیداسیون، باندهای دوگانه را کونژوگه کنند و یا به عبارت دیگر با آسیب حرارتی باندهای دوگانه، باعث کاهش استخراج ترکیبات فنولی در دماهای بالا شوند [۳۰]. هم‌چنین نتایج این پژوهش حاکی از تاثیر منفی افزایش زمان استخراج بر مقدار فنل کل بودند. در پژوهشی که بر روی استخراج ترکیبات زیست فعال از غلاف حبوبات صورت گرفت، محققان در زمان ۱۰۰ الی ۱۵۰ دقیقه بالاترین میزان استخراج ترکیبات فنولی و در زمان‌های طولانی‌تر، کاهش این ترکیبات را گزارش نمودند و آن را به تخریب ساختار با افزایش زمان نسبت داده و زمان کوتاه را برای استخراج پیشنهاد کردند [۳۱]. در نتیجه هرچه زمان استخراج کمتر شد تخریب حرارتی نیز کم‌تر اتفاق افتد و باعث افزایش استخراج ترکیبات فنولی گردید و همانطور که در شکل ۲ مشاهده شد بیشترین میزان فنول کل ($0/23 \text{ mgGAE/g}$) در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۲۰ و زمان ۲ ساعت استخراج گردید. با افزایش نسبت اتانول از ۵۰ به ۱۰۰ درصد افزایش معنی‌داری در میزان فنول مشاهده گردید. بر اساس نتایج برخی پژوهش‌ها، در استخراج ترکیبات فنولی، قطبیت حلال‌ها در افزایش حلالیت فنول‌ها نقش بسزایی دارد [۳۲]. با توجه به این که آب دارای قطبیت بیشتری نسبت به اتانول است، بنابراین انتظار می‌رود که در نسبت‌های بالاتر آب ترکیبات فنولی بیشتری استخراج شوند. مشابه همین پدیده در استخراج ترکیبات فنولی دانه انگور با استفاده از امواج میکروویو مشاهده شد [۳۳] برخلاف نتایج محققان پیشین، نتایج

۷۵ درصد به کم‌ترین میزان خود رسید اما با افزایش نسبت حلال از ۷۵ درصد به ۱۰۰ درصد میزان DPPH روند افزایشی نشان داد. بر اساس شکل ۳، در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۴۰ و نسبت حلال ۷۵ درصد، DPPH به کم‌ترین میزان خود رسیده است ($\mu\text{g/ml}$ ۷۶/۱۲) که در این محدوده بیشترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را می‌توان استخراج کرد.

۳-۶- تعیین شرایط بهینه استخراج

در این بررسی، هدف بهینه سازی، بیشترین بازده استخراج، کمترین مقدار DPPH و بیشترین میزان فنول کل در نظر گرفته شد. به جهت اقتصادی بودن فرایند استخراج مدت زمان و دمای استخراج حداقل در نظر گرفته شد. شرایط بهینه با توجه به شاخص‌های مورد نظر، زمان ۲ ساعت، دمای $^{\circ}\text{C}$ ۲۰ و نسبت حلال‌ها به هم نیز $79/58$ درصد به دست آمد که در این شرایط بهینه، بازده $17/6105$ درصد، میزان مهارفعالی آنتی اکسیدانی $87/2086 \mu\text{g/ml}$ و مقدار فنول کل $0/14042 \text{ mgGAE/g}$ تعیین گردید.

۴- بحث

با بررسی نتایج بدست آمده مربوط به بازده استخراج، همانطور که در شکل ۱ نشان داده شد، مشخص گردید که متغیر زمان اثری روی بازده استخراج نداشت اما متغیر دما باعث افزایش معنی‌داری در بازده گردید به گونه‌ای که با افزایش دما، بازده استخراج افزایش یافت. این افزایش ممکن است به علت تاثیر دما بر تخریب دیواره سلولی و همین‌طور افزایش نفوذپذیری حلال به درون سلول و در نتیجه افزایش ترکیبات درون سلولی باشد [۲۶]. هم‌چنین افزایش بازده استخراج در پی افزایش دما نیز می‌تواند ناشی از بهبود انتقال جرم در نتیجه‌ی افزایش حلالیت عصاره و کاهش ویسکوزیته حلال باشد [۲۷]. نتایج نشان دادند که با افزایش نسبت حلال به میزان ۷۵ درصد (افزایش نسبت اتانول) نیز روند افزایش در بازده مشاهده گردید. این نتایج را بدین صورت می‌توان توجیه کرد که وقتی آب به تنهایی به عنوان حلال مورد استفاده قرار می‌گیرد، بخشی از آن توسط سلول‌های گیاهی جذب شده و باعث کاهش نسبت حلال به ماده خشک و در نتیجه کاهش راندمان استخراج می‌گردد در صورتیکه با افزایش

به دست آمده در این تحقیق نشان داد که در نسبت های بیشتر اتانول، استخراج این ترکیبات بیشتر بود. در پژوهش دیگری نیز که در استخراج ترکیبات فنولی از گلبرگ زعفران صورت گرفت نشان داده شد که با افزایش درصد اتانول حلال، افزایش خطی در میزان بازده استخراج ترکیبات فنولی مشاهده می شود [۳۴]. در مطالعه ای که روی استخراج ترکیبات فنولی از توت سیاه صورت گرفت محققین نتیجه مشابهی گزارش نمودند و با افزایش درصد اتانول تا ۶۰ درصد، بازده استخراج این ترکیبات فنولی افزایش یافت [۲۸]. تاثیر مثبت درصدهای بالاتر اتانول حلال بر استخراج ترکیبات فنولی در پژوهش همتی دیگری نیز گزارش گردیده است [۲۹]. این رفتار ممکن است به این علت باشد که افزایش میزان اتانول منجر به کاهش ثابت دی الکتریک محلول می گردد که خود منجر به کاهش انرژی مورد نیاز برای جداسازی مولکول های حلال می شود. بدین ترتیب، مولکول های ماده حل شونده اجازه می یابند تا راحت تر بین مولکول های حلال قرار گرفته و حل شوند [۱۶]. لذا در این پژوهش نیز با افزایش نسبت حلال ها از ۵۰ به ۱۰۰ درصد (افزایش اتانول) افزایش معنی داری در میزان ترکیبات فنولی مشاهده شد.

بررسی نتایج مربوط به میزان DPPH که در شکل ۳ به آن اشاره شد بیان گر اثر جزئی دما بر این پارامتر بود. دلیل این امر را می توان به تخریب حرارتی ترکیبات آنتی اکسیدانی نسبت داد. علی رغم این که با افزایش دما بازده افزایش یافت اما چون بخشی از ترکیبات آنتی اکسیدانی دچار تخریب حرارتی شدند، مقدار DPPH تقریباً ثابت باقی ماند لذا دما و حرارت می بایست برای جلوگیری از تخریب آنتی اکسیدان ها به اندازه ی کافی ملایم باشند. حرارت ممکن است باعث نرمی بافت گیاهی، تضعیف یکپارچگی دیواره سلولی و هیدرولیز زنجیرهای ترکیبات آنتی اکسیدانی شود [۳۵]. با افزایش نسبت حلال ها از ۵۰ به ۷۵ درصد (یعنی با افزایش میزان حلال اتانول) کاهش محسوسی در مقدار DPPH مشاهده شد به طوری که در این نسبت حلال ها (۷۵ درصد اتانول) DPPH به کم ترین مقدار خود رسید، اما با افزایش درصد نسبت حلال ها از ۷۵ به ۱۰۰ درصد اتانول روند افزایشی در مقدار DPPH مشاهده شد و استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی کاهش یافت. دلیل این امر احتمالاً به دلیل اشباع

شدن زیاد حلال اتانول است و این که میزان و مقدار اتانول بالاتر از توان ترکیبات محلول بوده و تا اندازه ای اثر منفی بر عملکرد استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی گذاشته و لذا میزان کمتری از این ترکیبات آنتی اکسیدانی از ماده ی خشک (گیاه متکا) به سمت اتانول حرکت کردند [۳۶ و ۳۷]. از آنجایی که بیش ترین ترکیبات آنتی اکسیدانی در زمان ۴ ساعت استخراج شده اند، می توان گفت که در شرایط مطلوب با افزایش زمان، میزان انحلال (استخراج) ترکیبات آنتی اکسیدانی بیش تر شد [۳۸] که در نتیجه موجب کاهش DPPH و افزایش استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی گردید. همانطور که اشاره شده بود، کم ترین مقدار DPPH ($76/12 \mu\text{g/ml}$) در زمان ۴ ساعت و نسبت حلال ۷۵ درصد مشاهده شد که در این محدوده ترکیبات آنتی اکسیدانی بیش تری استخراج گردید. بیش ترین مقدار DPPH نیز در زمان ۳ ساعت و نسبت حلال ۵۰ درصد مشاهده شد.

در انتهای بحث شایان ذکر است که در این مطالعه ارتباط معناداری بین ترکیبات فنولی و آنتی اکسیدانی وجود ندارد، اگرچه برخی از مطالعات، ارتباط بین محتوای فنولیک و ظرفیت آنتی اکسیدانی را نشان دادند [۱۱]. محققین دیگر نیز ذکر کرده اند که رابطه بین ترکیبات فنولی و قدرت خنثی کنندگی رادیکال های آزاد لزوماً رابطه ی مستقیم و همسانی نیست [۳۹]. برخی از ترکیبات فنولی قدرت آنتی رادیکالی داشته و در برخی موارد، سایر مواد نیز مسبب خاصیت آنتی رادیکالی می باشند [۴۰]. عدم وجود همبستگی بین محتوای فنول کل و ظرفیت آنتی اکسیدانی در این پژوهش ممکن است به این دلیل باشد که ظرفیت آنتی اکسیدانی مشاهده شده نه تنها به دلیل حضور ترکیبات فنولی، بلکه احتمالاً به دلیل حضور برخی از فیتوشیمیایی های دیگر مانند توکوفرول ها و رنگدانه ها بوده که به عنوان اثرات هم افزایی میان آنها، به کمک ظرفیت آنتی اکسیدانی می آید. از سوی دیگر ممکن است در این گیاه روش فولین- سیو کالچو تنها روش اندازه گیری مطلق محتوای فنولی کل نباشد. به علاوه، انواع مختلف ترکیبات فنولی خاصیت آنتی اکسیدانی مختلف دارند که به ساختار آنها وابسته است. احتمالاً این عصاره، حاوی انواع مختلفی از ترکیبات فنولی است که ظرفیت آنتی اکسیدانی مختلفی دارند [۲۵].

Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of the aerial parts of *Salvia eremophila* Boiss. From Iran. Food and chemical toxicology, 48(5): 1371-1376.

- [6] Dai, J., & Mumper, R. J. 2010. Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15: 7313-7352.
- [7] Javidnia, K., Miri, R., Kamalinejad, M., Edraki, N. 2005. Chemical composition of *Ferula persica* Wild. essential oil from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, 20: 605-606.
- [8] Hilan, C., Safeir, R., El Hage, R., Jawich, D., Frem, M.E., Jawhar, K. 2007. Evaluation of the antibacterial activities of *Ferula Hermonis* (Bios). *Lebanese Science Journal*, 8: 135-51.
- [9] Vilku, M., Kamaljit, S., Mawson, B., Raymond, K., Simons, L., Bates, D. 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry-A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2): 161-169.
- [10] Myers, R.H., Montgomery, D.C. 2002. Response surface methodology: process and product. Optimization using designed experiments, 2nd Ed, Wiley Public Inc, New York, 51-83.
- [11] Jimoh, F. O., Adedapo, A. A. & Afolayan, A. J. 2010. A Comparison of the nutritional value and biological activities of the acetone, methanol and water extracts of the leaves of *Solanum nigrum* and *Leonotis leonorus*. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 964-971.
- [12] Rodrigues, S., Gustavo, A.S. 2007. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compound from coconut shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15: 95-100.
- [13] Sun, Y., Xu, W., Zhang, W., Hu, Q., Zeng, X. 2011. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng by using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 78: 311-320.
- [14] Alberti, A., Zielinski, A.A.F., Zardo, D.M., Demiate, I.M., Nogueira, A., Mafra, L.I. 2014. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food chemistry*, 149: 151-158.

۵- نتیجه گیری کلی

نتایج به دست آمده از تحقیق، بیانگر کارایی مفید روش سطح پاسخ در بهینه سازی فرایند استخراج بود. نتایج مشخص کننده تاثیر متفاوت متغیرهای دما، زمان و نسبت حلال ها بر مقادیر پاسخ های مورد اندازه گیری بود. حاصل این مطالعه نشان داد که متغیر زمان استخراج تاثیر چندانی بر بازده استخراج نداشت اما با افزایش دما، بازده استخراج نیز افزایش یافت. به طور کلی تاثیر دما و نسبت حلال تاثیر بیشتر بر پاسخ های مورد نظر داشتند. با توجه به فاصله قابل ملاحظه بین مقادیر بیشینه و کمینه پاسخ ها می توان به این نتیجه رسید که بهینه سازی متغیرهای استخراج می تواند هزینه و کیفیت فرآورده ها، به ویژه فرآورده های صنعتی را ارتقا دهد. بایستی اشاره نمود که هدف از این تحقیق بدست آوردن شرایط تاثیر گذار بر استخراج از گیاه بومی متکا بود که انجام تحقیقات بیشتر در این رابطه، برای مثال به عنوان آنتی اکسیدان در روغن ها و چربی ها به عنوان جابگزین آنتی اکسیدان های سنتزی ضروری به نظر می رسد.

۶- منابع

- [1] Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*, 74(17): 2157-2184.
- [2] Barreira, J.C., Ferreira, I.C., Oliveira, M.B.P., Pereira, J.A. 2008. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food chemistry*, 107(3): 1106-1113.
- [3] Aksenov, M. Y., Aksenova, M. V., Butterfield, D. A., Geddes, J.W., Markesbery, W. R. 2001. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 103: 373-383.
- [4] Ebrahimabadi, A.H., Ebrahimabadi, E.H., Djafari-Bidgoli, Z., Kashi, F.J., Mazoochi, A., Batooli, H. 2010. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. *Food Chemistry*, 119(2): 452-458.
- [5] Ebrahimabadi, A.H., Mazoochi, A., Kashi, F.J., Djafari-Bidgoli, Z., Batooli, H. 2010.

- methodology, Separation and Purification Technology, 55 (3): 381-387
- [24] Khanlari, F., Yasini, A. S. A., Nasirzadeh, N. 2016. Optimazatin of the extraction of the total phenolics and antioxidant compounds Fromsolanum Nigrum fruit using response surface methodology. Food Technology & Nutrition, 13(3): 78-97.
- [25] Ilaiyaraja, N., Likhith, K. R., Sharath Babu, G. R., Khanum, F. 2015. Optimisation of extraction of bioactive compounds from Feronia limonia (wood apple) fruit using response surface methodology (RSM). 173: 348-354.
- [26] Karami, Z., Emam-Djomeh, Z., Mirzaee, H. A., Khomeiri, M., Mahoonak, A. S., Aydani, E. 2015. Optimization of microwave assisted extraction (MAE) and soxhlet extraction of phenolic compound from licorice root, J. Food Sci. Technol. 52: 3242-3253.
- [27] Lai, J., Xin, C., Zhao, Y., Feng, B., He, C., Dong, Y., Fang, Y., He, C., Dong, Y., Fang, Y. & Wei, SH. 2013. Optimization of Ultrasonic Assisted Extraction of Antioxidants from Black Soybean (*Glycine max* var) Sprouts Using Response Surface Methodology. Molecules, 18: 1101-1110.
- [28] Cacace, J.E., Mazza, G. 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. Journal of Food Engineering, 59: 379-389.
- [29] Wissam, Z., Bashour Ghada, B., Wassim, A. and Warid, K. 2012. Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 4(3): 675 - 682.
- [30] Ghafoor, K., Choi, Y. H. 2009. Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape peel through response surface methodology. Journal od Korean Society Biology of Chemical, 52(3): 295-300.
- [31] Gan, C.Y., Latiff, A.A. (2011). Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. Food chemistry, 124, 1277-1283.
- [32] Naczki, M., Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence,
- [15] Belwal, T., Dhyani, P., Bhatt, I.D., Rawal, R.S., Pande, V. 2016. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM), Food Chemistry, 207: 115-124.
- [16] Pompeu, D.R., Silva, E.M, Rogez, H. 2009. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. Bioresource technology, 100: 6076-6082.
- [17] Yan, Y., Yu, C., Chen, J., Li, X., Wang, W., Li, S. 2011. Ultrasonic-assisted extraction optimized by response surface methodology, chemical composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Tremella mesenterica*, Carbohydr. Polym. 83 (1): 217-224.
- [18] Tabaraki, R., Nateghi, A. 2011. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology, Ultrason. Sonochem. 18: 1279-1286.
- [19] 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.
- [20] Silva, E. M., Rogez, H., Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. Separation and Purification Technology, 55 (3): 381-387
- [21] Michiels, J. A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O. & Dommes, J. 2012. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. Food Chemistry, 130: 986-993.
- [22] Gong, Y., Hou, Z., Gao, Y., Xue, Y., Liu, X. & Liu, G. 2012. Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology. Food and bioproducts processing, 90: 9-16
- [23] Silva, E. M., Rogez, H., Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface

- [37] Jebelli Javan, A., Nikmanesh, A., Keykhosravi, K., Maftoon, S., Amin Zare, S. M., Bayani, M., Parsaiemehr, M., Raeisi, M. 2015. Effect of Citric Acid Dipping Treatment on Bioactive Components and Antioxidant Properties of Sliced Button Mushroom (*Agaricus bisporus*). *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 2: 20-25.
- [38] Rusak, G., Komes, D., Likic, S., Horzicb, D., Kovac, M. 2008. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110: 852-858.
- [39] Chandini, S.K., Ganesan, P., Bhaskar, N. 2008. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chemistry*, 107: 707-713.
- [40] Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954-3962.
- extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-1542.
- [33] Li, H., Deng, Z., Wu, T., Liu, R., Loewen, S., Tsao, R. (2012). Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry*, 130, 928-936.
- [34] Ahmadian, K. Z., Niazmand, R., Najaf, N. M. 2016. Optimization of extraction conditions of bioactive components from saffron petal using response surface method (RSM). *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*, 5(1): 39-54
- [35] Chan, S.W., Lee, C.Y., Yap, C.F., Wan Aida, W.M., Ho, C.W. 2009. Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*, 16: 203-213.
- [36] Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D.M. 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81: 200-208.

Optimization of extraction conditions of antioxidant and polyphenolic compounds of *Ferula Persica* extract by using response surface methodology

Shokrollahi Yancheshmeh, B.¹, Hesarinejad, M. A.², Rezaei, N.³, Salimi, A.³,
Shemshadi, Gh.³, Kazemzadeh, M.³, Jebelli Javan, A.^{3*}

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2. Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

3. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

(Received: 2018/02/14 Accepted: 2018/04/17)

Due to increasing the importance of natural antioxidants because of their positive effects on human health and enhancing preservation of food products, and on the other hand, some unexplained effects of synthetic antioxidants, using and replacing of natural antioxidants is considered widely nowadays. The purpose of this study was to identify the potentials of *Ferula Persica* extract as a native and novel source of antioxidants and polyphenols. In this research, the optimization of extraction conditions from the leaf of *F. Persica* was studied by response surface methodology (RSM) at 3 temperature levels (20, 40 and 60 °C), three time levels (2, 3 and 4 hours) and three levels of water to ethanol ratio (50, 75 and 100%). RSM was used to evaluate the effect of different optimization processes on extraction efficiency, antioxidant activity and total phenolic content. Based on the results of optimization, a second-order polynomial model was designed to optimize the extraction conditions as the best model. The optimum conditions of extraction were in the solvent ratio of 79.58% at 20 °C during 2 hours. In these conditions, the optimum point has yield of 17.61%, EC₅₀ equal to 87.20 (µg/ml) and TPC of 140428.0 (mg GAE/g).

Keywords: *Ferula Persica*, Total phenolic content, Antioxidant activity, Extraction, Response surface methodology

* Corresponding Author: jebellija@profs.semnan.ac.ir