مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات زیست فعال از گلبرگ های گل راعی به روش سطح پاسخ

زهرا نجاری[۱]، محمد فتاحی[۲]*

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، آذربایجان غربی، ایران

۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، آذربایجان غربی، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/ ۱۲/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۹

کلمات کلیدی:

گل راعی،

ترکیبات فنولی،

روش سطح پاسخ،

آنتی اکسیدان.

DOI: 10.22034/FSCT.19.130.227

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.19.8

* مسئول مکاتبات:

mo.fattahi@urmia.ac.ir

چکیده

در این پژوهش جهت عصاره گیری از گل های گل راعی از امواج فراصوت استفاده شد. اثر نسبت متانول به آب (۲۴/۷۷، ۳۵، ۵۰، ۶۵ و ۷۵/۲۲ درصد)، زمان (۱/۵۹، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۱۸/۴۰ دقیقه) و دما (۲۴/۷۷، ۳۵، ۵۰، ۶۵ و ۷۵/۲۲ درجه سانتی گراد) بر استخراج ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره به دو روش قدرت آنتی اکسیدانی احیاء آهن (FRAP) و دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH%) با استفاده از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی بررسی شد. بر اساس نتایج بهترین نسبت تیمارها مربوط به نسبت ۵۰ درصد متانول به آب، زمان ۱۵ دقیقه و دمای ۷۰ درجه سانتی گراد بود. در شرایط بهینه مقدار فنول کل ۲۸/۴۶ میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک، مقدار فلاونوئید کل ۱۹/۷۵ میلی گرم کوئرسیتین بر گرم وزن خشک، مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH%) ۸۹/۲۳ درصد و مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی (FRAP) ۳/۵۷ میکرومول آهن در گرم وزن خشک بود. مطلوبیت بدست آمده در شرایط بهینه برای متغیرها و پاسخ های مورد بررسی ۰/۸۹۵ بود. بر طبق نتایج ترکیبی از آب و متانول نسبت به استفاده انفرادی هر کدام از حلال ها در استخراج پلی فنول ها کاراتر عمل کرده است. از سویی دیگر افزایش دما (حدود ۱۵ دقیقه) و زمان (حدود ۶۵ درجه سانتی گراد) عصاره گیری، منجر به افزایش ترکیبات فنولی می شود. با توجه به کارایی امواج فراصوت در بهبود فرآیند استخراج نسبت به سایر روش های عصاره گیری و تطابق داده های حاصل از آزمایش با مدل های پیش بینی شده توسط روش سطح پاسخ، به نظر می رسد که تلفیق این دو روش در بهینه سازی استخراج آنتی اکسیدان های فنولی از گل راعی بسیار مناسب است.

۱- مقدمه

نتایج حاصل از بررسی پژوهش های صورت گرفته در حوزه صنایع غذایی بیانگر این واقعیت است که بخش عمده تحقیقات روی موضوع غذا ها، ترکیبات سلامتی زا و نگهدارنده های طبیعی متمرکز بوده است [۱،۲]. با مشخص شدن سمیت و سرطانزایی بسیاری از افزودنی های شیمیایی مورد استفاده در صنایع غذایی نظیر ترتیاری بوتیل هیدروکسی آنیزول[1]، بوتیلاتد هیدروکسی آنیزول[2] و بوتیلاتد هیدروکسی تولوئن[3] [۳] تلاش محققین برای دستیابی به آنتی اکسیدان های سالم تر از منابع طبیعی با اثرات بیولوژیک وسیع و با احتمال ایجاد اثرات جانبی محدود شدت گرفته است. آنتی اکسیدان های موجود در منابع گیاهی به عنوان جاروبگر رادیکال های آزاد یا اکسیژن فعال شناخته می شوند [٤،٥] و مهمترین فایده آنها اثرات ضد سرطانی می باشد [٦] رابطه مثبتی بین فعالیت آنتی اکسیدانی گونه های گیاهی و حضور ترکیبات فنولی وجود دارد [۷]، که علاوه بر محافظت از قلب، محافظت عصبی و فعالیت های ضد سرطانی، عوامل محافظت طبیعی نیز می باشند و از آسیب اکسیداتیو و آلودگی های میکروبی جلوگیری می کنند [۸]. فلاونوئید ها دسته وسیعی از ترکیبات فنولی در گیاهان می باشند که فعالیت آنتی اکسیدانی وسیعی از آنها گزارش شده است [۹]. به منظور استفاده از اثرات سودمند آنتی اکسیدان های گیاهی در صنایع غذایی می توان محصولات را طی فرآوری در کارخانه جات با این ترکیبات غنی سازی نمود [۱۰]. میزان حضور ترکیبات فنولی در محصولات غذایی به صورت طبیعی یا غنی شده نشان دهنده ارزش غذایی آن محصول در حفظ سلامتی بشر است. از همین رو میزان و کیفیت استخراج این ترکیبات از منابع گیاهی بسیار حائز اهمیت است. استفاده از ماکروویو[4]، امواج التراسونیک[5]، فشار بالای هیدروستاتیک[6] و دی اکسید کربن فوق بحرانی[7] جزء روش های نوین استخراج ترکیبات مؤثره گیاهی محسوب می شود [۱۱،۱۲]. از بین این روش ها، استخراج به کمک التراسونیک بسیار ساده و کارآمد بوده، [۱۳] در عین حال باعث بهبود کیفیت عصاره استخراجی می شود و در چند سال اخیر نیز مورد توجه صنایع غذایی قرار گرفته است [١٤]. بر اساس مطالعات صورت گرفته در مورد استخراج ترکیبات زیست فعال از گیاهان دارویی نظیر مرزنجوش[8] [۱۵] و پونه گاوی[9] [١٦] با استفاده از امواج فراصوت مشخص شده است که استفاده از این روش نسبت به روش های سنتی باعث افزایش عملکرد و بهبود کیفیت عصاره استخراجی گردیده، همچنین به منظور استخراج ترکیبات حساس به حرارت مناسب می باشد [۱۷]. از طرفی روش سطح پاسخ به عنوان یک روش کارآمد جهت بهینه سازی فرآیند استخراج معرفی شده است که از آن برای تعیین مقادیر بهینه فاکتورهای مورد بررسی استفاده می شود. از مزایای این روش می توان به توانایی بررسی ترکیبی اثر متغیرهای مستقل در بهینه سازی یک فرآیند، همچنین حصول حداکثر بازده و حداکثر ضریب اطمینان صحت آزمایش، نیاز به زمان و تیمارهای کمتر اشاره کرد [۲۰،۱۹،۱۸]. گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) از خانواده *Hypericaceae*، گیاهی علفی، چند ساله، بومی اروپا و آسیا

1. TBHQ
2. BHA
3. BHT

4. Microwave Assisted Extraction (MAE)
5. Ultrasound Assisted Extraction (UAE)
6. High Hydrostatic Pressure
7. Supercritical CO_2
8. *Origanum majorana* L.
9. *Flomidoschema parviflora*

می باشد. استفاده سنتی از این گیاه به بیش از ۲۰۰۰ سال پیش بر می گردد [۲۱]. از نظر خواص دارویی مهمترین گونه این جنس و یکی از پرفروش ترین گیاهان دارویی در سطح دنیا به شمار می رود. طیف گسترده ای از ترکیبات فعال بیولوژیکی تاکنون از این گیاه شناسایی و گزارش شده است که از آن جمله می توان به نفتودیانترون ها (هایپریسین و سودوهایپریسین)، آسیل فلوروگلوسینول ها (هایپرفورین و ادهایپرفورین)، زانتون ها و فلاونوئید ها (کوئرستین و هایپرین) اشاره نمود [۲۲]. بیشترین کاربرد گل راعی مربوط به خاصیت ضد افسردگی آن می باشد که در سال های اخیر جهت درمان جایگزین برای افسردگی های خفیف تا متوسط رواج یافته است [۲۳]. علاوه بر این عصاره این گیاه از خاصیت ضد التهابی، ضد میکروبی، ضد سرطانی و ضد ویروسی نیز برخوردار می باشد [۲٤]. با وجود اینکه گل راعی از منابع ارزشمند ترکیبات آنتی اکسیدانی به شمار می رود و از دیرباز در مصارف طب سنتی استفاده می شده است اما همچنان اطلاعات کمی در مورد نحوه استخراج آنتی اکسیدان های فنولی آن وجود دارد. بنابراین هدف این پژوهش بررسی اثر عوامل مختلف از جمله حلال، زمان و دما بر میزان استخراج ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره گل راعی به کمک امواج التراسونیک و روش سطح پاسخ بود.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد گیاهی

سرشاخه های گلدار گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) در اواخر خرداد ۱۳۹٦ از ارتفاعات شهرستان مهاباد (با طول و عرض جغرافیایی، ″۵۱ ′۴۳ °۴۵ و ″۴۳ ′۴۷ °۳۶) واقع در استان آذربایجان غربی جمع آوری شد. سپس در دمای اتاق و دور از نور خورشید، در مسیر جریان هوا خشک گردید. گل های آن پس از جدا سازی به منظور عصاره گیری و انجام آزمایشات بعدی توسط هاون به طور کامل پودر گردید.

۲-۲- عصاره گیری

جهت استخراج ترکیبات زیست فعال، گل های خشک و پودر شده گل راعی (۲۰۰ میلی گرم) در ویال های حاوی نسبت های مختلف متانول به آب (X_1)، در زمان های مختلف (X_2) با دما های متفاوت (X_3) به صورت جداگانه توسط دستگاه التراسونیک (۱۲۰هرتز) عصاره گیری شد (جدول ۱). سپس عصاره ها با استفاده از کاغذ صافی، تصفیه و در ویال های شیشه ای در بسته ریخته شدند و تا زمان انجام آزمایشات در دمای ٤ درجه سانتی گراد و تاریکی نگهداری گردیدند.

۲-۳- اندازه گیری میزان فنول کل

اندازه گیری ترکیبات فنولی با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو[1] صورت گرفت. ۵ میکرولیتر از هر عصاره با ۱۸۰ میکرولیتر آب دی یونیزه ترکیب شد. در مرحله بعد ۱۲۰۰ میکرولیتر فولین به مخلوط افزوده و بعد از ۵ دقیقه به آن کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه شد. پس از آن نمونه ها به مدت ٤۵-۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شدند. در نهایت جذب در طول موج ۷٦۰ نانومتر به وسیله اسپکتوفتومتر (MODEL: UV2100 PC) قرائت شد. آب دی یونیزه به عنوان شاهد و گالیک اسید به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. منحنی استاندارد بر اساس گالیک اسید ترسیم و نتایج به صورت میلی گرم اکی والان گالیک اسید

1. Folin-Ciocalteu

بر وزن خشک گیاه گزارش شد [۲۵].

۲-٤- اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل

برای سنجش میزان فلاونوئید کل به ۱۰ میکرولیتر از هر عصاره، ۱/۵ میلی لیتر متانول (۸۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلرید (۱۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات سود ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط بعد از گذشت ٤۰ دقیقه در طول موج ٤۱۵ نانومتر نسبت به شاهد قرائت گردید. برای رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد. میزان فلاونوئید کل عصاره ها بر اساس میلی گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد [۲٦].

۲-۵- اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی به روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل[1] (DPPH)

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH، ۲ میکرولیتر از هر عصاره را در یک لوله آزمایشی ریخته سپس به آن ۲۰۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH (از قبل آماده شده) اضافه شد. محلول حاصل را تکان داده سپس در دمای آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری و جذب آن در ۵۱۷ نانومتر در اسپکتوفتومتر قرائت شد [۲۷].

$$(1)\ RSA = \frac{(Abs\ control)t = 30min - (Abs\ sample)t = 30min}{(Abs\ control)t = 30min} \times 100$$

Abs blank: میزان جذب بلانک، Abs sample : میزان جذب نمونه

۲-٦- اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی به روش قدرت آنتی اکسیدانی احیاء آهن[2] (FRAP)

۳۰ میکرولیتر از هر عصاره با ۳ میلی لیتر معرف تازه FRAP (بافر استات سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۳/٦، فریک- تری پریدیل اس- تریازین و فریک کلرید) ترکیب شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد) قرار گرفت و جذب آن در طول موج ۵۹۳ نانومتر و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نسبت به شاهد خوانده شد. از سولفات آهن برای رسم منحنی استاندارد استفاده گردید و نتایج داده‌ها بر اساس DW mmol Fe^{++}/g بیان شد [۲۸].

۲-۷- طرح آزمایش، تجزیه و تحلیل آماری

در پژوهش حاضر به منظور طراحی آزمایش و ارزیابی استخراج آنتی اکسیدان های فنولی از گل های گل راعی، روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی[3] اجرا گردید. این طرح شامل سه متغیر مستقل (حلال، زمان و دما) در پنج سطح و نقطه مرکزی دارای شش تکرار بود. کلیه آزمایشات نیز با سه تکرار انجام گردید. سطوح متغیرهای مستقل و کد های مربوطه در جدول ۱ ذکر شده است. سطوح بالا و پایین متغیرها بر اساس پیش تیمارهای انجام شده و بررسی منابع موجود انتخاب گردید. همچنین به منظور انتخاب مناسب ترین مدل تجربی جهت پیش بینی پاسخ ها، روابط خطی، اثرات متقابل و درجه دوم از نرم افزار دیزاین اکسپرت[4] (نسخه ۱۰) استفاده شد. جهت ارزیابی صحت مدل های پردازش شده، آزمون ضعف پردازش[5]، مقادیر R^2، R^2 (adj) مدل و p ضرایب تعیین شد (جدول ۲).

1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

2. Frric Reducing Antioxidant
3. Central Composite Design
4. Design Expert
5. Lack of fit

Table 1 Independent variables and their values

Coded levels					Symbol	variables
+1.68	+1	0	-1	-1.68		
75.22	65	50	35	24.77	X_1	Solvent (percentage)
18.40	15	10	5	1.59	X_2	Time (minutes)
75.22	65	50	35	24.77	X_3	Temperature (Degrees celsius (°C))

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی یافتن روش عصاره گیری مناسب

به منظور استفاده مناسب از منابع و بهینه سازی روند استخراج، انتخاب تکنیک مناسب و عوامل حاکم بر آن نقش حیاتی را در استخراج ترکیبات زیست فعال دارد. در همین راستا جهت عصاره گیری از گل های گل راعی با بالاترین راندمان و بهترین کیفیت از دستگاه التراسونیک (۱۲۰Hz) و حلال هیدروالکلی (نسبت های مختلف متانول به آب) در زمان های مختلف و دماهای متفاوت به عنوان سه فاکتور مهم و تأثیرگذار در فرآیند عصاره گیری استفاده شد. امواج التراسونیک منجر به تورم بافت، ایجاد تخلخل در دیواره سلول ها و جذب بهتر حلال شده در نتیجه خروج ترکیبات از بافت به حلال و انتقال جرم را تسریع می کند [۲۹]. استفاده از فرکانس صوتی پایین که توسط التراسونیک ایجاد می شود در مقایسه با تکنیک های فراصوت باعث ایجاد اثرات فیزیکی قوی تری می گردد. همچنین با یکنواختی و کاهش شیب حرارتی منجر به انتقال سریعتر انرژی در نتیجه تسهیل فرآیند استخراج می شود [۳۰]. درجه حرارت، زمان، حلال، قدرت و فرکانس پارامترهای اصلی و مؤثر در کارایی التراسونیک هستند [۲۹]. مطالعات صورت گرفته روی محتوای فنولی با حلال های مختلف در گل راعی بیانگر این است که نوع حلال نقش مؤثری در استخراج ترکیبات فنولی دارد. بر اساس نتایج بدست آمده از این مطالعات متانول در مقایسه با سایر حلال ها با کارایی بیشتری در این زمینه عمل می نماید [۳۲،۳۱]. از طرفی تغییر در نسبت متانول به آب فرآیند استخراج را به دلیل افزایش حلالیت پلی فنول ها بهبود می بخشد. از آنجائیکه پلی فنول ها محدوده متفاوتی از حلالیت را دارا می باشند بنابراین ترکیبی از آب و متانول می تواند نسبت به استفاده انفرادی هر کدام از حلال ها مفید تر باشد [۳۳].

۳-۲- پردازش داده های آزمایش و انتخاب بهترین مدل

به منظور بهینه سازی فرآیند استخراج، داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار دیزاین اکسپرت و بر اساس روش سطح پاسخ پردازش شدند. طرح های دهلرت[1]، باکس بنکن[2] و مرکب مرکزی سه روش اصلی طراحی سطح پاسخ می باشند. در بین این سه روش طرح مرکب مرکزی از اعتبار و دقت بیشتری برخوردار است. این روش با معیار قرار دادن تعداد متغیرها و حدود بیشینه و کمینه تعیین شده هر متغیر، ماتریس آزمایش را طراحی می کند. بدین ترتیب تعداد آزمون ها و سطوح هر متغیر در هر آزمون مشخص می شود. زمانی که تعداد متغیر ها زیاد باشد این روش در مقایسه با روش های پر حجمی مانند فاکتوریل کامل، ارجحیت دارد و باعث تسهیل روند تحقیق، کاهش زمان و هزینه ها خواهد شد [۳٤]. از نظر آماری مدلی مناسب است که آزمون ضعف پردازش آن معنی دار نبوده و دارای بالاترین مقدار R^2 و R^2- adj باشد [۳۵]. بر همین اساس پس از پردازش داده ها به منظور انتخاب بهترین مدل از بین مدل های پیشنهادی با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس مشخص شد که مدل Quadratic برای فنول کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH و مدل 2FI برای فعالیت آنتی اکسیدانی به روش FRAP جهت بررسی روند تغییرات فاکتورهای اندازه گیری شده مناسب تراز دیگر مدل ها می باشد (جدول ۲).

1. Doehlert
2. Box-Behnken

Table 2 Analysis of variance of the effect of independent changes on total phenol content, total flavonoid, and antioxidant resistance (FRAP, %DPPH)

Sum of squares				DF	Source
FRAP	%DPPH	TFC	TPC		
13.15*	3966.99*	784.63*	932.38**	9	Model
0.073 ^{ns}	270.78**	318.77*	320.95**	1	X_1
4.69*	978.22*	32.16 ^{ns}	196.66**	1	X_2
4.70**	1635.57**	4.88 ^{ns}	245.27**	1	X_3
1.55*	140.99 ^{ns}	24.36 ^{ns}	41.62**	1	X_1X_2
0. 57*	105.54 ^{ns}	3.94 ^{ns}	26.01*	1	X_1X_3
1.25**	16.02 ^{ns}	6.25 ^{ns}	41.92**	1	X_2X_3
0.12 ^{ns}	155.07 ^{ns}	300.25*	0.37 ^{ns}	1	X_1X_1
0.20 ^{ns}	498.04*	129.59*	21.04**	1	X_2X_2
0.073 ^{ns}	379.5*	5.72 ^{ns}	46**	1	X_3X_3
0.01	0.13	0.18	0.16	4	Pure error
1.04 ^{ns}	305.27 ^{ns}	198.81 ^{ns}	48.47 ^{ns}	5	Lack of Fit
-0.8535	-0.8569	-0.7200	-0.8999		R^2–Adjusted R^2
0.9024	0.9284	0.7973	0.9499		

,***ns,; Non-significant and significant at the five and one percent probability levels, respectively

$P<0.01$، R^2 و R^2 تصحیح شده بالا نشانگر پردازش مناسب مدل ها در این روش هستند. F- value حاصل از ضرایب پاسخ ها نشان داد که بیشتر ضرایب خطی، درجه دوم و اثرات متقابل در سطح احتمال پنج و یک درصد معنی دار بودند. به عبارت دیگر نتایج تجزیه واریانس با مدل های پیش بینی شده به کمک روش سطح پاسخ نشان دهنده معنی داری این مدل ها برای هر پنج سطح پاسخ بود.

بر اساس مدل های پردازش شده بر حسب داده های آزمایشی، معادله کلی برای هر یک از پاسخ ها به شرح ذیل است:

(2) $Y_{TPC} = 9.45285 - 4.84994X1 + 3.79638X2 + 4.23974X3 + 2.28078X1X2 - 1.80321X1X3 + 2.28901X2X3 + 0.16393X1^2 + 1.24334X2^2 + 1.83847X3^2$

(3) $Y_{TFC} = 27.49450 + 4.83342X1 + 1.53512X2 + 0.59781X3 + 1.74495X1X2 + 0.70153X1X3 - 0.88371X2X3 - 4.69721X1^2 - 3.08599X2^2 + 6.48089E\text{-}004X3^2$

(4) $Y_{DPPH} = 81.89593 - 4.45480X1 + 8.46711X2 + 10.94840X3 + 4.19811X1X2 + 3.632081X1X3 - 1.41509X2X3 - 3.37567X1^2 - 6.04969X2^2 - 5.28091X3^2$

(5) $Y_{FRAP} = 1.67947 + 0.073114X1 + 0.58608X2 + 0.58715X3 + 0.44021X1X2 + 0.26669X1X3 + 0.39596X2X3 - 0.092389X1^2 – 0.12127X2^2 - 0.073408X3^2$

۳-۳- اثر شرایط عصاره گیری روی محتوای فنول کل

نمودار سه بعدی و کانتور (سه بعدی) برای محتوای فنول کل بر اساس متغیرهای X_1-X_3 در شکل ۱ نشان داده شده است. بیشترین مقدار هر نمودار در ارتباط با بهینه نقطه اثرات متقابل دو فاکتور است. بر اساس برهمکنش X_1-X_2 افزایش دما و زمان در ابتدا تأثیر معنی داری بر استخراج ترکیبات فنولی نداشته اند. اما از دمای حدود ٦٥ درجه سانتی گراد و زمان حدود ۱۵ دقیقه یک روند افزایشی به صورت خطی مشاهده شده است (شکل ۱، A). مطالعات بسیاری از محققین روی استخراج ترکیبات فنولی در گیاهان دارویی از جمله کبر[1] و ریواس[2] حاکی از افزایش بازده استخراج این ترکیبات با افزایش دما و زمان استخراج (تا حدود ٤٥ درجه سانتی گراد) است. نتایج نشان دهنده روند کاهشی در مقدار استخراج ترکیبات فنولی در زمان ها و دما های بالاتر (دما های بالای ٤٥ درجه سانتی گراد) است. محققان دلیل این امر را تجزیه حرارتی یا واکنش های پلی‌مریزاسیون ترکیبات فنولی با خودشان بیان نمودند [۳۷،۳٦].

1. *Capparis spinosa*
2. *Rheum ribes* L.

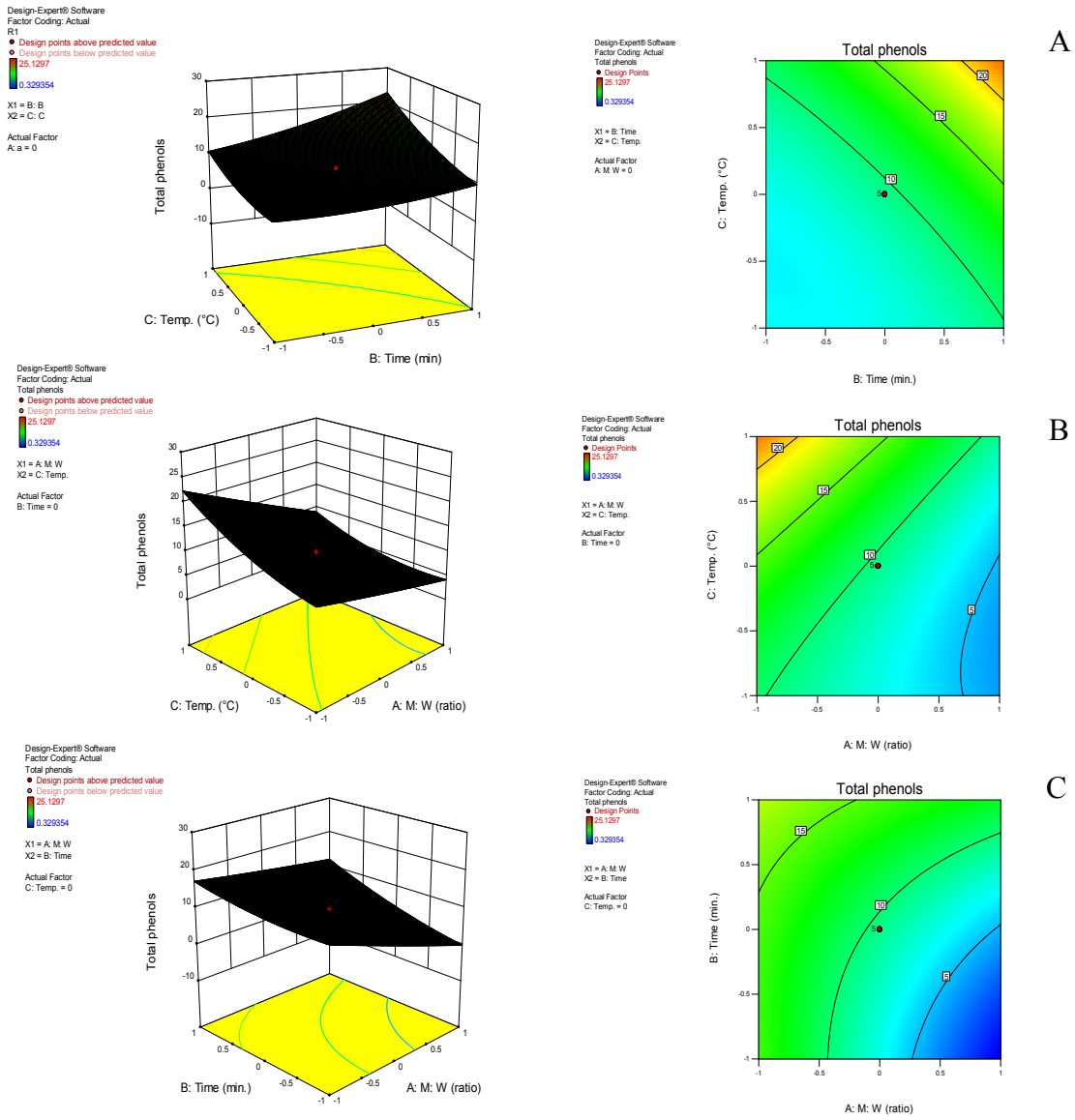

Fig 1 The surface and contour plots describe the interaction effect of independent changes on the extraction phenolic compounds of *Hypericum perforatum* L.

نتایج بدست آمده در این پژوهش بیانگر مقاومت حرارتی بالای ترکیبات فنولی موجود در گل راعی است که می توان به وجود ترکیباتی همچون هایپرسین، هایپرفورین و هایپرین نسبت داد که مختص این گیاه و دارای حلقه فنولی می باشند. این ترکیبات در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی- بهداشتی حائز اهمیت هستند. اثر مثبت دما در افزایش میزان استخراج ترکیبات فنولی و بسیاری از ترکیبات زیست فعال گیاهی توسط محققین زیادی به اثبات رسیده است [۳۸،۳۹] که دلیل این امر افزایش شل شدن سلول ها در دما های بالا، تأثیر بیشتر امواج فراصوتی روی تخریب سلول ها و به دنبال آن افزایش

کارایی استخراج ترکیبات فنولی می باشد. در واقع دما های بالا در فرآیند استخراج منجر به نرم شدن بافت گیاهی، تخریب اتصالات ترکیبات فنولی با پروتئین ها و پلی ساکارید ها و افزایش قابلیت انحلال ترکیبات فنولی می شود که این اثرات می تواند انتقال جرم را بهبود بخشد. از سویی این امر نیز افزایش میزان استخراج را به دنبال دارد. اثر مشاهده شده توسط زمان را می توان به افزایش مدت زمان انتقال جرم نسبت داد [٤٠]. همچنین دما های بالای التراسونیک (٦٥ درجه سانتی گراد) توانست به بیشترین محتوای فنول کل در برهمکنش با نسبت های پایین متانول به آب (٣٥٪) بینجامد (شکل ١، B). این نتیجه نشان می دهد که بخش عمده ای از ترکیبات فنولی تشکیل دهنده گل راعی بسیار قطبی اند یا اینکه به قند یا گروه های قطبی دیگر متصل شده اند [٤١]. در دما های بالا به علت سست و نفوذپذیر بودن دیواره سلولی حلال راحت تر به درون سلول نفوذ کرده و باعث افزایش کارایی استخراج می گردد [٣٨]. این موضوع می تواند با توجه به ارزان و در دسترس بودن آب نسبت به سایر حلال ها به لحاظ اقتصادی حائز اهمیت باشد. در بررسی اثر متقابل زمان و حلال بر استخراج ترکیبات فنولی (شکل ١، C)، حلال به عنوان فاکتور تأثیرگذار نشان داده شد. به طوری که با افزایش زمان استخراج، افزایش راندمان استخراج با شیب کند مشاهده شد و تقریباً روند ثابتی داشت. بیشترین بازده استخراج ترکیبات فنولی (٢٥ میلی گرم اسید گالیک بر وزن خشک) در نسبت های پایین متانول به آب (حدود ٣٥ درصد) ثبت شد و پس از آن با افزایش این نسبت روند استخراج به صورت نزولی نشان داده شد که این مشاهده مطابق با نتایج مطالعات قبلی است [١٦]. بر اساس مطالعات انجام شده استفاده از التراسونیک باعث افزایش معنی داری در استخراج ترکیبات فنولی نسبت به سایر روش های عصاره گیری از جمله روش غرقابی می شود. همچنین این روش موجب حفاظت حرارتی ترکیبات در حین عصاره گیری و افزایش بازده استخراج می شود [١١،٤٢].

٣-٤- اثر شرایط استخراج روی محتوای فلاونوئید کل

ترکیبات فلاونوئیدی تحت تأثیر فاکتورهای X_1 تا X_3 از گل های گل راعی استخراج گردید و نمودار سه بعدی و کانتور اثرات متقابل متغیرها روی استخراج این ترکیبات در شکل ٢ نشان داده شده است. با توجه به نتایج با افزایش دمای التراسونیک در ١٥ دقیقه اول پس از شروع عصاره گیری، افزایش راندمان استخراج به میزان کم و با روند کندی مشاهده شد. سپس به حالت ثابت و بعد از آن نزولی گردید (شکل ٢، A). دما در طی فرآیند عصاره گیری از طریق نرم کردن بافت ها، افزایش حلالیت و ضریب انتشار مواد موجب بهبود فرآیند استخراج فلاونوئید ها می شود [٣٨]. کاهش عملکرد استخراج ترکیبات فلاونوئیدی در دما های خیلی بالا ممکن است به علت تخریب دمایی برخی فلاونوئید ها باشد [٤٣]. بر اساس نمودار سه بعدی (شکل ٢، B) در تقابل دو فاکتور دما و حلال، فاکتور تأثیرگذار حلال نشان داده شد به طوری که با افزایش نسبت متانول به آب تا ٥٠ درصد کارایی استخراج ترکیبات فلاونوئیدی افزایش یافته است و پس از آن افزایش این نسبت تأثیر معنی داری بر استخراج ترکیبات فلاونوئیدی نداشته و روند تغییرات ثابت شده است. همچنین نمودار سه بعدی اثرات متقابل متغیرهای X_1 و X_2 (شکل ٢، C) نشان داد که با افزایش نسبت متانول به آب (٦٥ درصد) به همراه افزایش زمان التراسونیک (١٥ دقیقه) بهره وری استخراج افزایش می یابد و پس از آن روند استخراج به حالت نزولی می رسد. این مشاهدات می تواند به خاطر آماس و تورم مناسب سلول و افزایش پرزهای سلولی با افزایش نسبت متانول به آب [٤٤]، همچنین اشباع شدن حلال از حل شونده ها در دما و زمان های بالاتر [٤٥] و از هم پاشیدگی دمایی برخی فلاونوئید ها باشد [٤٣].

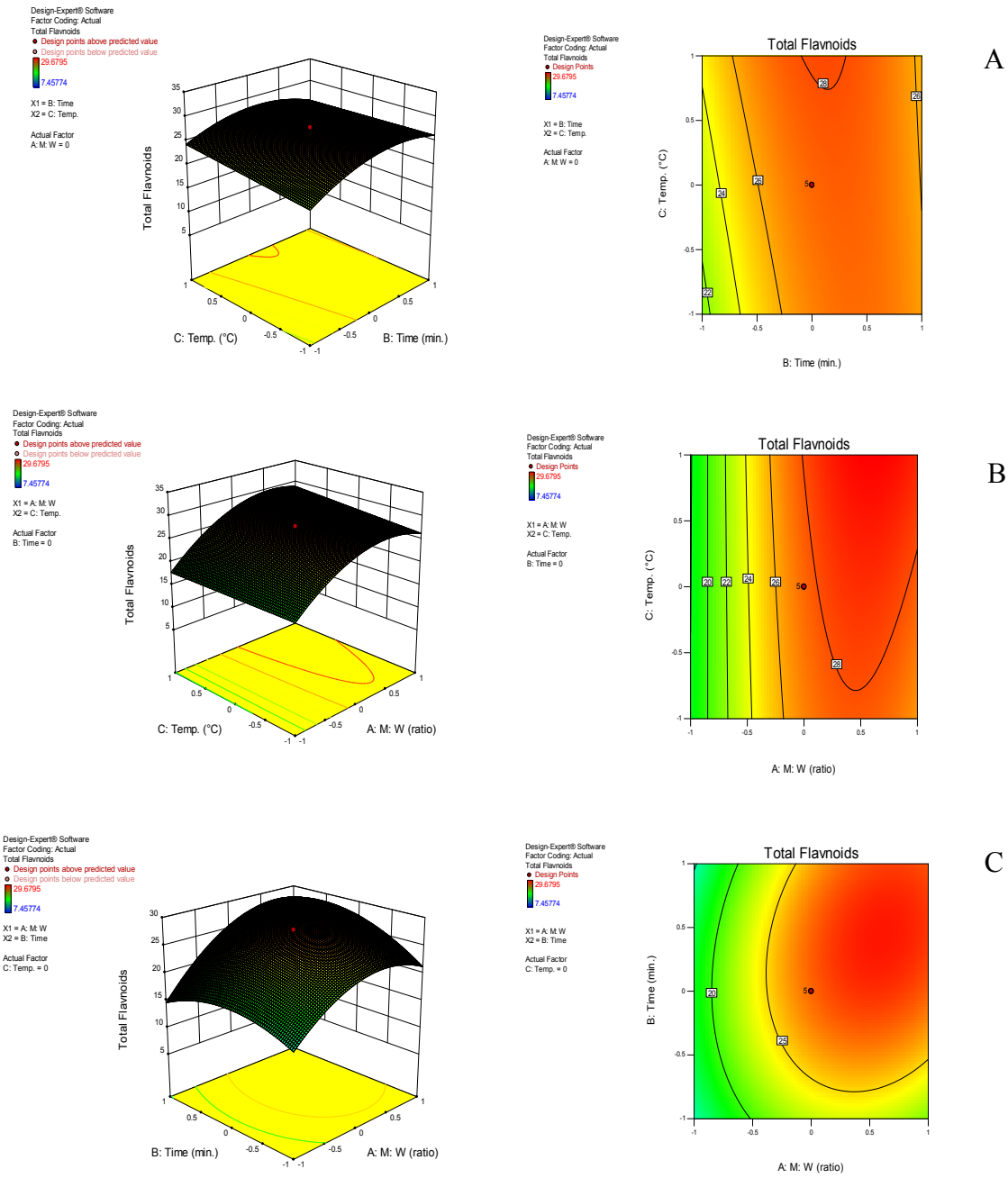

Fig 2 The surface and contour plots describe the interaction effect of independent changes on the extraction flavonoid compounds of *Hypericum perforatum* L.

۳-۵- تأثیر شرایط مختلف عصاره گیری بر فعالیت آنتی اکسیدانی به روش (DPPH%)

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH%) اغلب به عنوان مقیاسی برای ظرفیت مهارکنندگی رادیکال های آزاد و پایه ای برای سنجش الکترون به شمار می رود که نشانگر خوبی برای فعالیت آنتی اکسیدانی است [٤٦]. اثرات متقابل فاکتورهای دما و زمان استخراج روی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی نشان می دهد که با افزایش این دو فاکتور (تا حدود ٦٥ درجه سانتی گراد و ١٥ دقیقه) درصد بازداری رادیکال های آزاد

(%DPPH) به طور قابل توجهی افزایش یافته و پس از آن اثر معنی داری نداشته است (شکل ۳، A). افزایش بازدارندگی رادیکال های آزاد با افزایش دمای استخراج در ۱۵ دقیقه اول پس از شروع عصاره گیری، احتمالاً به دلیل افزایش کارایی استخراج آنتی اکسیدان های فنولی در نتیجه بهبود انتقال جرم با افزایش حلالیت ترکیبات فنولی، افزایش ضریب نفوذ، کاهش ضریب ویسکوزیته حلال و کاهش کشش سطحی در منافذ گیاهی است [۴۸،۴۷].

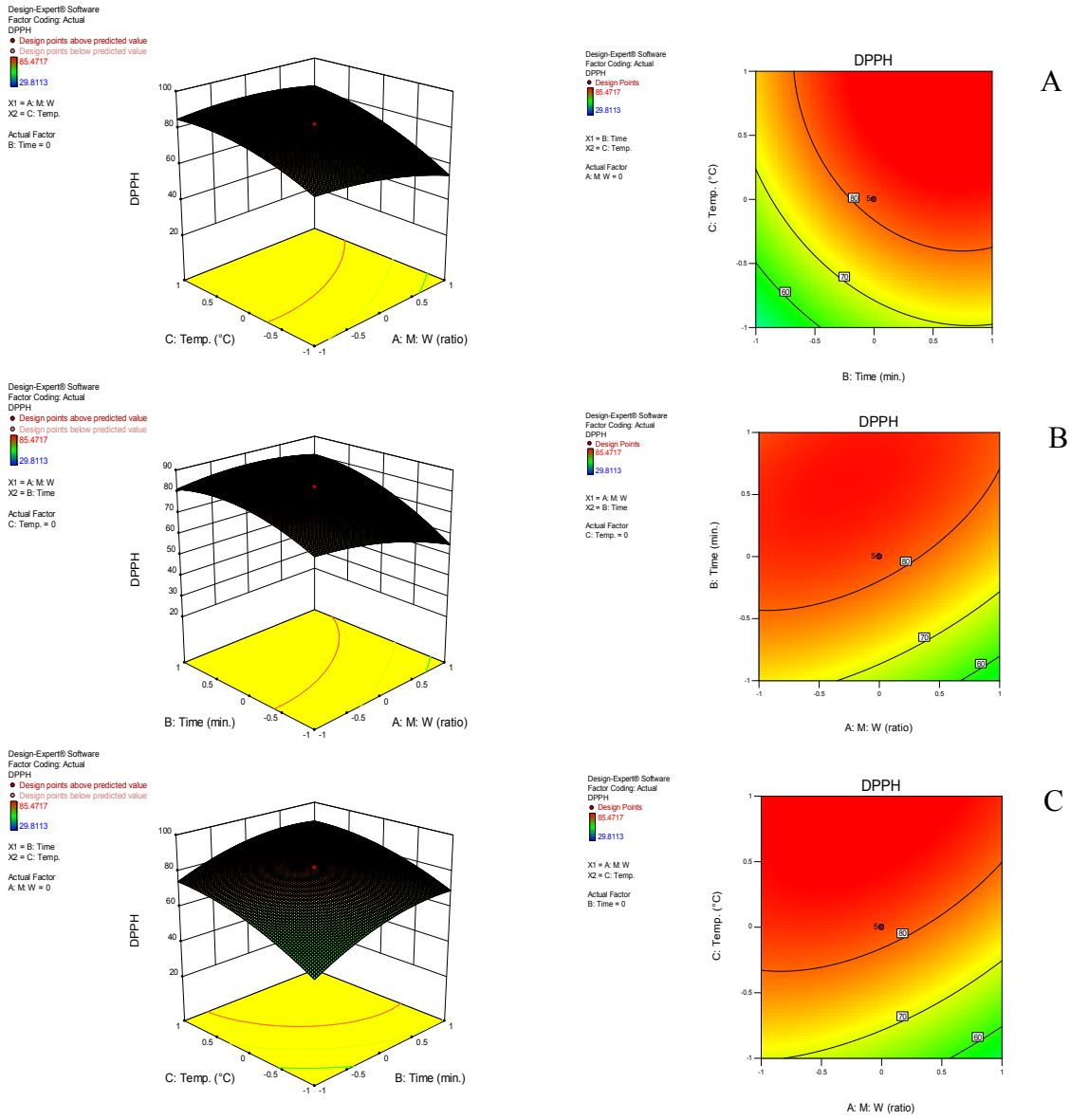

Fig 3 The surface and contour plots describe the interaction effect of independent changes on the extraction of antioxidants estimated by DPPH method in *Hypericum perforatum* L.

اثرات متقابل X_1 و X_2 (شکل ۳، B) نشان داد که با افزایش نسبت متانول به آب میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش می یابد. بیشترین میزان بازدارندگی رادیکال های آزاد در نسبت حدود ۵۰ درصد متانول به آب و دمای ۵۰ درجه سانتی گراد ثبت شد و پس از آن افزایش دما تأثیر معنی داری بر بازده استخراج نداشته است. از طرفی همین نسبت متانول به آب در

تقابل با زمان استخراج نتایج مشابهی را نشان داد (شکل ۳، C). از این رو درصد متانول نمی تواند به عنوان عاملی مستقل در فرآیند استخراج در نظر گرفته شود. اما دلیل کاهش استخراج فعالیت آنتی اکسیدانی در نسبت های بالای متانول به آب را می توان به نقش آب در نفوذ، تورم سلولی و افزایش سطح مؤثر برای متانول نسبت داد [٤٤]. علاوه بر این خود آب نیز با تولید مولکول های هیدروکسیل به فرآیند استخراج و افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی کمک می کند [٤٩]. در تحقیقات قاسمی [٥٠] و Hossain و همکاران [١٥] نیز نتایج مشابهی گزارش شد.

۳-٦- تأثیر شرایط مختلف عصاره گیری بر فعالیت آنتی اکسیدانی به روش (FRAP)

طرح نقشه سه بعدی برای فعالیت آنتی اکسیدانی بر اساس (FRAP) شامل اثرات متقابل بین نسبت متانول به آب (X_1)، زمان التراسونیک (X_2) و دمای التراسونیک (X_3)، در شکل ٤ آمده است.

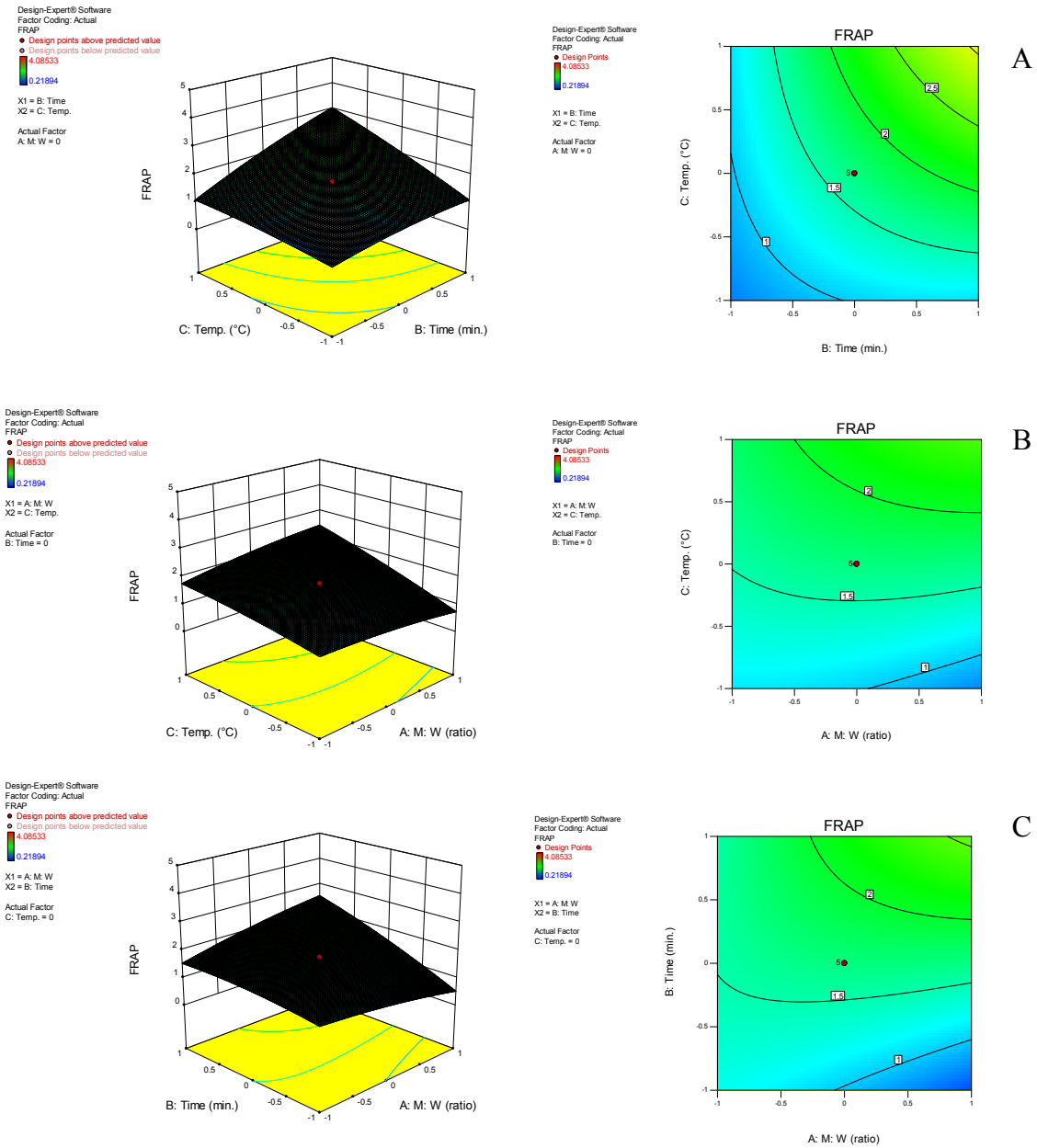

Fig 4 The surface and contour plots describe the interaction effect of independent changes on the extraction of antioxidants estimated by FRAP method in *Hypericum perforatum* L.

در این نمودار میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به روش (FRAP) با افزایش دمای استخراج به صورت خطی افزایش می یابد. شکل ٤، A، زمان های متعادل این روند افزایشی را نشان داده است. این افزایش ناشی از تخریب بیشتر دیواره سلولی، تماس بیشتر حلال و حل شونده و در نتیجه افزایش ترکیبات فنولی و متعاقباً افزایش درصد بازداری می باشد [٥١]. در اثر متقابل بین فاکتورهای دما و نسبت متانول به آب، مطابق با نتیجه بدست آمده در روش (DPPH) مشاهده شد که با افزایش دما تا حدود ٥٠ درصد و دمای ٦٥ درجه سانتی گراد کارایی استخراج افزایش است و پس از آن دما تأثیر معنی داری نداشته و افزایش نسبت متانول به آب نیز سبب کاهش میزان استخراج شده است. نتایج مشابهی در تقابل بین فاکتورهای زمان و حلال (نسبت متانول به آب) بدست آمد (شکل ٤، B و C). نتایج حاصل از سنجش قدرت آنتی اکسیدانی در عصاره هیدروالکلی حاصل از گل های گل راعی به دو روش (DPPH% و FRAP) کاملاً یکدیگر را تأیید می کنند و مکمل یکدیگر هستند. از طرفی بررسی همبستگی موجود بین صفات فیتوشیمیایی مورد مطالعه حاکی از وجود همبستگی مثبت و معنی داری بین فنول کل (بالای ٦٠ ٪ $= r^2$) با فعالیت آنتی اکسیدانی به هر دو روش (DPPH% و FRAP) و همبستگی ضعیف تر (حدود ٣٠ ٪ $= r^2$) ترکیبات فلاونوئیدی با فاکتورهای یاد شده بود. این نتایج نشان می دهد که فعالیت آنتی اکسیدانی گل راعی بیشتر مربوط به گروه نفتودیانترون ها (هایپریسین و سودوهایپریسین) و آسیل فلوروگلوسینول ها (هایپرفورین و ادهایپرفورین) می باشد. نظر به اینکه این دو گروه جزء ترکیبات فنولی مهم و دلیل اهمیت و ارزش دارویی گل راعی می باشند، مطالعه حاضر می تواند راهگشای استخراج مؤثرتر این ترکیبات از گل راعی و مقدمه ای در راستای استفاده عملی از روش های سطح پاسخ جهت بهینه سازی استخراج متابولیت های ثانویه از گیاهان دارویی در مقیاس صنعتی و آزمایشگاهی برای اهداف غذایی و دارویی باشد.

۳-۷- بهینه سازی همزمان مقادیر با ارزش مطلوبیت در استخراج آنتی اکسیدان های فنولی از گل راعی

شرایط بهینه استخراج ترکیبات زیست فعال از گل راعی در شکل ٥ نشان داده شده است. بر اساس نتایج این پژوهش نسبت متانول به آب ٥٠ درصد، زمان ١٥ دقیقه و دمای ٧٠ درجه سانتی گراد شرایط مناسبی جهت استخراج آنتی اکسیدان های فنولی از گل راعی می باشد. هر چند نتایج نشان می دهد که جهت یافتن ایده آل ترین شرایط استخراج نیاز به انجام آزمایشات تکمیلی بر اساس یافته های این تحقیق است. در این شرایط بهینه مقدار فنول کل ٢٨/٤٦ میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک، مقدار فلاونوئید ١٩/٧٥ میلی گرم کوئرسیتین بر گرم وزن خشک، مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH%) ٨٩/٢٣ درصد و مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی (FRAP) ٣/٥٧ میکرومول آهن در گرم وزن خشک ثبت شد. مطلوبیت بدست آمده در شرایط بهینه برای متغیرها و پاسخ های مورد بررسی ٠/٨٩٥ بود.

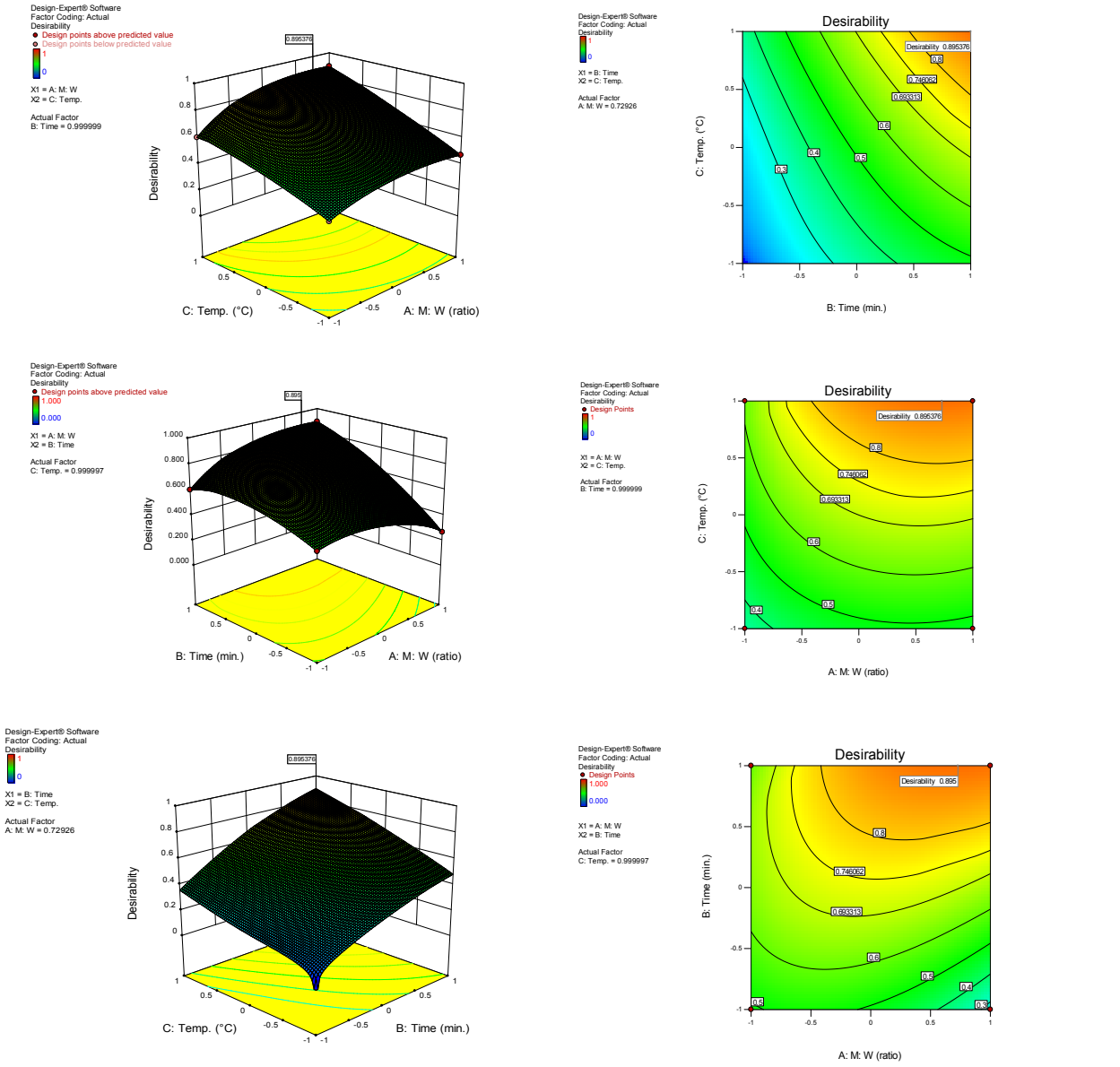

Fig 5 Profiles for predicted values and desirability of process parameters on the extraction of phenolic compounds of *Hypericum perforatum* L.

٤- نتیجه گیری کلی

نیاز مداوم جامعه بشری به استخراج متابولیت های ثانویه گیاهی با توجه به اثرات سوء و نامطلوب آنتی اکسیدان های سنتزی و گرایش به جایگزینی افزودنی های طبیعی به جای انواع سنتزی در مواد غذایی سبب انجام پژوهش های گسترده ای در زمینه معرفی فرآیند استخراجی کارآمد تر و اقتصادی تر شده است و از آنجائیکه میزان حضور ترکیبات فنولی در محصولات غذایی به صورت طبیعی یا غنی شده ارتباط

مستقیمی با ارزش غذایی آن محصول در حفظ سلامتی بشر و جلوگیری از انواع بیماری ها دارد، بنابراین میزان و کیفیت استخراج این ترکیبات از منابع گیاهی بسیار حائز اهمیت است. از همین رو مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر عوامل مختلف از جمله حلال، زمان و دما بر میزان استخراج ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و ظرفیت آنتی اکسیدانی گل های گل راعی به کمک امواج التراسونیک و روش سطح پاسخ انجام گردیده است. با استناد به تحقیقات صورت گرفته، تجزیه با روش سطح پاسخ و امواج فراصوت، بهترین شرایط بررسی فاکتورهای مورد نظر با کمترین تکرار و بالاترین دقت در دستیابی به ایده آلترین بازده را فراهم می کند. بر اساس نتایج بدست آمده از این مطالعه دمای ۷۰ درجه سانتی گراد، زمان ۱۵ دقیقه و نسبت متانول به آب ۵۰ درصد شرایط مناسبی برای استخراج آنتی اکسیدانی فنولی از گل های گل راعی است. تغییر در نسبت متانول به آب، فرآیند استخراج را به دلیل افزایش حلالیت پلی فنول ها بهبود می بخشد. از آنجائیکه پلی فنول ها محدوده متفاوتی از حلالیت را دارند، بنابراین ترکیبی از آب و متانول می تواند نسبت به استفاده انفرادی هر کدام از حلال ها مفید تر باشد. همچنین بر خلاف بسیاری از گزارشات در رابطه با استخراج ترکیبات فنولی از گیاهان دارویی، افزایش دما و زمان استخراج در گل راعی منجر به افزایش بازده استخراج این ترکیبات شده است که این امر بیانگر مقاومت حرارتی بالای هایپرسین، هایپرفورین و هایپرین به عنوان ترکیبات اصلی گل راعی می باشد که در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی- بهداشتی حائز اهمیت می باشند. مقادیر مناسب R^2 و R^2_{adj} بیانگر قدرت بالای مدل های پردازش یافته در پیش بینی و توصیف مناسب تغییرات پاسخ به عنوان تابعی از متغیر های مستقل می باشد. این نتیجه حاکی از این است که کاربرد روش سطح پاسخ به همراه امواج التراسونیک در بهینه سازی شرایط عصاره گیری و حصول حداکثر بازده از گل راعی با توجه اهمیت مواد مؤثره این گیاه و کاربرد وسیع آن در زمینه دارویی و غذایی بسیار مناسب و منطقی خواهد بود. ولی انجام تحقیقات تکمیلی جهت دستیابی به ایده آل ترین شرایط استخراج پیشنهاد می شود.

۵- منابع

[1] Ignat, I, Volf, I, Popa, VI, 2011, A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, Food Chemistry, 126, 1821-1835.

[2] Meziant, L, Benchikh, Y, Louaileche, H, 2014, Deployment of response surface methodology to optimize recovery of dark fresh fig (Ficus carica L., var. Azenjar) total phenolic compounds and antioxidant activity, Food Chemistry, 162, 277-282.

[3] Hayouni, EA, Abedrabba, M, Bouix, M, Hamdi, M, 2007, The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L. and Juniperus phoenicea L. fruit extracts, Food Chemistry, 105, 1126-1134.

[4] Rohman, A, Riyanto, S, Yuniarti, N, Saputra, W, Utami, R, Mulatsih, W, 2010, Antioxidant activity, total phenolic, and total flavaonoid of extracts and fractions of red fruit (Pandanus conoideus Lam), International Food Research Journal, 17, 97-106.

[5] Shabkhiz, MA, Pirouzifard, MKH, Pirsa, S, Mahdavinia, GR, 2021, Alginate hydrogel beads containing Thymus daenensis essential oils/Glycyrrhizic acid loaded in β-cyclodextrin. Investigation of structural, antioxidant/antimicrobial properties and release assessment, Journal of Molecular Liquids, 334.

[6] Dai, J, Mumper, RJ, 2010, Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15, 7313-7352.

[7] Chan, KW, Iqbal, S, Khong, NM, Babji, AS, 2011, Preparation of deodorized antioxidant rich extracts from 15 selected spices through optimized aqueous extraction, Journal of Medicinal Plants Research, 5(25), 6067-6075.

[8] Freeman, BL, Eggett, DL, Parker, TL, 2010, Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges, Journal of food science, 75, C570-C576.

[9] Hassan, HMM, Hassan, NMM, 2010, In

vitro antioxidant and free radical scavenging activities of red Grape Seed extracts, Global Journal of Biotechnology and Biochemistry, 5(2), 106-115 .

[10] Rodriges, S, Gustavo, ASP, 2007, Optimization of ultrasound extraction of phenolic compound from coconut shell powder by response surface methodology, Ultrasonics Sonochemistry, 15, 95-100.

[11] Arianfar, A, Shahidi, F, Kadkhodai, R, Varidi, M, 2015, Factors on the production of polyphenols and antioxidant activities of green tea, Iranian Journal of Food Science and Technology, 11 (4), 295-285.

[12] Kalantari, S, Roufegarinejad, L, Pirsa, S, Gharekhani, M, Tabibiazar, M, 2021, β-Cyclodextrin-assisted extraction of phenolic compounds from pomegranate (Punica granatum L.) peel: A new strategy for anthocyanin copigmentation, LWT, 151 .

[13] Ghafoor, K, Choi, YH, Jeon, JY, Jo, IH, 2009, Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (Vitis vinifera) seeds, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 4988-4994.

[14] Ghorbani, M, Abu Najmi, M, Ghorbani Javid, M, 2015, Ultrasonic waves, a new method in extracting plant compounds, Scientific Journal of Acoustic and Vibration Extension, Fourth Year, No. 8.

[15] Hossain, MB, Brunton, NP, Patras, A, Tiwari, B, O'Donnell, C, Martin-Diana, AB, Barry-Ryan, C, 2012, Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (Origanum majorana L.) using response surface methodology, Ultrasonics Sonochemistry, 19, 582-590.

[16] Heidari Majd, M, Mortazavi, SA, Asili, J, Blourian, Sh, 2011, Optimization of extraction of phenolic compounds from Flomidoschema parviflora using ultrasound, Journal of Herbal Medicine, Third Year, No.17-13.

[17] Chemat, F, Khan, MK, 2011, Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction, Ultrasonics sonochemistry, 18, 813-835.

[18] Koocheki, A, Mortazavi, SA, Shahidi, F, Razavi, SM, Kadkhodaee, R, Milani, JM, 2010, Optimization of mucilage extraction from Qodume shirazi seed (Alyssum homolocarpum) using response surface methodology, Journal of Food Process Engineering, 33, 861-882.

[19] Bashi, DS, Mortazavi, SA, Rezaei, K, Rajaei, A, Karimkhani, MM, 2012, Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Yarrow (Achillea beibrestinii) by response surface methodology, Food Science and Biotechnology, 21, 1005-1011.

[20] Pirsa, S, Banafshechin, E, Amiri, S, Rahimirad, A, Ghafarzadeh, J, 2021, Detection of fraud of palm, sunflower, and corn oil in butter using HPLC profile of tocopherols and tocotrienols by response surface method, Journal of the Iranian Chemical Society, 18, 1167–1177 .

[21] Zobayed, S, Afreen, F, and Kozai, T, 2005, Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's wort, Plant Physiology and Biochemistry, 43, 977-984.

[22] Radusiene, J, Judzentiene, A, Bernotiene, G, 2005, Essential oil composition and variability of Hypericum perforatum L. growing in Lithuania, Biochemical Systematics and Ecology, 33:113-124.

[23] Jean, D, Pouligon, M, Henriot, A, 2006, Pharmacological activity of three commercial Hypericum perforatum preparations in mice, Phytotherapy Research, 20, 653-654.

[24] Bertoli, A, Cirak, C, Silva, J, 2011, Hypericum species as sources of valuable essential oils, Med aroma plant sci biotech, 5, 29-47.

[25] Ebrahimzadeh, M, Hosseinimehr, S, Hamidinia, A, Jafari, M, 2008, Antioxidant and free radical scavenging activity of Feijoa sallowiana fruits peel and leaves, Pharmacologyonline, 1: 7-14.

[26] Razavi, SM, Zahri, S, Zarrini, G, Nazemiyeh, H, Mohammadi, S, 2009, Biological activity of quercetin-3-O-glucoside, a known plant flavonoid. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 35, 376-378.

[27] Nakajima, JI, Tanaka, I, Seo, S, Yamazaki, M, Saito, K, 2004, LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries, BioMed Research International, 2004, 241-247.
[28] Zugic, A, Dordevic, S, Arsic, I, Markovic, G, Zivkovic, J, Jovanović, S, Tadic, V, 2014, Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia, Industrial Crops and Products, 52, 519-527.
[29] Azmir, J, Zaidul, I, Rahman, M, Sharif, K, Mohamed, A, Sahena, F, Jahurul, M, Ghafoor, K, Norulaini, N, Omar, A, 2013, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review, Journal of Food Engineering, 117, 426 - 436 .
[30] Iskalieva, A, Yimmou, BM, Gogate, PR, Horvath, M, Horvath, PG, Csoka, L, 2012, Cavitation assisted delignification of wheat straw: a review, Ultrasonics Sonochemistry, 19, 984 -993.
[31] Silva, BA, Ferreres, F, Malva, JO, Dias, AC, 2005, Phytochemical and antioxidant characterization of Hypericum perforatum alcoholic extracts, Food Chemistry, 90, 157-167.
[32] Razali, N, Razab, R, Junit, SM, Aziz, AA, 2008, Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (Anacardium occidentale), Food Chemistry, 111, 38-44.
[33] Ilaiyaraja, N, Likhith, K, Babu, GS, Khanum, F, 2015, Optimisation of extraction of bioactive compounds from Feronia limonia (wood apple) fruit using response surface methodology (RSM), Food Chemistry, 173, 348-354.
[34] Montgomery, DC, 2008, Design, Analysis of Experiments,7th edn, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ.
[35] Samavati, V, 2013, Polysaccharide extraction from Abelmoschus esculentus: Optimization by response surface methodology, Carbohydrate Polymers, 95, 588-597.
[36] Fattahi, M, Rahimi, R, 2016, Optimization of extraction parameters of phenolic antioxidants from leaves of Capparis spinosa using response surface methodology, Food Analytical Methods, 9, 2321-2334.
[37] Ma, YQ, Chen, JC, Liu, DH, Ye, XQ, 2009, Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: effect of ultrasound, Ultrasonics Sonochemistry, 16: 57-62.
[38] Shi, J, Yu, J, Pohorly, J, Young, JC, Bryan, M, Wu, Y, 2003, Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution, Journal of Food, Agriculture and Environment, 1, 42.
[39] Arjeh, E, Pirouzifard, MK, Pirsa, S, 2019, Optimization Of Enzymatic Pretreatment Of Raw Sugar Beet Juice Using Response Surface Methodology, Iranian Journal of Food Science and Technology, 16, 327 .
[40] Gan, CY, Latiff, AA, 2011, Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from Parkia speciosa pod using response surface methodology, Food Chemistry, 124, 1277-1283.
[41] Mozdastan, S, Ebrahimzadeh, MA, Eslami, S, 2015, Effect of Increasing the Polarity of Solvent on Total Phenol and Flavonoid Contents and Antioxidant Activity of Myrtle (Myrtus communis L.). Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 25, 68-81.
[42] Kalantari, S, Roufegarinejad, L, Pirsa, S, Gharekhani, M, 2020, Green extraction of bioactive compounds of pomegranate peel using -Cyclodextrin and ultrasound, Main Group Chemistry, 19, 61-80.
[43] Escribano-Balin, M, 2003, Chapter 1: Polyphenol Extraction from Foods in: C. Santos-Buelga, G. Williamson,(Eds.) Methods in Polyphenol Analysis, Royal Society of Chemistry.
[44] Liu, Q, Yang, X, Zhang, L, Majetich, G, 2010, Optimization of ultrasonic-assisted extraction of chlorogenic acid from Folium eucommiae and evaluation of its antioxidant activity, Journal of Medicinal Plants Research, 4: 2503-2511.
[45] Jhoo, JW, Lo, CY, Li, S, Sang, S, Ang, CY, Heinze, TM, Ho, CT, 2005, Stability of black tea polyphenol, theaflavin, and identification of theanaphthoquinone as its major radical reaction product. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 6146-6150.

[46] Hung, D, Ou, B, Prior, R, 2005, The chemistry behind antioxidant capacity assay, Agric, Food Chemistry, 53, 1841-1856.
[47] Liyana-Pathirana, C, Shahidi, F, 2005, Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology, Food Chemistry, 93, 47-56.
[48] Pompeu, D, Silva, E, 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.
[49] Tsalagkas, D, Lagana, R, Poljansek, I, Oven, P, Csoka, L, 2016, Fabrication of bacterial cellulose thin films self-assembled from sonochemically prepared nanofibrils and its characterization, Ultrasonics sonochemistry, 28, 136-143.
[50] Ghasemi, Q, 2017, Evaluation of morphological and phytochemical diversity of car populations of Rheum ribes L. in Iran, Master Thesis, Horticultural Sciences, Urmia University, 66-63.
[51] Vinatoru, M, 2001, An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, Ultrasonics Sonochemistry, 8, 303-313.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Optimization of extraction conditions of bioactive compounds from *Hypericum perforatum* L. petals by response surface methodology

Najjari, Z. [1], Fattahi, M. [2*]

[1] Ph.D. student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 03/ 03
Accepted 2022/ 06/ 19

Keywords:

Hypericum perforatum,
Phenolic compounds,
Response surface methodology,
Antioxidant.

DOI: 10.22034/FSCT.19.130.227
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.19.8

*Corresponding Author E-Mail:
mo.fattahi@urmia.ac.ir

ABSTRACT

In the present study, the use of the ultrasonic apparatus has been investigated in the extraction process of *Hypericum perforatum* L. flowers. The effect of methanol to water ratio (24.77, 35, 50, 65, and 75.22 percent), time (1.59, 5, 10, 15, and 18.40 minutes), and temperature (24.77, 35, 50, 65, and 75.22 °C) on the extraction of phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity of the extract using two methods of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH%) and (FRAP) Ferric Reducing antioxidant power (FRAP) were studied using the response surface method and central composite design. The results of RSM showed that the highest extraction efficiency was obtained at 50% methanol/water ratio, 70 °C, and 15 min. Under optimal conditions, the corresponding values for total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant assays of %DPPH and FRAP were 28.46 (mg gallic acid equivalent (GAE) g^{-1} dry weight (DW)), 19.75 (mg quercetin g−1 DW), 89.23 (%DPPH), and 3.57 FRAP µmol Fe++ /g DW respectively. In addition, results express the effectiveness of the proposed conditions and reliability of central composite design analysis on the extraction of phenolic antioxidants from *H. perforatum* flowers. Using ultrasonic is a low-cost, simple, and efficient method for the extraction of phenolic antioxidants, which increases the extraction efficiency and thermal protection of phenolic antioxidants.