مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بهینه سازی استخراج ترکیبات فراسودمند از میوه نسترن کوهی جهت تولید مکمل غذایی

حامد صابریان[۱و۲*]

۱-استادیار گروه پژوهشی افزودنی های غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی.

۲-استادیار مرکز خدمات تخصصی کشاورزی، جهاد دانشگاهی واحد صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰ /۰۱/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۳

کلمات کلیدی:

نسترن کوهی،

استخراج، تغلیظ،

تری ترپنوئید

DOI: 10.22034/FSCT.19.131.357

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.28.9

* مسئول مکاتبات:

Saberian@acecr.ac.ir

چکیده

نسترن کوهی به عنوان یکی از گیاهان داروئی ارزشمند ایران، دارای اثرات سودمندی بر سلامتی انسان می باشد. برای تاثیرگذاری این گیاه بر سلامتی و ایجاد اثرات ضد التهابی (درمان بیماری)، دوز زیادی از این گیاه باید مصرف شود که به خاطر طعم و بافت گیاه، برای بیمار مشکل است. لذا هدف اصلی این تحقیق، تولید کنسانتره نسترن کوهی جهت افزایش میزان مواد موثره در عصاره جهت ارتقاء سطح سلامتی بود. در این راستا، تاثیر غلظت اتانول (۲۰ الی ۹۶ درصد اتانول)، نسبت حلال به ماده جامد (۵ به یک الی ۱۵ به ۱ میلی لیتر بر گرم) و زمان استخراج (۶-۲۴ ساعت) بر ترکیبات عصاره های استخراجی از نسترن کوهی بررسی شد تا بتوان تیمار با بیشترین میزان مواد موثره را انتخاب نمود. نتایج حاکی از آن بود که افزایش نسبت حلال به ماده جامد موجب افزایش همه ترکیبات موثره گردید اگرچه زمان استخراج تاثیر معنی داری بر استخراج این ترکیبات نداشت. افزایش غلظت اتانول نیز موجب افزایش میزان فلاونوئید کل (TFC) و میزان کاروتنوئید کل (TC) و کاهش میزان فنول کل (TPC) گردید. بنابراین، برای افزایش مواد موثره، استخراج دو مرحله ای انتخاب شد تا هم بیشترین TC و TFC استخراج شود (در شرایط بهینه نسبت حلال به ماده جامد ۱۴/۹۴ میلی لیتر بر گرم، زمان ۶ ساعت و غلظت اتانول ۹۶٪) و هم بیشترین TPC (در شرایط بهینه نسبت حلال به ماده جامد ۱۵ میلی لیتر بر گرم، زمان ۶ ساعت و غلظت اتانول ۳۵/۸٪). درنهایت، عصاره های حاصله ترکیب شده و در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد و تحت شرایط خلأ تغلیظ شدند و به روش خشک کردن انجمادی خشک شدند. بیشترین میزان ترپنوئیدِ کل (۸ درصد تری ترپنوئید نسبت به وزن پودر عصاره) نیز مربوط به عصاره حاصل از استخراج دو مرحله ای بود.

۱- مقدمه

میوه نسترن کوهی معمولا به رنگ قرمز تا نارنجی است و از یک پوسته تشکیل شده است که خوشه ای از هسته (دانه) ها را که با گوشت میوه احاطه شده است، می پوشاند. وقتی میوه می رسد (یا کاملا رسیده شده است) قابل برداشت می باشد. میوه های گونه های رز به طور قابل توجهی دارای فواید زیادی برای سلامتی انسان می باشند زیرا حاوی مقادیر زیادی ترکیبات آلی و معدنی از قبیل ویتامین ها، قندها، ترکیبات فنولی، کاروتنوئیدها، توکوفرول ها، فلاوونوئیدهای زیستی، تانن ها، اسیدهای آلی، روغن های فرار و پکتین می باشند [۱]. به همین خاطر، اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی میوه آن قابل توجه است [۲].

از میوه نسترن کوهی در بسیاری از دارونامه¬ها به عنوان دارو یاد شده است. میوه نسترن کوهی برای درمان اختلالات آرتروز، روماتیسم، نقرس، سیاتیک، سرماخوردگی و بیماری¬های عفونی ازجمله آنفلوآنزا، پیشگیری از التهاب مخاط معده و زخم معده مناسب است [۳].

به طور سنتی، نسترن کوهی به عنوان جایگزینی برای ویتامین C جهت درمان سرماخوردگی و عفونت های آنفلوآنزا بکار می‌رود. ویتامین C همچنین نقش مهمی در بازسازی کلاژن در غضروف مفصل بازی می کند و برای سالم نگه داشتن استخوان ها و بافت های حمایتی ضروری می باشد. پتنت US Patent 6,024,960 همبستگی بین میزان ویتامین C بالا و اثر ضدالتهابی ترکیب تهیه شده از نسترن کوهی را نشان داده است [٤].

براساس گزارشات، بهبود در حرکت و تندرستی می تواند با مصرف پودر نسترن کوهی حاصل شود. در سال ۲۰۰٤ یک گروه تحقیقاتی زیر نظر پروفسور خوارزمی در دانشگاه کوپن هنجن، اثر پودر نسترن کوهی بر بیماری های آرتروزی مربوط به مفصل را بررسی کردند و از پودر نسترن یک قسمت گالاکتولیپیدی با استفاده از فرآیند جزء به جزء سازی پیچیده جداسازی کردند [۵].

گیاهان داروئی در بسیاری از تمدن ها از صدها سال پیش یافت شده اند و به خاطر عدم وجود (یا وجود بسیار اندک) اثرات جانبی مورد توجه قرار گرفته اند. طبق تحقیقات محققین، برخی از گیاهان داروئی در درمان بیماری های التهابی موثر شناخته شده اند که از جمله آن ها نسترن کوهی می باشد.

فرمولاسیون های مختلف نسترن کوهی شناخته شده اند و سطوح مختلف اثر ضدالتهابی را نشان داده اند. ثبت اختراع Us 6/024/960 یک فرمولاسیون از گوشت نسترن کوهی است که به عنوان یک داروی طبیعی ضدالتهابی بکار گرفته شده است. در این پتنت، دز مصرفی روزانه ۲۰-۲۰۰ گرم و ترجیحا ٤٥ گرم در روز گزارش شده است [٤].

اگرچه مشخص نشده است که کدام یک از ترکیبات نسترن کوهی دارای ویژگی های سلامتی بخش (ازقبیل اثر ضدالتهابی و نتایج مثبت در درمان و تسکین درد و ...) است اما شناسایی شرایط بهینه فرایند برای تولید مکمل غذایی نسترن کوهی که دارای ترکیبات در مقدار بیشینه باشد، حائز اهمیت فراوان است.

فلاونوئیدها، ترکیبات پلی فنولی طبیعی هستند که حاوی دو حلقه بنزنی متصل به یکدیگر به همراه یک حلقه هتروسیکلیک پیران یا پیرونی می باشند. گزارش های اینویترو و اینویوو حاکی از آن بوده است که این ترکیبات دارای ویژگی های ضد التهابی هستند. بیوفلاونوئیدهای پلی فنولی ازقبیل کوئرستین، در عصاره گونه های مختلف نسترن کوهی (عصاره R. canina، گل های R. Rugosa و R. damascene و برگ های R.davurica) وجود دارند. این فلاونوئیدها معمولا به عنوان یک ترکیب ضد التهابی زیست فعال در برخی داروها مورد استفاده قرار می گیرند. مکانیسم اثر آن ها در درمان بیماری های التهابی از طریق سرکوب سیگنال دهی NF-kappa B، کاهش بیان COX2 است [٦].

ترکیبات فنولی از قبیل متیل گالات در میوه برخی از گونه های نسترن کوهی یافت شده است. نتایج محققین حاکی از آن بوده است که این ترکیب از تبدیل آراشیدونیک اسید به پروستاگلاندین D_2، که وابسته به COX_2 است، ممانعت می کند و بدین وسیله در درمان التهاب نقش دارد [٦]. اثرات مهارکنندگی رادیکال ها توسط آنتی اکسیدان ها برای ترکیبات متعددی در نسترن کوهی (به غیر از ویتامین C) گزارش شده است [۷]. علاوه براین، اثرات ضد التهابی شامل کاهش سیتوکین ها و کموکین های التهابی (Pro-inflammatory)، کاهش علائم NF-kB، ممانعت از آنزیم های التهابی ازقبیل COX1/2، 5-

LOX و iNOS، کاهش سطح پروتئین واکنشگر C، کاهش کموتاکسیس و کمولومینسنس PMN ها و ممانعت از متالوپروتئازهای التهابی می شود. ترکیباتی ازقبیل فنول ها، ترپنوئیدها، گالاکتولیپیدها، کاروتنوئیدها، اسیدهای میوه و اسیدهای چرب می توانند مسئول این اثرات کلینیکی و فارماکولوژیکی باشند. اگرچه تحقیقات بیشتری برای روشن کردن اینکه چگونه و در چه حالتی ترکیبات نسترن کوهی با سلول های هدف خود واکنش می دهند، نیاز است.

مصرف کننده عمدتا ترجیح می دهد تا میزان کمتری از دارو یا غذا دارو را مصرف کند، مخصوصا اگر بافت گیاه داروئی خشبی باشد یا طعم مطلوبی نداشته باشد. مصرف ۲۰-۴۵ گرم پودر نسترن کوهی در روز، برای مصرف کننده دشوار است. بنابراین کاهش اندازه هر واحد مصرفی نسترن کوهی به نحوی که دارای اثرات ضد التهابی باشد، حائز اهمیت است. لذا هدف اصلی این تحقیق، بررسی تاثیر غلظت اتانول (۲۰ الی ۹۶ درصد اتانول)، نسبت حلال به ماده جامد (۵ به یک الی ۱۵ به ۱ میلی لیتر بر گرم) و زمان استخراج (۶-۲۴ ساعت) بر ترکیبات موثره عصاره های استخراجی از نسترن کوهی (فلاونوئیدها، فنول ها، کاروتنوئیدها و ترپنوئیدها) بود تا بتوان تیمار با بیشترین میزان مواد موثره را انتخاب نمود.

۲-مواد و روش ها

۲-۱-جمع آوری و آماده سازی نمونه ها

برداشت میوه های نسترن کوهی از منطقه سمیرم انجام گرفت. مقداری از نمونه های تازه به دو نیم بریده شد و در خشک کن با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند تا رسیدن به رطوبت ثابت خشک شوند. سپس گوشت میوه ها در آسیاب چکشی (یا سایشی) پودر شد و نمونه های پودر در نایلون جمع آوری و در فریزر نگه داری شد.

۲-۲-بهینه سازی استخراج ترکیبات موثره نسترن کوهی

استخراج ترکیبات موثره نسترن کوهی با بررسی تاثیر متغیرهای غلظت اتانول (۲۰ الی ۹۶ درصد اتانول)، نسبت حلال به ماده جامد (۵ به یک الی ۱۵ به ۱ میلی لیتر بر گرم) و زمان (۶-۲۴ ساعت) بر شاخص هایی از قبیل ترکیبات فنولی کل (TPC)، ترکیبات فلاونوئیدی کل (TFC) و کاروتنوئید کل (TC) انجام شد تا بتوان تیمار با بیشترین میزان مواد موثره را انتخاب نمود. دامنه شرایط بهینه استخراج ترکیبات موثره نسترن کوهی جهت درمان بیماری های التهابی (مخصوصا آرتروز) براساس مقالات انتخاب شد [۵، ۸ و ۹]. براساس مقالات، استخراج در دمای ثابت ۴۰ درجه سانتی گراد انجام شد تا ضمن استخراج مناسب ترکیبات موثره، حتی الامکان از تخریب ترکیبات موثره جلوگیری شود. برای استخراج ترکیبات موثره، پودر نسترن کوهی در بشر ریخته شد و حلال های مربوطه براساس طرح آماری به آن افزوده شدند. بشر با فویل آلومینیومی پوشانده شد تا از تبخیر احتمالی حلال اجتناب شود. بشرهای حاوی حلال و پودر نسترن در داخل بشر آب با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد، که بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفته بود، قرار گرفتند تا از نوسان دما حین استخراج جلوگیری شود. دور همزن در حدود ۵۰۰ rpm تنظیم شد تا همزدنِ مناسب و به تبع آن، استخراج مطلوب صورت پذیرد.

پس از اتمام فرآیند استخراج، محلول استخراج به فالکون منتقل شد تا به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰ g سانتریفیوژ شود و ذرات نامحلول جدا شوند. عصاره استخراجی حاصل، از نظر شاخص های میزان ترکیبات فنولی کل، فلاونوئید کل و کاروتنوئید کل تعیین مقدار شد.

۲-۲-۱-استخراج و اندازه گیری میزان فنول کل

میزان فنول کل نمونه ها با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو مطابق روش Ercisli و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد [۱۰]. برای این منظور، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره نمونه های استخراج شده در ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه برای مدت یک ساعت حل شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از نمونه صاف شده به فالکون منتقل شد. ۲/۸ میلی لیتر آب دیونیزه به فالکون افزوده شد. پس از افزودن ۲ میلی لیتر کربنات سدیم ۲٪ به فالکون و گذشت زمان ۳ دقیقه، میزان ۰/۱ میلی لیتر از معرف فولین سیوکالتو ۵۰٪ نیز به آن افزوده شد و سپس به طور کامل همزدن صورت گرفت. سپس نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. درنهایت جذب نمونه ها در طول موج ۷۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر

(مدل BC47358، شرکت Biochrom، ساخت انگلستان) خوانده شد. اسید گالیک به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت و غلظت های ۰-۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر (ppm) برای رسم منحنی استاندارد تهیه شد. نتایج به صورت میلی گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک میوه بیان شد.

۲-۲-۲-تعیین میزان فلاونوئید کل

محتوی فلاونوئید کل مطابق روش چانگ و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از معرف کلرید آلومینیوم اندازه گیری شد [۱۱]. ۰/۵ میلی لیتر از عصاره استخراجی با ۱/۵ میلی لیتر از اتانول ۹۵٪ مخلوط شد و سپس ۰/۱ میلی لیتر محلول اتانولی کلرید آلومینیوم ۱۰٪ وزنی/حجمی و ۰/۱ میلی لیتر از استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. پس از همزدن کامل محلول، به مدت نیم ساعت در دمای اتاق نگه داری شد و جذب نمونه در طول موج ٤١٥ نانومتر در مقابل نمونه شاهد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل BC47358، شرکت Biochrom، ساخت انگلستان) خوانده شد. منحنی استاندارد کوئرستین (ساخت شرکت سیگما آلدریچ) در غلظت ۲۵-۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر (ppm) رسم شد. میزان فلاونوئید کل بر اساس میزان معادل "میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره" گزارش شد.

۲-۲-۳-استخراج و اندازه گیری میزان کاروتنوئید کل

برای اندازه گیری میزان کاروتنوئید کل از روش السون و همکاران (۲۰۰۵) (با اندکی تغییرات) استفاده شد [۱۲]. ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره های استخراجی به لوله شیشه ای منتقل شد و ۵ میلی لیتر حلال هگزان- اتانول (به نسبت ۹ به ۱) به آن افزوده شد. سپس نمونه ها به مدت یک ساعت در همزن (شیکر) با دور ۱۵۰ rpm قرار گرفتند. پس از سانتریفیوژ کردن نمونه ها (در دور g ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) و رقیق سازی با حلال هگزان، جذب نمونه ها در طول موج ٤٥٠ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول (۱) میزان کاروتنوئید کل محاسبه گردید:

=میزان کاروتنوئید کل (میکروگرم/ گرم ماده خشک نمونه)

$A \times V \times 106/2500 \times 100 \times g$

A: جذب نمونه، g: وزن نمونه و V: حجم نهایی نمونه می باشد.

۲-۳-آنالیز آماری

طرح آماری برپایه RSM با سه فاکتور غلظت اتانول (۲۰-۹٦ ٪ الکل)، نسبت حلال به ماده جامد (۵ به ۱ الی ۱۵ به ۱) و زمان استخراج (٦-٢٤ ساعت) در سه سطح (۱-، ۰ و ۱) جهت بهینه‌سازی و بررسی اثرات منفرد و متقابل متغیرهای فرآیند بر شاخص های میزان فنل کل (TPC)، میزان فلاونوئید کل (TFC)، میزان کاروتنوئید کل (TC) عصاره های استخراجی نسترن کوهی (به عنوان پاسخ) بکار گرفته شد. نقطه مرکزی در سه تکرار انجام شد تا خطای خالص ممکن را تخمین بزنند. آزمون‌ها به‌صورت تصادفی انجام شدند و داده‌ها با تجزیه رگرسیون چندگانه تجزیه و تحلیل شدند تا مدل آماری چندگانه رگرسیونی مرتبه دوم برای داده‌های تجربی را نشان دهد. تجزیه واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار آماری Design Expert 8 انجام شد. بعد از بهینه‌سازی، آزمون‌های تاییدی در شرایط بهینه انجام شدند و میانگین داده‌های آزمون‌ها با مقادیر پیش بینی شده مدل مقایسه شدند. نتایج این آزمون حاصل میانگین مقادیر آزمون‌ها در حداقل دو تکرار می‌باشد. آزمایش‌های مربوط به ترکیبات تری ترپنوئیدی با استفاده از طرح یک فاکتور در یک زمان انجام شد و به‌منظور مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار SPSS 21 و آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید.

۳-نتایج و بحث

همانطور که در قسمت مواد و روش‌ها ذکر گردید، استخراج ترکیبات موثره نسترن کوهی با بررسی تاثیر متغیرهای غلظت اتانول (۲۰ درصد اتانول الی ۹٦ درصد اتانول)، نسبت حلال به ماده جامد (۵ به یک الی ۱۵ به ۱ میلی لیتر بر گرم) و زمان استخراج (٦-٢٤ ساعت) بر شاخص هایی از قبیل ترکیبات فنولی کل (TPC)، ترکیبات فلاونوئیدی کل (TFC) و کاروتنوئید کل (TC) انجام شد تا بتوان تیمار با بیشترین میزان مواد موثره را انتخاب نمود. بنابراین هدف نهایی طرح، دستیابی به غنی ترین عصاره نسترن کوهی از نظر ترکیبات موثره (فلاونوئیدها، فنول ها، کاروتنوئیدها و ترپنوئیدها) جهت ارتقاء سطح سلامتی - مخصوصا افزایش مقاومت بدن در برابر سرماخوردگی، بهبود بیماری های التهابی (ازقبیل آرتروز) بود.

۳-۱- بهینه سازی استخراج ترکیبات موثره نسترن کوهی

دامنه شرایط بهینه استخراج ترکیبات موثره نسترن کوهی از قبیل ترکیبات فلاونوئیدی کل، ترکیبات فنولی کل و کاروتنوئید کل جهت درمان بیماری های التهابی (مخصوصا آرتروز) براساس مقالات انتخاب شد. بر این اساس، متغیرهای غلظت اتانول (۲۰-۹۶ درصد اتانول)، نسبت حلال به ماده جامد (۵ به ۱ الی ۱۵ به ۱ میلی لیتر بر گرم) و زمان استخراج (۶-۲۴ ساعت) مطابق جدول ۱ انتخاب شدند. همچنین براساس مقالات، استخراج در دمای ثابت ۴۰ درجه سانتی گراد انجام شد تا ضمن استخراج مناسب ترکیبات موثره، حتی الامکان از تخریب ترکیبات موثره جلوگیری شود [۵، ۸ و ۹].

Table 1 Experimental conditions from the CCD and the experimental results for Rosehip extract

Run No.	Independent Variables Dependent			Dependent Variables		
	Solvent Type (%)	Time of Extraction (h)	Liquid/Solid Ratio (mL/g)	TPC (mg/g)	TFC (mg/g)	TC (µg/g)
1	20	6	5	58.87	0.57	141.45
2	96	6	5	17.69	1.17	147.20
3	20	24	5	52.42	0.27	67.54
4	96	24	5	17.88	0.95	130.05
5	20	6	15	79.42	0.90	68.96
6	96	6	15	18.24	1.05	283.18
7	20	24	15	94.17	0.91	152.84
8	96	24	15	21.27	1.35	320.80
9	20	15	10	83.12	0.87	132.90
10	96	15	10	24.73	1.27	185.71
11	58	6	10	75.34	0.91	8.32
12	58	24	10	71.80	0.68	8.35
13	58	15	5	44.95	0.60	6.36
14	58	15	15	89.64	0.90	10.38
15	58	15	10	59.29	0.77	18.00
16	58	15	10	62.62	0.84	13.80
17	58	15	10	58.48	0.94	9.93

۳-۱-۱- بهینه سازی استخراج ترکیبات فلاونوئیدی کل (TFC)

یکی از مهمترین اثرات مثبت عصاره نسترن کوهی، به خاطر فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات آن می باشد. برخی از ترکیبات آنتی اکسیدانی شناخته شده شامل پلی فنول ها، فلاونوئیدها و بتاکاروتن می باشد [۱۳].

تاثیر شرایط استخراج بر میزان ترکیبات فلاونوئیدی کل (TFC) در جدول ۱ آورده شده است. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) چند مدل رگرسیونی برای TFC استخراجی از میوه نسترن کوهی نشان داد که مدل درجه دوم معنی دار بود و برای تبیین داده‌های آزمون انتخاب شد. ضریب تبیین (R^2) محاسبه شده برای این مدل ۰/۹۶۸ بود که بیانگر آن است که ۹۶/۸٪ تغییر در پاسخ ها توسط مدل برازش شده قابل تبیین است. به عبارت دیگر، تنها ۳/۲٪ تغییرات کل توسط مدل، قابل پیش بینی و توضیح نمی باشد. مقدار ضریب تبیین اصلاحی ($R^2_{Adj.} = 0.953$) نزدیک به ضریب تبیین بود که بیانگر این مطلب است که میزان همبستگی بین مقادیر آزمون و مقادیر پیش بینی شده بسیار زیاد است. آزمون عدم برازش[1] مدل جهت تبیین داده‌ها در نقاطی خارج از نقاط دامنه آزمون، استفاده شد [۱۴]. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود عدم برازش معنی‌دار نبود. همه‌این نتایج درنهایت حاکی از آن هستند که این مدل جهت پیش بینی TFC تحت شرایط مذکور مناسب بوده است.

با بکارگیری آنالیز رگرسیون چندگانه بر روی داده‌های آزمون، پاسخ پیش بینی شده برای TFC توسط معادله زیر به‌دست آمد:

$$TFC = 0.85 + 0.22\ X_1 - 0.014\ X_2 + 0.11\ X_3 + 0.0077\ X_1X_2 - 0.034\ X_1X_3 + 0.099\ X_2X_3 + 0.18\ X_1^2 - 0.058\ X_2^2 - 0.064\ X_3^2$$

1. lack-of-fit

X_1، X_2 و X_3 متغیرهای آزمون می‌باشند که به‌ترتیب بیانگر غلظت حلال (٪ اتانول)، زمان استخراج (ساعت) و نسبت حلال به ماده جامد (میلی لیتر بر گرم) می‌باشند.

معنی‌داری هر متغیر با استفاده از مقدار P تعیین شد. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود، اثر خطی متغیرهای X_1 و X_3 و مربعات آن ها و همچنین اثر متقابل X_1X_3 و X_2X_3 به‌طور معنی‌داری TFC را تحت تاثیر قرار دادند ($p \leq$ ۰/۰۵). از میان تمام پارامترهای مطالعه شده در این آزمون، غلظت حلال مهمترین نقش را در استخراج TFC از میوه نسترن کوهی بازی کرد؛ اگرچه نسبت حلال به ماده جامد کمترین نقش معنی‌دار را در فرایند استخراج دارا بود. زمان استخراج تاثیر معنی داری بر TFC نداشت. اثر متقابل غلظت حلال و نسبت حلال به ماده جامد و همچنین اثر متقابل زمان استخراج و نسبت حلال به ماده جامد نیز معنی‌دار بود.

Table 2 Analysis of variance and significance of regression coefficient for TFC

Source	*Coefficient estimate*	*Sum of Squares*	*DF*	*Mean Square*	*P-Value*
Model	**0.58**	**1.06**	**9**	**0.12**	**0.0002**
X1	**-7.46**	**0.51**	**1**	**0.51**	**< .0001**
X2	-3.25	0.021	1	0.021	0.0857
X3	**0.049**	**0.24**	**1**	**0.24**	**0.0002**
$X1^2$	**1.27**	**0.12**	**1**	**0.12**	**0.0018**
$X2^2$	-7.19	0.01	1	0.01	0.2023
$X3^3$	**-2.54**	**0.031**	**1**	**0.031**	**0.0435**
X1X2	-2.248	0.017	1	0.017	0.1087
X1X3	**-1.80**	**0.058**	**1**	**0.058**	**0.0123**
X2X3	**2.19**	**0.085**	**1**	**0.085**	**0.0048**
Residual		0.036	7	5.15E-03	
Pure Error Total		0.015	2	7.683E-003	
Lack of Fit DF=16		0.021	5	4.14E-03	0.750

R^2= 0.968

$R^2_{Adj.}$ = 0.936

*The bold terms are significant (p<0.05).

*X1, X2, X3 are the coded symbols of the test variables which show the Solvent type (ethanol %), Time of Extraction (min), and L/S (ml/g), respectively.

شکل ۱ با به تصویر کشیدن میزان TFC استخراجی به عنوان تابعی از دو متغیر و ثابت نگه‌داشتن متغیر دیگر در سطح مرکزی، اثرات منفرد و متقابل متغیرهای مستقل بر پاسخ را نشان می دهد. مطابق شکل ۱، میزان TFC عصاره استخراجی، با افزایش غلظت اتانول از ۲۰ به ۹۶ درصد به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافت. افزایش نسبت حلال به ماده جامد نیز تاثیر معنی داری بر افزایش TFC عصاره داشت.

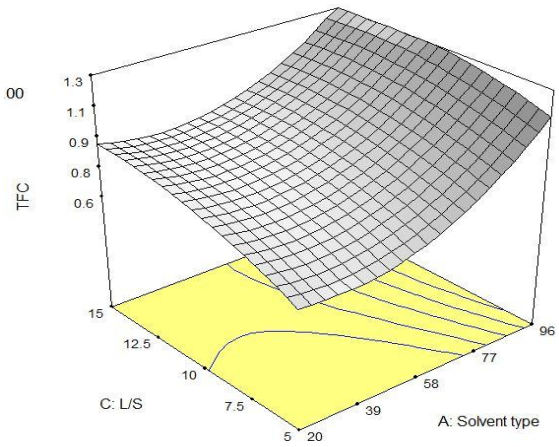

Fig 1 The interaction effect of L/S ratio and Solvent type on the TFC content of the Rosehip when maintaining the other factor constant at its central level.

۳-۱-۲- بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولی کل (TPC)

تاثیر شرایط استخراج بر میزان ترکیبات فنولی کل (TPC) در جدول ۱ آورده شده است. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) چند مدل رگرسیونی برای TPC استخراجی از میوه نسترن کوهی

نشان داد که مدل درجه دوم معنی دار بود و برای تبیین داده‌های آزمون انتخاب شد. ضریب تبیین (R^2) محاسبه شده برای این مدل ۰/۹۳۳ بود که بیانگر آن است که ۹۳/۳٪ تغییر در پاسخ ها توسط مدل برازش شده قابل تبیین است. همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود عدم برازش معنی‌دار نبود. همه‌این نتایج درنهایت حاکی از آن هستند که این مدل جهت پیش بینی TPC تحت شرایط مذکور مناسب بوده است.

Table 3 Analysis of variance and significance of regression coefficient for TPC.

Source	*Coefficient estimate*	*Sum of Squares*	*DF*	*Mean Square*	*P-Value*
Model	**15.80**	8635.41	**9**	959.49	0.0024
X1	**1.68**	5085.66	**1**	5085.66	0.0001
X2	-1.32	1.9	1	1.9	0.888
X3	**3.88**	849.66	**1**	849.66	0.0176
$X1^2$	**-0.017**	1611.77	**1**	1611.77	0.0038
$X2^2$	0.029	14.42	1	14.42	0.6992
$X3^3$	**-0.057**	5.47	**1**	5.47	0.8112
X1X2	-5.32	0.26	1	0.26	0.958
X1X3	**-0.029**	249.23	**1**	249.23	0.1381
X2X3	**0.054**	47.62	**1**	47.62	0.4882
Residual		622.71	7	88.96	
Pure Error Total		18.34	2	9.17	
Lack of Fit		604.37	5	120.87	0.072
DF=16					

R^2= 0.933

$R^2_{Adj.}$= 0.846

با بکارگیری آنالیز رگرسیون چندگانه بر روی داده‌های آزمون، پاسخ پیش بینی شده برای TPC توسط معادله زیر به‌دست آمد:

$$TPC = 66.24 - 23.00\ X_1 + 0.10\ X_2 + 8.80\ X_3 + 0.25\ X_1X_2 - 5.25\ X_1X_3 + 3.00\ X_2X_3 - 24.17\ X_1^2 + 2.33\ X_2^2 - 1.17\ X_3^2$$

X_1، X_2 و X_3 متغیرهای آزمون می‌باشند که به‌ترتیب بیانگر غلظت حلال (٪اتانول)، زمان استخراج (ساعت) و نسبت حلال به ماده جامد (میلی لیتر بر گرم) می‌باشند.

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می شود اثر خطی متغیرهای X_1 و X_3 و اثر مربع X_1 به‌طور معنی‌داری TPC را تحت تاثیر قرار دادند ($p \leq$ ۰/۰۵). از میان تمام متغیرهای مطالعه شده در این آزمون، غلظت حلال مهمترین نقش را در استخراج TPC از میوه نسترن کوهی بازی کرد به طوری که با افزایش غلظت اتانول، میزان TPC استخراجی کاهش یافت. زمان استخراج نیز تاثیر معنی داری بر TPC نداشت.

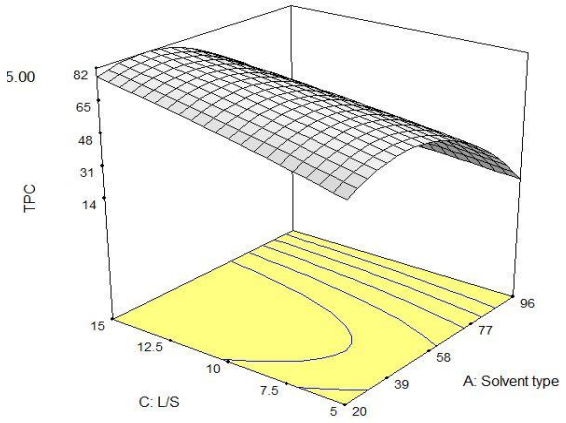

Fig 2 The interaction effect of L/S ratio and Solvent type on the TPC content of the Rosehip when maintaining the other factor constant at its central level.

شکل ۲ با به تصویر کشیدن میزان TPC استخراجی به عنوان تابعی از دو متغیر و ثابت نگه‌داشتن متغیر دیگر در سطح مرکزی، اثرات منفرد و متقابل متغیرهای مستقل بر پاسخ را نشان می دهد.

مطابق این شکل، میزان TPC عصاره استخراجی با افزایش غلظت اتانول به طور قابل ملاحظه ای کاهش یافت.
نسبت حلال به ماده جامد نیز تاثیر معنی دار مثبتی بر افزایش TPC عصاره داشت و با افزایش آن، میزان TPC عصاره استخراجی افزایش یافت.
ایلبی و همکاران (۲۰۱۲) تاثیر پارامترهای زمان استخراج (۳۰-۹۰ دقیقه)، دما (۳۰-۵۰ درجه سانتیگراد) و غلظت حلال (۴۰-۱۰۰ ٪ حجمی/حجمی اتانول) را بر استخراج ترکیبات پلی فنولی نسترن کوهی با استفاده از روش فراصوت بررسی کردند [۱۵]. نتایج آن ها حاکی از آن بود که شرایط بهینه برای استخراج بیشترین میزان ترکیبات فنولی (۴۷/۲۳ میلی گرم گالیک اسید به ازای گرم وزن خشک)، شامل دمای ۵۰ درجه سانتیگراد، زمان ۸۱/۲۳ دقیقه و غلظت اتانول ۴۰ ٪ بود. نتایج آن ها نشان داد که اتانول ۱۰۰ ٪ ضعیف ترین حلال برای استخراج ترکیبات پل فنولی بود. مخلوط آب و اتانول بهترین نتیجه را داد. آب به عنوان عامل متورم کننده گیاه عمل می کند اما اتانول پیوند بین مواد حل شونده و ماتریس گیاهی را می شکند. آن ها مشاهده کردند که با افزایش زمان استخراج تا حد مشخصی، TPC افزایش یافت. در این حالت، مطابق قانون دوم فیک، غلظت این مواد در محلول استخراج و ماتریس گیاه به تعادل می رسد و بنابراین استخراج متوقف می شود [۱۶]. نتایج این محققین مشابه نتایج پژوهش ما بود چرا که با افزایش غلظت اتانول، میزان TPC استخراجی کاهش یافت.
آنجلو و همکاران (۲۰۱۳)، شرایط استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی (پلی فنول ها، فلاونوئیدها و بتاکاروتن) دو نوع نسترن کوهی (وحشی و کشت شده) را بهینه سازی کردند [۱۳]. آن ها ذرات میوه را تا اندازه ۲ میلی متر خورد کردند و نسبت حلال به جامد ۱۰ به ۱ را انتخاب کردند. حلال آن ها شامل آب، اتانول ۹۶ ٪ و مخلوط آن ها بود. نتایج آن ها حاکی از آن بود که ترکیبات پلی فنولی نمونه کشت شده بیشتر بود، اگرچه فلاونوئیدهای نمونه وحشی بیشتر بود و بتاکاروتن دو نمونه مشابه بود. مقدار عصاره کل با افزایش دما تا دمای جوش محلول ها، افزایش یافت به نحوی که میزان عصاره حاصل در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد و دمای جوش آب به ترتیب ۱۶۳ و ۳۰۳ میلی گرم بر گرم و برای اتانول به ترتیب ۱۳ و ۴۰ میلی گرم بر گرم بود. همچنین میزان ترکیبات مد نظر در عصاره استخراجی با آب بیشتر بود و با افزایش اتانول کاهش یافت؛ زیرا ترکیبات مذکور حلالیت کمتری در اتانول داشتند. بنابراین، حلال آب را برای مراحل بعدی انتخاب کردند. میزان پلی فنول ها، فلاونوئیدها و بتاکاروتن استخراجی در دمای جوش نسبت به دمای ۲۰ درجه سانتی گراد به ترتیب ۲/۳، ۳ و ۵ برابر بود. به طور کلی، غلظت ترکیبات هدف ۳-۴ برابر بیشتر از میوه ها بود. مهمترین ترکیب زیست فعال استخراجی، پلی فنول ها بودند که ۲۲ برابر فلاونوئیدها بود. میزان فلاونوئیدها نیز ۸ برابر کاروتنوئیدها بود. فعالیت آنتی اکسیدانی همه نمونه های کشت شده بیشتر از نمونه های وحشی بود (حدود دو برابر). افزایش هر سه این ترکیبات در عصاره ها موجب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی شد.
نتایج این محققین متضاد با نتایج پژوهش ما بود چرا که نتایج ما حاکی از آن بود که با افزایش غلظت اتانول، میزان TFC استخراجی افزایش یافت اما آن ها نتیجه معکوسی را گزارش کردند.

۳-۱-۳- بهینه سازی استخراج ترکیبات کاروتنوئیدی کل (TC)

کاروتنوئیدها رنگدانه هایی هستند که به طور گسترده در گیاهان وجود دارند و در فتوسنتز و محافظت نوری گیاهی نقش دارند اگرچه در بافت های حیوانی نیز یافت می شوند و به عنوان عامل آنتی اکسیدان، ضد سرطان (عامل آنتی موتاژنیک)، عامل پیشگیری از تومور یا عامل ایمنی بدن عمل می کنند. کاربرد کاروتنوئیدها در دارو و مواد آرایشی همانند کاربرد آن ها به عنوان افزودنی های غذایی (رنگدانه و آنتی اکسیدان) ثبت شده است [۱۷].
تاثیر شرایط استخراج بر میزان ترکیبات کاروتنوئیدی کل (TC) در جدول ۴ آورده شده است. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) چند مدل رگرسیونی برای TC استخراجی از میوه نسترن کوهی نشان داد که مدل درجه دوم معنی دار بود و برای تبیین داده‌های آزمون انتخاب شد. ضریب تبیین (R^2) محاسبه شده برای این مدل ۰/۹۷۳ بود که بیانگر آن است که ۹۷/۳٪ تغییر در پاسخ ها توسط مدل برازش شده قابل تبیین است. به عبارت دیگر، تنها ۲/۷٪ تغییرات کل توسط مدل، قابل پیش بینی و توضیح نمی

باشد. مقدار ضریب تبیین اصلاحی ($R^2_{Adj.} = 0.939$) نزدیک به ضریب تبیین بود. همانطور که در جدول ٤مشاهده می‌شود عدم برازش معنی‌دار نبود. همه این نتایج درنهایت حاکی از آن هستند که این مدل جهت پیش بینی TC تحت شرایط مذکور مناسب بوده است.

Table 4 Analysis of variance and significance of regression coefficient for TC.

Source	*Coefficient estimate*	*Sum of Squares*	*DF*	*Mean Square*	*P-Value*
Model	**285.52**	1.67E+05	**9**	18537.63	0.0001
X1	**-7.28**	78068.75	**1**	78068.75	< 0.0001
X2	-10.52	9.91	1	9.91	0.9053
X3	**-20.04**	20140.06	**1**	20140.06	0.0009
$X1^2$	**0.058**	18863.22	**1**	18863.22	0.001
$X2^2$	0.258	1174.99	1	1174.99	0.2211
$X3^3$	**0.40**	270.81	**1**	270.81	0.5396
X1X2	-2.15	4.32	1	4.32	0.9374
X1X3	**0.29**	24245.91	**1**	24245.91	0.0005
X2X3	**0.28**	1250.76	**1**	1250.76	0.2083
Residual		4558.94	7	651.28	
Pure Error Total		7.76	2	3.88	
Lack of Fit DF=16		4551.18	5	910.24	0.072
		R^2= 0.973			
		$R^2_{Adj.}$= 0.939			

با بکارگیری آنالیز رگرسیون چندگانه بر روی داده‌های آزمون، پاسخ پیش بینی شده برای TC توسط معادله زیر به‌دست آمد:

$$TC = 7.71 + 86.15\ X_1 - 3.27\ X_2 + 47.08\ X_3 + 2.03\ X_1X_2 + 52.19\ X_1X_3 + 9.74\ X_2X_3 + 84.42\ X_1^2 + 21.45\ X_2^2 + 10.58\ X_3^2$$

X_1، X_2 و X_3 متغیرهای آزمون می‌باشند که به‌ترتیب بیانگر نوع حلال (٪اتانول)، زمان استخراج (ساعت) و نسبت حلال به ماده جامد (میلی لیتر بر گرم) می‌باشند.

همانطور که در جدول ٤ مشاهده می شود، اثر خطی متغیرهای X_1 و X_3 و اثر مربع X_1 و همچنین اثر متقابل X_1X_3 به‌طور معنی‌داری TC را تحت تاثیر قرار دادند ($p \leq$ ۰/۰۵). افزایش نسبت حلال به ماده جامد و غلظت اتانول تاثیر مثبت معنی داری بر استخراج TC از میوه نسترن کوهی داشتند. زمان استخراج نیز تاثیر معنی داری بر TC نداشت.

شکل ۳ با به تصویر کشیدن میزان TC استخراجی به عنوان تابعی از دو متغیر و ثابت نگه‌داشتن متغیر دیگر در سطح مرکزی، اثرات منفرد و متقابل متغیرهای مستقل بر پاسخ را نشان می دهد. مطابق شکل ۳، افزایش نسبت حلال به ماده جامد در غلظت های بالای اتانول موجب افزایش میزان TC عصاره استخراجی شد که نشان دهنده اثر متقابل غلظت حلال و نسبت حلال به ماده جامد بود.

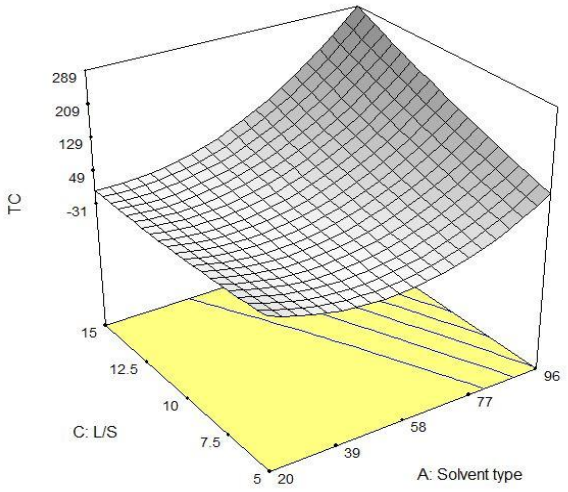

Fig 3 The interaction effect of L/S ratio and Solvent type on the TC content of the Rosehip when maintaining the other factor constant at its central level.

ماچمودا و همکاران (۲۰۰۸) مشاهده کردند که افزایش دما (در محدود ٤٠–٨٠ درجه سانتیگراد) در روش استخراج با سیال فوق

بحرانی، باعث افزایش معنی داری در میزان لیکوپن استخراجی از نسترن کوهی شد اگرچه میزان بتاکاروتن و لوتئین به آرامی افزایش یافت. افزایش دما می تواند موجب آسیب به دیواره سلولی و افزایش انحلال پذیری کاروتنوئیدها و درنتیجه افزایش بازده استخراج شود. نتایج آن ها حاکی از آن بود که بیشترین میزان کاروتنوئید کل (۲۰/۸۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک میوه نسترن فاقد دانه) در شرایط (دمای ۸۰ درجه سانتیگراد، فشار ٤٥٠ بار و سرعت جریان ٤ میلی لیتر بر دقیقه) بدست آمد. بیشترین میزان لیکوپن (١٤/٣٧ میلی گرم بر گرم میوه نسترن) در شرایط دمای ۸۰ درجه سانتیگراد، فشار ٤٥٠ بار و سرعت جریان ۳ میلی لیتر بر دقیقه و بیشترین میزان بتاکاروتن در شرایط دمای ٦٠ درجه سانتیگراد، فشار ٤٥٠ بار و سرعت جریان ۳ میلی لیتر بر دقیقه حاصل شد [۱۷].

اروگلو و همکاران (۲۰۱۸) شرایط استخراج عصاره چای مخلوط نسترن کوهی- چای ترش (به نسبت ۸۰ به ۲۰) و همچنین شرایط خشک کردن پاششی عصاره حاصل برای تولید پودر چای را بررسی کردند [۱۸]. متغیرهای آزمون شامل دما (٦٠-۹۰ درجه سانتیگراد) و زمان استخراج (۵-۳۰ دقیقه) و نسبت ماده جامد به حلال (۵-۱۵ ٪) و شاخص های مورد بررسی شامل اسید آسکوربیک و آنتوسیانین بود. جهت بهینه سازی شرایط استخراج، شاخص بریکس حذف شد و شرایط بهینه تنها براساس دو شاخص اسید آسکوربیک و آنتوسیانین بدست آمد زیرا با لحاظ شاخص بریکس، دو شاخص دیگر کاهش می یافتند. آن ها شرایط بهینه استخراج را نسبت مواد جامد به حلال ۵/۳ ٪، زمان ٥/٤ دقیقه و دمای ٦٤ درجه سانتیگراد ذکر کردند و مشاهده کردند که نتایج داده های تجربی و تئوری مشابه بود و لذا مدل تایید شد. افزایش زمان استخراج، مخصوصا در نسبت ماده جامد به حلال و دمای بالاتر موجب افزایش میزان ماده جامد محلول شد. این افزایش استخراج طی زمان می تواند به متوم شدن ذرات گیاه و انبساط منافذ مرتبط شود که انتقال جرم از طریق نفوذ (انتشار) را تسهیل می کند. با این حال، افزایش زمان استخراج بر میزان اسید آسکوربیک اثر منفی داشت و بر میزان آنتوسیانین تاثیری نداشت. افزایش دما همچنین موجب تخریب اسید آسکوربیک شد و از آنجایی که این ترکیب یکی از حساسترین ویتامین ها به حرارت است، این مساله قابل پیش بینی بوده است. افزایش دمای استخراج در زمان طولانی تر و نسبت ماده جامد به حلال بیشتر موجب افزایش مواد جامد محلول استخراجی شد. افزایش نسبت مواد جامد به حلال نیز موجب افزایش بریکس و آنتوسیانین و کاهش شدید اسید آسکوربیک شد و به عنوان تاثیرگذارترین متغیر شناخته شد. آن ها همچنین شرایط بهینه خشک کن پاششی را برای تولید پودر عصاره نسترن-چای ترش بررسی کردند و شرایط بهینه تولید پودر را دمای ورودی و خروجی به ترتیب ۱۳۰ و ۸۵ درجه سانتیگراد و ۱۸/٤ ٪ مالتودکسترین (نسبت به محلول خوراک) ذکر کردند.

آنجلو و همکاران (۲۰۱٤) تاثیر نسبت حلال به ماده جامد (۵ به ۱ الی ۲۰ به ۱ میلی لیتر بر گرم)، دمای محیط و دمای جوش حلال های آب و اتانول، زمان استخراج و غلظت اتانول (۰-۹٦ ٪) را به صورت منفرد بر درصد ماده جامد عصاره استخراجی، میزان فنول کل، فلاونوئید کل و بتاکاروتن بررسی کردند [۱۹]. همچنین میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی مذکور را در قسمت های پوست (گوشت) و دانه میوه مقایسه کردند. نتایج آن ها حاکی از آن بود که نسبت حلال به ماده جامد ۱۰ به ۱ بهترین نسبت برای استخراج بیشترین ترکیب بود زیرا در نسبت های پایین تر، بازده کاهش یافت و در نسبت های بالاتر نیز تغییری در مقدار عصاره استخراجی حاصل نشد. شاخص های مذکور در حلال آب، انحلال پذیری بیشتری نسبت به اتانول خالص داشتند و بازده حدود ۱۰ برابری را نسبت به اتانول نشان دادند. علاوه براین، بعد از ٦٠ دقیقه استخراج، بازده ترکیبات ثابت ماند. افزایش نسبت اتانول (از صفر تا ۹٦٪) موجب کاهش کارایی استخراج شد. استخراج با اتانول ۹٦ ٪ مستقل از دمای استخراج بود اگرچه با کاهش غلظت اتانول در حلال، تاثیر دما بسیا قابل ملاحظه شد. از آنجایی که انحلال پذیری ترکیبات هدف در اتانول یا مخلوط اتانول-آب کمتر از آب بود، از آب برای آزمون های بعدی استفاده شد. افزایش دمای استخراج از ۲۰ تا ۷۰ درجه سانتیگراد با استفاده از حلال آب موجب افزایش بازده هر سه ترکیب شد اما افزایش بیشتر دما تا ۱۰۰ تاثیری بر بازده آن ها نداشت. افزایش زمان استخراج در دمای ۷۰ و ۱۰۰ درجه سانتیگراد موجب کاهش پلی فنول ها شد اگرچه میزان فلاونوئیدها ثابت باقی ماند. بنابراین حرارت طولانی مدت برای استخراج مطلوب نمی باشد. آن ها غلظت ترکیبات هدف در عصاره را سه برابر

میوه ذکر کردند. همچنین پوست (گوشت) میوه نسترن کوهی، غنی ترین قسمت میوه مخصوصا از نظر ترکیبات پلی فنولی بود.

۳-۲- انتخاب شرایط بهینه استخراج ترکیبات موثره

اگرچه افزایش غلظت اتانول موجب افزایش میزان فلاونوئید کل (TFC) و میزان کاروتنوئید کل (TC) شد اما میزان فنول کل (TPC) کاهش یافت. بنابراین، برای افزایش مواد موثره، استخراج دو مرحله ای انتخاب شد تا هم بیشترین TC و TFC استخراج شود (نسبت حلال به ماده جامد ۱۴/۹۴ گرم بر لیتر، زمان ۶ ساعت و غلظت اتانول ۹۶٪) و هم بیشترین TPC (نسبت حلال به ماده جامد ۱۵گرم بر لیتر، زمان ۶ ساعت و غلظت اتانول ۳۵/۸٪). درنهایت، عصاره های حاصله ترکیب شده و پس از تغلیظ تحت شرایط خلأ و در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد، با استفاده از دو روش خشک کن انجمادی و خشک کن پاششی خشک شدند.

۳-۳-بهینه سازی استخراج ترکیبات تری ترپنوئیدی (اورسولیک اسید، بتولنیک اسید و اولئونولیک اسید)

تری ترپنوئیدهای کل موجود در سه عصاره استخراجی از تیمارهای مذکور در جدول ۱ (شامل عصاره استخراجی با استفاده از اتانول ۲۰ ٪، زمان ۶ ساعت و نسبت حلال به ماده جامد ۵ (نمونه ۱)؛ عصاره استخراجی با استفاده از اتانول ۹۶ ٪، زمان ۶ ساعت و نسبت حلال به ماده جامد ۵ (نمونه ۲)؛ عصاره استخراجی با استفاده از اتانول ۵۸ ٪، زمان ۱۵ ساعت و نسبت حلال به ماده جامد ۵ (نمونه ۱۳)) و عصاره استخراجی در شرایط بهینه (عصاره استخراجی با استفاده از اتانول ۹۶ ٪، زمان ۶ ساعت و نسبت حلال به ماده جامد ۱۴/۹۲+ عصاره استخراجی با استفاده از اتانول ۳۵/۸ ٪، زمان ۶ ساعت و نسبت حلال به ماده جامد ۱۵) با استفاده از دستگاه HPLC و رسم منحنی استاندارد (بر مبنای ارسولیک اسید) اندازه گیری شدند.

ذکر این نکته حائز اهمیت است که زمان خروج (Retention time) هر سه ترکیب تری ترپنوئیدی اولئالونیک اسید، ارسولیک اسید و بتولینیک اسید در یک زمان صورت گرفت و بنابراین پیک های آن ها روی هم می افتاد. بنابراین امکان تفکیک این سه ترکیب با این روش وجود نداشت. زیرا همانطور که در شکل ٤ مشاهده می شود، این سه ترکیب ایزومر هم بوده و تفاوت آن ها بسیار اندک است و بنابراین تفکیک آن ها از همدیگر صورت نگرفته است. براین اساس، تری ترپنوئید کل برمبنای منحنی استاندارد ارسولیک اسید اندازه گیری شد (شکل ۵).

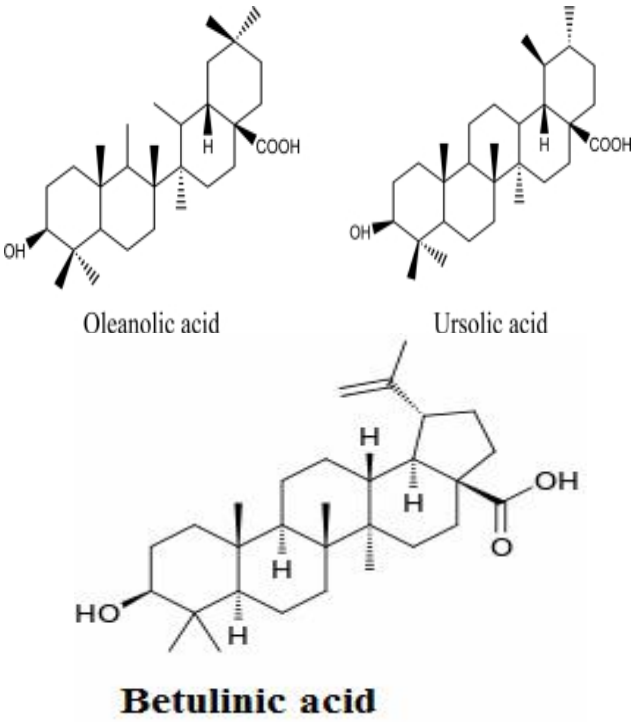

Fig 4 The structures of Olealonoc acid, Betulinic and Ursolic acid

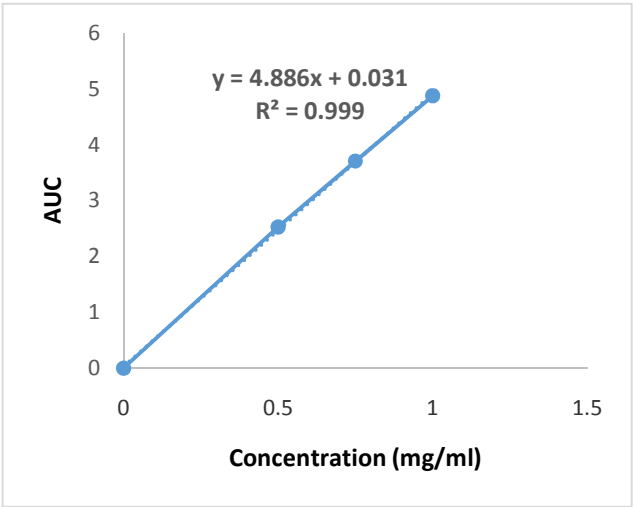

Fig 5 Standard curve of Ursolic acid

همانطور که در شکل ۷ مشاهده می شود، کمترین میزان تری ترپنوئید کل در تیمار ۱۳ و بیشترین آن در نمونه بهینه وجود داشت. نتایج این بخش حاکی از آن بود که حلال آبی (اتانول ۲۰ درصد) نسبت به حلال اتانولی (اتانول ۹۶ درصد)، تری ترپنوئید بیشتری را استخراج نمود اما حلال اتانول ۵۸ درصد کمترین راندمان استخراج این ترکیب را نتیجه داد. از آنجایی که نمونه بهینه از استخراج دو مرحله ای پودر نسترن کوهی براساس بیشینه TFC و TC و همچنین TPC بدست آمد، راندمان استخراج تری ترپنوئیدِ کلِ (۸ درصد تری ترپنوئید نسبت به وزن پودر عصاره) بیشتری را نیز نتیجه داد.

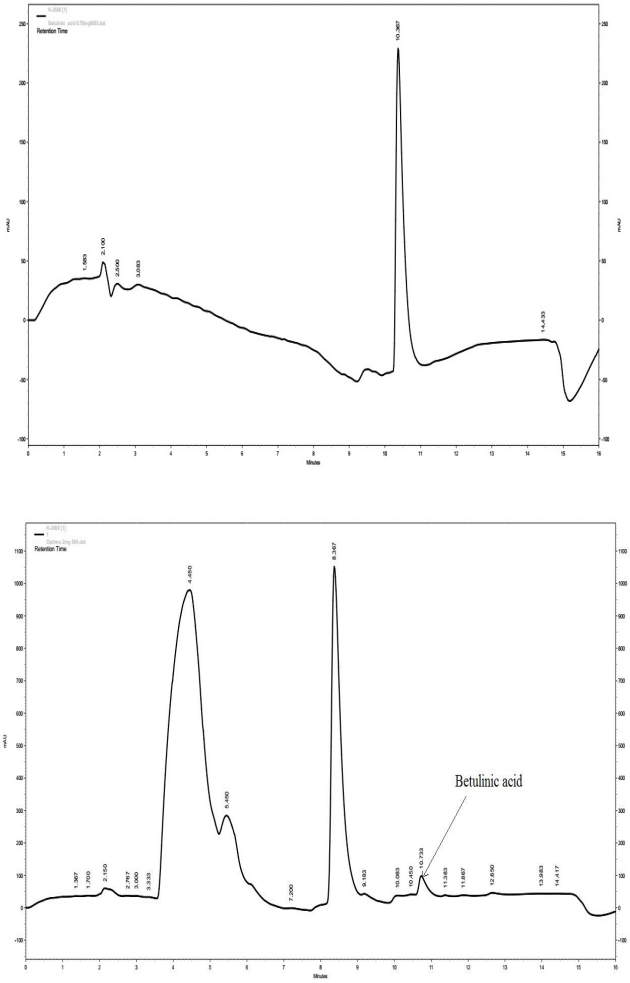

Fig 6 Chromatograms of Betulinic acid and optimum extract powder

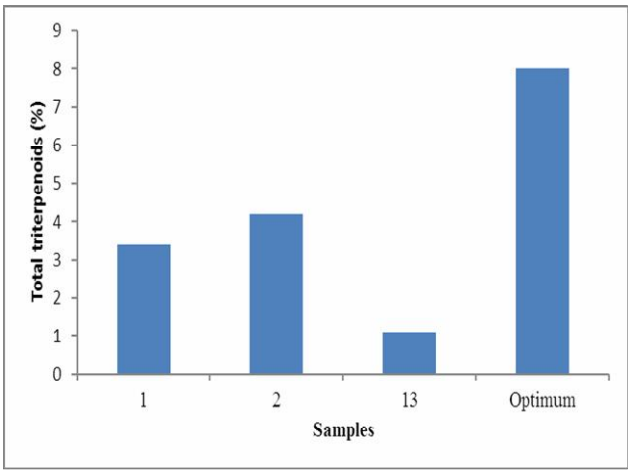

Fig 7 Total triterpenoids of the Rose hip extracts (Extraction condition of **Sample 1:** 20 %ethanol, 6 h and S/L ratio 5 ml/g; **Sample 2:** 96 %ethanol, 6 h and S/L ratio 5 ml/g; **Sample 13:** 58 %ethanol, 15 h and S/L ratio 5 ml/g; **Sample optimum:** 96 %ethanol, 6 h and S/L ratio 14.94 ml/g + 35.8 %ethanol, 6 h and S/L ratio 15 ml/g)

در ثبت اختراع (WO 2014005597 A1) که از پودر نسترن کوهی تجاری استفاده شده بود، میزان تری ترپنوئیک اسیدها در دامنه ۵۰۰-۲۰۰۰ میلی گرم به ازای کیلوگرم پودر نسترن کوهی (معادل ۰/۰۵-۰/۲ درصد تری ترپنوئیدکل نسبت به وزن پودر نسترن) گزارش شده است [۲۰] که نسبت به تری ترپنوئید کل موجود در پودر عصاره نسترن استخراجی (۸ درصد تری ترپنوئید نسبت به وزن پودر عصاره) در شرایط بهینه بسیار کمتر بود.

٤- نتیجه گیری کلی

کاهش دوز مصرفی نسترن کوهی به گونه ای که دارای ترکیبات موثر ضدالتهابی و درمانی بر روی آرتروز باشد، حائز اهمیت است. نتایج حاکی از آن بود که افزایش غلظت اتانول موجب افزایش میزان فلاونوئید کل (TFC) و میزان کاروتنوئید کل (TC) و کاهش میزان فنول کل (TPC) گردید. بنابراین، برای افزایش مواد موثره، استخراج دو مرحله ای انتخاب شد تا هم بیشترین TC و TFC استخراج شود و هم بیشترین TPC. درنهایت، عصاره های حاصله ترکیب شده و با استفاده از روش خشک کن انجمادی خشک شدند. علاوه براین، حلال آبی

(اتانول ۲۰ درصد) نسبت به حلال اتانولی (اتانول ۹۶ درصد)، تری ترپنوئید بیشتری را استخراج نمود؛ اگرچه راندمان استخراج تری ترپنوئیدِ کلِ نمونه بهینه حاصل از استخراج دو مرحله ای (۸ درصد تری ترپنوئید کل نسبت به وزن پودر عصاره) به طور معنی داری بیشتر از سایر نمونه ها بود.

۵- منابع

[1] Kazaz, S., BaydaR, H., & ERBaS, S. (2009). Variations in Chemical Compositions. *Czech Journal of Food Science, 27*(3), 178-184.

[2] Özkan, G., Sagdic, O., Baydar, N., & Baydar, H. (2004). Note: Antioxidant and antibacterial activities of Rosa damascena flower extracts. *Revista de Agaroquimica y Tecnologia de Alimentos, 10*(4): 277-281.

[3] Saeeidi, K., Sefidkon, F. and Babaie, A. R. (2013). Investigating some phytochemical and morphological properties of the Rose hip fruit in the North of Iran, *Crop Improvement in Agriculture*, 16: 545-554.

[4] Kharazmi, A., & Winther, K., Rein, E. (1998). Rose-hip formulations as anti-inflammatory natural medicine for alleviating/reducing symptoms associated with inflammation and arthritis: Google Patents.

[5] Walbroel, B., Feistel, B., Pischel,. I. (2011). Preparations with rosehip extracts, and method of producing rosehip extracts: Google Patents.

[6] Cheng, B. C. Y., Fu, X. Q., Guo, H., Li, T., Wu, Z. Z., Chan, K., & Yu, Z. L. (2016). The genus Rosa and arthritis: Overview on pharmacological perspectives. *Pharmacological research*, *114*, 219-234.

[7] Gruenwald, J., Uebelhack, R., & Moré, M. I. (2019). Rosa canina–Rose hip pharmacological ingredients and molecular mechanics counteracting osteoarthritis–A systematic review. *Phytomedicine*, *60*, 152958.

[8] Lattanzio, F., Greco, E., Carretta, D., Cervellati, R., Govoni, P., & Speroni, E. (2011). In vivo anti-inflammatory effect of Rosa canina L. extract. *Journal of ethnopharmacology*, *137*(1), 880-885.

[9] Guo, D., Xu, L., Cao, X., Guo, Y., Ye, Y., Chan, C. O., ... & Chen, S. (2011). Anti-inflammatory activities and mechanisms of action of the petroleum ether fraction of Rosa multiflora Thunb. hips. *Journal of Ethnopharmacology*, *138*(3), 717-722.

[10] Ercisli, S. (2007). Chemical composition of fruits in some rose (Rosa spp.) species. *Food Chemistry, 104*(4), 1379-1384.

[11] Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., & Chern, J.-C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis, 10*(3).

[12] Olsson, M. E., Andersson, S., Werlemark, G., Uggla, M., & Gustavsson, K. E. (2005). Carotenoids and phenolics in rose hips. *Acta Horticulturae*.

[13] Angelov, G., Georgieva, S., & Boyadzhieva, S. (2013). Experimental optimization of operational conditions for extraction of rosehip fruits. *Comptes rendus de l'Acad'emie bulgare des Sciences,* 66, 1413-1418.

[14] Wang, W., Ma, X., Xu, Y., Cao, Y., Jiang, Z., Ding, T., ... & Liu, D. (2015). Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and comparison with the conventional method. *Food chemistry*, *178*, 106-114.

[15] Ilbay, Z., Şahin, S., & Kırbaşlar, Ş. İ. (2013). Optimisation of ultrasound–assisted extraction of rosehip (Rosa canina L.) with response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 93(11), 2804-2809.

[16] Silva EM, Rogezand H and Larondelle Y, Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology, *Sep Purif Technol* **55**:381–387 (2007).

[17] Machmudah, S., Kawahito, Y., Sasaki, M., & Goto, M. (2008). Process optimization and extraction rate analysis of carotenoids extraction from rosehip fruit using supercritical CO2. *The Journal of Supercritical Fluids*, 44(3), 308-314.

[18] Eroğlu, E., Tontul, İ., & Topuz, A. (2018). Optimization of aqueous extraction and spray drying conditions for efficient processing of hibiscus blended rosehip tea powder. *Journal of food processing and preservation*, *42*(6).

[19] Angelov, G., Boyadzhieva, S. S., &

Georgieva, S. S. (2014). Rosehip extraction: Process optimization and antioxidant capacity of extracts. *Central European journal of chemistry*, *12*(4), 502-508.

[20] Brustad. I., Helland. A., Slee. E.L., Pinstrup. M.S., Hoeg. J.A. (2012). Rose hip composition, process for the manufacture of the rose hip composition and said composition for use in a method for the maintenance of flexible joints and decreased inflammation, Google Patents.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Optimization of the extraction of the functional components of Rosehip to produce food supplement

Saberian, H. [1,2*]

1. Assistant Professor of Food Additives Department, Food Science and Technology Research Institute, ACECR, Khorasan Razavi, Iran.
2. Technical Center for Agriculture, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Isfahan University of Technology Branch, Isfahan, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 04/ 06
Accepted 2022/ 09/ 04

Keywords:

Rose hip,
Extraction,
Concentration,
Triterpenoid.

DOI: 10.22034/FSCT.19.131.357
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.28.9

*Corresponding Author E-Mail:
Saberian@acecr.ac.ir

ABSTRACT

Rose hip (*Rosa canina L.*), as a valuable medicinal herbs of Iran, has beneficial effects on the human health. High dose of the rosehip should be used to be effective on the health and anti-inflammatory activity, but it is difficult especially due to its flavor and texture. Therefore, the main goal of the research was to produce rosehip concentrate to increase the bioactive components in the extract and promote the health. Therefore, the effect of ethanol concentration (20-96%), solvent/solid (S/S) ratio (5:1- 15:1 ml/g) and the extraction time (6-24 h) on the components of the extracted samples of rosehip was investigated to select the treatment with the highest bioactive components. The results indicated that increasing of the S/S ratio enhanced all of the components; although the extraction time hadn't any significant effects on the extraction yield. Increasing the ethanol concentration enhanced total flavonoid content (TFC) and total carotenoid (TC) and decreased total phenol content (TPC). Therefore, to obtain the highest TC and TFC (at optimum condition including S/S ratio 14.94 ml/g, time of 6 h and 96 % ethanol) and highest TPC (at optimum condition including S/S ratio 15 ml/g, time of 6 h and 35.8 % ethanol) , two stages extraction was selected. Finally, these two obtained extract were combined and concentrated under vaccum condition at 45 °C and then, freeze dried. The highest total triterpenoid content (8 % triterpenoid per weight of extract powder) was related to the two staged extract.