



بهینه‌سازی شرایط استخراج آبی ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی برگ و ریشه گیاه داغ قارپوزی با کاربرد

متدولوژی سطح پاسخ

عبدالواحد صفرزائی^۱، رضا اسماعیل زاده کناری^{۲*}، رضا فرهمندفر^۳

۱-دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۲*-دکتری، استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۳-دکتری، دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۱۰

کلمات کلیدی:

داغ قارپوزی،

حمام فراصوت،

عصاره،

آنتی‌اکسیدان

هدف از این مطالعه، بررسی کارایی استفاده از امواج فراصوت در استخراج ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی برگ و ریشه گیاه داغ قارپوزی در محیط آبی بود. روش آماری سطح پاسخ و طرح باکس بنکن به منظور بهینه‌سازی فاکتورهای استخراج شامل زمان در سه سطح (۱۰، ۲۵ و ۴۰ دقیقه) و شدت صوت در سه سطح (۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد) با حلال آبی مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج آزمون‌های انجام شده با روش آماری سطح پاسخ نشان داد، شدت صوت به عنوان تاثیرگذارترین فاکتور استخراج ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی از برگ و ریشه گیاه داغ قارپوزی نسبت به زمان فراصوت‌دهی می‌باشد به طوری که با افزایش زمان و شدت صوت میزان استخراج این ترکیبات افزایش یافت. اثرات معنی‌دار متغیرهای مستقل بر میزان استخراج ترکیبات فنلی کل و قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره‌های آبی برگ گیاه به ترتیب با ضرایب رگرسیونی ۰/۹۹ و ۰/۹۹ و اثرات معنی‌دار متغیرهای مستقل بر میزان استخراج ترکیبات فنلی کل و قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره‌های آبی ریشه گیاه به ترتیب با ضرایب رگرسیونی ۰/۹۸ و ۰/۹۸ حاصل گردیدند. شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی با حمام فراصوت، زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد تعیین گردید. در این شرایط بهینه، میزان ترکیبات فنلی کل برگ و ریشه به ترتیب ۲۱/۸۰ و ۱۴/۹۶ میلی گرم بر گرم و میزان IC₅₀ برگ و ریشه نیز به ترتیب ۱۱/۷۵ و ۵۲/۱۷ میکروگرم بر میلی گرم بدست آمد.

DOI: 10.22034/FSCT.20.138.26

DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.138.3.5

* مسئول مکاتبات:

r.esmaeilzade@sanru.ac.ir

۱- مقدمه

تقریباً ۷۵۰۰۰۰ گیاه گل‌دار یا دانه‌دار بر روی زمین وجود دارند که تاکنون از این تعداد حدود ۳۰۰۰۰۰ گیاه به صورت رسمی شناسایی و گزارش گردیده‌اند. سازمان بهداشت جهانی، فهرستی از ۲۰۰۰۰ گیاه دارویی مورد استفاده در سراسر جهان را جمع‌آوری کرده است. طبق نظر این سازمان حدود ۸۰ درصد از مردم آسیا و آفریقا برای حفظ سلامت خود متکی به طب سنتی و گیاهان دارویی می‌باشند. همچنین گیاهان دارویی نقش مهمی را در سیستم کنترل سلامت کشورهای پیشرفته ایفا می‌کنند [۱]. ویژگی‌های شفاف‌بخش گیاهان دارویی به وجود ترکیبات زیست فعال در آنها نسبت داده می‌شود. از جمله این ترکیبات زیست فعال می‌توان به ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی اشاره کرد که دارای محاسن و خصوصیات فیزیولوژیکی ارزشمندی نظیر ضدآلرژی، ضدالتهاب، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی می‌باشند. ترکیبات فنلی به دلیل دارا بودن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد دارای اثرات سودمند درمانی هستند [۲]. از دیرباز، عصاره گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های گوناگون مورد استفاده قرار گرفته‌اند و با وجود ترکیبات زیست فعال، نقش مهمی را در تحول سیستم پزشکی جوامع ایفا کرده‌اند [۳]. در سالیان اخیر با توجه به اثرات و عوارض ناخواسته حاصل از مصرف ترکیبات سنتزی و شیمیایی دارویی تمایل به استفاده از گیاهان دارویی چندین برابر شده است [۴]. امروزه حدود نیمی از کل داروهای داروخانه‌ها از گیاهان دارویی مشتق شده‌اند یا طراحی آنها برگرفته از گیاهان دارویی می‌باشد [۵].

به منظور انجام فرآیند استخراج ترکیبات موثره از گیاهان می‌توان از روش‌های سنتی متداول مانند سوکسله و غرقابی و یا از فناوری‌های جدید غیرحرارتی نظیر امواج فراصوت استفاده نمود. در فرآیند استخراج ترکیبات موثره از گیاهان

فاکتورهای متعددی نظیر نوع حلال مصرفی، نسبت نمونه به حلال، مدت زمان استخراج، شدت، توان و فرکانس فراصوت و دما بسیار حائز اهمیت هستند [۶]. امواج فراصوت قابلیت استخراج روغن، پروتئین، مواد موثره گیاهی، ترکیبات فعال زیستی (فلاونوئیدها، اسانس‌ها، آلکالوئیدها، پلی‌ساکاریدها، استرهای اسیدچرب، استروئیدها، چربی‌ها و ...) را دارا می‌باشند. فرکانس اولتراسوندی که برای انجام فرآوری و سونوشیمی مورد استفاده قرار می‌گیرد معمولاً محدوده فرکانس بین ۱۶ و ۳۰۰۰ کیلوهرتز را پوشش می‌دهد [۷]. دو روش متداول استفاده از امواج فراصوت شامل سامانه‌های حمام و پروب می‌شوند. حمام فراصوت به طور کارآمدی اندازه ذرات را کاهش داده و قابلیت انحلال آنها را افزایش می‌دهد. روش حمام فراصوت جهت استخراج از نمونه‌های پودری و خشک در مقیاس بزرگ و صنعتی نسبت به سامانه پروب ارجحیت دارد. حمام فراصوت می‌تواند برای طیف گسترده‌ای از نمونه‌ها استفاده شود و قابلیت تکرارپذیری بالایی دارد [۸]. در سامانه پروب فراصوت تأثیر امواج مستقیم و مداوم بر بافت‌های گیاهی بیشتر بوده و قابلیت تکرارپذیری کمی دارد. علاوه بر این احتمال آلودگی نمونه و ایجاد کف نسبت به حمام فراصوت بیشتر است [۹].

گیاه داغ قارپوزی با نام علمی *Capparis spinosa L.* گیاهی چندساله، یک پایه و بوته‌ای است که اصولاً در مناطق گرم و خشک می‌روید. این گیاه دارای مقاومت زیاد نسبت به حرارت زیاد و کمبود آب می‌باشد و از طرف دیگر به سرما نیز مقاومت قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهد [۱۰]. از جمله ویژگی‌های منحصر بفرد این گیاه توانایی تغییر ساختارهای برگ، ریشه و ساقه در شرایط خشکسالی می‌باشد به گونه‌ای که در شرایط سخت، رشد بیشتری را در ساختارهای طبیعی خود نشان می‌دهد [۱۱]. دلیل خاصیت دارویی گیاه داغ قارپوزی، غنی بودن ریشه و جوانه‌های مولد گیاه از ترکیبات فلاونوئیدی، ساپونین‌ها، گلوکوزیدها، پکتین‌ها و

گلیکوزینولات‌ها می‌باشد. از اینرو به دلیل وجود ترکیبات فعال ارزشمند متعدد موجود در این گیاه از آن به عنوان خاویار گیاهی یاد می‌شود [۱۲]. برگ گیاه داغ قارپوزی دارای مقادیر قابل توجهی از آنتی‌اکسیدان فلاونوئیدی روتین^۱ می‌باشد [۱۳].

پوست ریشه گیاه داغ قارپوزی به عنوان ماده قابض و مدر کاربرد دارویی دارد. از جمله کاربردهای دارویی دیگر این گیاه می‌توان به درمان بیماری‌های قلبی عروقی، کبد، طحال، پوست، اعصاب، نقرس، دیابت و روماتیسم اشاره کرد [۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷]. عصاره‌های آبی-اتانولی استخراجی از برگ‌ها و ریشه‌های گیاه داغ قارپوزی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد را در آزمون‌های شیمیایی و بیولوژیکی نشان داده‌اند [۱۸، ۱۹]. در مطالعه‌ای، فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی گیاه داغ قارپوزی علیه برخی از قارچ‌های پوستی مورد ارزیابی قرار گرفته است [۱۲]. از طرف دیگر، عصاره‌های استخراجی از بخش‌های هوایی گیاه داغ قارپوزی با حلال‌های هگزان و پترولئوم اثر دارای اثر مهار فعالیت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نظیر *هلیکوباکتر پیلوری*، *اشریشیاکلی* و *باسیلوس سرئوس* می‌باشند [۱۸]. بودریز^۲ و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ای به بهینه‌سازی استخراج ترکیبات پلی‌فنلی از غنچه‌های گیاه داغ قارپوزی به روش فراصوت پرداختند و میزان بهینه استخراج ترکیبات پلی‌فنلی گیاه را ۳۹/۹۶ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد، زمان ۲۴۰ دقیقه، توان ۱۰۰ وات فراصوت و غلظت ۵۰ درصد حلال اتانول گزارش کردند [۲۰]. مزارعی و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای به بهینه‌سازی استخراج آبی پلی‌ساکاریدها از برگ گیاه داغ قارپوزی به روش فراصوت پرداختند و بیشترین بازده استخراج پلی‌ساکاریدها را ۶/۷۳ درصد در شرایط بهینه ۱۱۹/۸ دقیقه، دمای ۷۲/۸۴ درجه سانتیگراد حمام فراصوت

و نسبت حجمی وزنی حلال به گیاه ۱۵/۹۷ به ۱ گزارش نمودند [۲۱]. روشن پور و همکاران (۲۰۲۱) در تحقیقی دیگر، شرایط بهینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نعنای فلفلی^۳ به کمک امواج فراصوت را در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد، زمان ۵۰ دقیقه و نسبت حلال اتانول/آب ۵۹/۶ درصد حجمی/حجمی بیان کردند [۲۲]. استخر و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ای، شرایط بهینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه متکا^۴ را در دمای ۵۲/۹ درجه سانتیگراد با استفاده از غلظت ۵۳/۵ درصد اتانول در حلال اتانول-آب به مدت ۳۴/۱ دقیقه فرآیند فراصوت گزارش نمودند [۲۳]. توکلی و همکاران (۲۰۱۹) در تحقیقی به بررسی تاثیر عصاره حاصل از جوانه معمولی و قرار گرفته تحت امواج فراصوت سه رقم مختلف گندم کشت شده در ایران بر پایداری اکسایشی روغن سویا پرداختند و به اثر امواج فراصوت در افزایش میزان استخراج ترکیبات پلی‌فنلی و توکوفرولی اشاره کردند [۲۴]. صفرزائی و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه‌ای به بهینه‌سازی شرایط استخراج الکلی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی برگ و ریشه گیاه داغ قارپوزی به روش فراصوت پرداختند و شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنلی و مهارکننده رادیکال‌های آزاد را در زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد حمام فراصوت گزارش نمودند [۲۵].

با توجه به استقبال روزافزون مردم به استفاده از ترکیبات طبیعی استخراج شده از گیاهان دارویی و نقش این ترکیبات در درمان و مقابله با بیماری‌ها، در این تحقیق، شرایط بهینه استخراج آبی ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی برگ و ریشه گیاه داغ قارپوزی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۲- مواد و روش‌ها

3 - *Mentha piperita*
4 - *Ferula persica*

1 - Routin
2 - Boudries

بدست آمده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شدند و در ادامه با انتقال مخلوط‌های صاف شده به پلیت‌ها، جداسازی حلال از عصاره توسط آون تحت خلاء در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انجام شد. نهایتاً عصاره‌های خشک شده تا انجام فرآیند آزمون در فریزر با دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

۱-۲ محلول‌ها و مواد شیمیایی

محلول‌ها و مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه گرید آنالیتیکال بودند. معرف فولین سیوکالچو، اسیدگالیک، کربنات سدیم بدون آب (Na_2CO_3) از کمپانی مرک آلمان، آب مقطر دوبار تقطیر از شرکت زلال طب ایران و پودر ۲-دی فیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) از کمپانی سیگما آلمان تهیه شده بودند.

۲-۴ آزمون‌های شیمیایی

۲-۴-۱ اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل^۱

مقدار ترکیبات فنلی کل موجود در عصاره آبی گیاه داغ قارپوزی از طریق رنگ‌سنجی به روش فولین سیوکالچو^۲ مورد بررسی قرار گرفت [۲۶]. جهت انجام آزمون فولین، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره ۱۰۰۰ پی پی ام با سمپلر به لوله آزمایش منتقل و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از معرف فولین سیوکالچو (که با آب مقطر، ۱۰ برابر رقیق شده بود) و یک میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و حل گردید. پس از گذشت ۱ دقیقه، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد در دمای اتاق به لوله اضافه و توسط شیکر لوله به طور مناسب همگن شد. محتویات لوله آزمایش به مدت ۲ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد و سپس مقدار جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Aquarius سری ۷۵۰۰ ساخت شرکت CECIL انگلستان در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت گردید. مقدار ترکیبات فنلی کل از روی معادله خط رسم شده بر مبنای اسیدگالیک و به صورت میلی‌گرم در گرم عصاره بیان گردید (معادله ۱).

$$Y = 4/0458 X + 0/0523$$

$$R^2 = 0/9923$$

۲-۲ شناسایی و آماده‌سازی بخش‌های گیاه

گیاه داغ قارپوزی در اسفندماه سال ۱۳۹۷ از مزارع شهرستان عنبرآباد واقع در استان کرمان جمع‌آوری و با کمکهرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جیرفت مورد شناسایی قرار گرفت. ریشه و برگ گیاه به ترتیب در ماه‌های اسفند و فروردین جمع‌آوری و در دمای اتاق و دور از نور خورشید به طور کامل خشک گردیدند و سپس بخش‌های مختلف گیاه با استفاده از آسیاب آزمایشگاهی پودر و از الکی با مش ۴۰ عبور داده شدند.

۲-۳ استخراج ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی

۳-۲-۱ استخراج عصاره آبی به روش فراصوت

۵۰ گرم از نمونه پودر شده گیاهی با ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال آب مقطر به نسبت ۱:۴ حجمی/وزنی مخلوط گردید و ظروف حاوی حلال و نمونه در حمام اولتراسونیک مدل JK-DUC-8200LHC ساخت کشور چین با قابلیت کنترل دما مجهز به ترموستات و سیستم سیرکوله در دمای محیط با فرکانس ثابت^۱ ۳۵ کیلوهرتز قرار داده شدند. سطوح تیماری روش فراصوت شامل سه سطح زمان (۱۰، ۲۵ و ۴۰ دقیقه) و سه سطح شدت صوت (۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد) در نظر گرفته شدند. پس از اتمام تیمار فراصوت، مخلوط‌های

1 - Total Phenolic Content (TPC)

2 - Folin ciocalteu

که در این معادله X: میزان جذب و Y: میزان ترکیبات فنلی کل بر حسب میلی گرم در گرم اسیدگالیک می باشد.

۲-۴ تعیین فعالیت آنتی رادیکالی

تعیین فعالیت آنتی رادیکالی از طریق آزمون دی پی پی اچ^۱ و به وسیله معرف ۲،۲-دی فنیل پیکریل هیدرازیل انجام گردید [۲۷]. ۵ میلی لیتر از محلول آبی دی پی پی اچ ۰/۰۴ درصد به ۵۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره تهیه شده با حلال آب مقطر اضافه گردید و پس از اختلاط در دمای اتاق، در مکان تاریک به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری و در ادامه جذب نمونه و شاهد در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. فعالیت آنتی رادیکالی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{جذب نمونه - جذب شاهد} = \text{درصد گیرندگی رادیکال آزاد دی پی پی اچ} \\ \text{جذب شاهد} \times 100$$

۲-۵ روش های آماری

جهت بررسی اثر متغیرهای مورد مطالعه (زمان و شدت صوت) بر میزان ترکیبات فنلی و قدرت رادیکال گیرندگی عصاره های آبی استخراجی از برگ و ریشه گیاه داغ قارپوزی از روش آماری سطح پاسخ و نرم افزار Design Expert نسخه ۱۲ استفاده گردید. بر اساس طرح سطح پاسخ، مدل Box-Behnken برای بررسی دو متغیر در سه سطح انتخاب شد و ۱۳ آزمون جهت بررسی روند میزان استخراج و تعیین شرایط بهینه طراحی گردید (جدول ۱). مقایسات میانگین بین عصاره آبی ریشه و برگ بوسیله آزمون یو من-ویتنی^۲ در طرح کاملاً تصادفی و در سطح ۵ درصد α به وسیله نرم افزار SAS.9.1 انجام شد.

¹ - 2,2'-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH)

² - Mann-Whitney U test

Table 1. Treatments designed in response surface test and response values for antioxidant tests of aqueous extracts of plant leaf and root

IC ₅₀ of Root Aqueous Extracts (µg/mg)	TPC of Root Aqueous Extracts (mg/g)	IC ₅₀ of Leaf Aqueous Extracts (µg/mg)	TPC of Leaf Aqueous Extracts (mg/g)	Sound Intensity (X ₂) (%)	Exreaction Time (X ₁) (min)	Treatment
88.88	4.52	32.74	10.10	49	14	1
90.09	4.36	33.33	9.32	40	25	2
83.75	5.12	27.20	12.44	49	36	3
80.00	6.44	25.72	12.58	70	10	4
71.02	9.28	19.10	16.24	70	25	5
69.93	9.36	21.30	15.22	70	25	6
70.32	9.33	20.82	15.29	70	25	7
72.62	10.42	20.93	15.28	70	25	8
69.25	9.38	21.17	15.25	70	25	9
62.11	11.22	17.15	17.36	70	40	10
60.02	12.16	15.65	18.27	91	14	11
51.44	15.41	11.25	23.32	100	25	12
53.71	14.52	12.00	21.18	91	36	13

۳- نتایج و بحث

۳-۱ انتخاب بهترین مدل

با توجه به اینکه در انتخاب یک مدل مناسب، R^2 (ضریب تبیین) بایستی بیشتر از ۰/۸۰ و آزمون عدم برازش غیر معنی‌دار باشد نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری بوسیله روش سطح پاسخ از بخش مدل نشان داد که مدل Quadratic یا درجه دوم برای آزمون معادله اندازه‌گیری شده در این مطالعه، دارای اختلاف معنی‌دار با سایر مدل‌ها است و این مدل جهت آنالیز آماری آزمون‌ها انتخاب گردید. پس از انتخاب بهترین مدل، جهت تعیین معادله کلی با توجه به جدول ANOVA پارامتری که آزمون F برای آن معنی‌دار نباشد (۵ درصد $P >$) از مدل حذف شد و سایر پارامترها که دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد بودند در مدل

نگهداری شدند. سپس معادله کلی با استفاده از ضرایب داده شده برای هر پارامتر حاصل گردید. معادله ۲، مدل تعریف شده برای هر پاسخ می‌باشد. در این فرمول Y پاسخ پیش بینی‌شده، b_0 ضریب ثابت، b_i اثرات خطی، b_{ii} اثر مربعات و b_{ij} اثرات متقابل و نیز x_i و x_j متغیرهای مستقل کدبندی شده هستند.

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j$$

۳-۲ اثر زمان و شدت فراصوت بر استخراج ترکیبات فنلی برگ و ریشه

با توجه به شکل ۱ که اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت فراصوت را بر مقدار ترکیبات فنلی کل برگ و ریشه گیاه داغ قارپوزی نشان می‌دهد، مشاهده گردید که با افزایش زمان و شدت فراصوت مقدار استخراج ترکیبات فنلی کل از

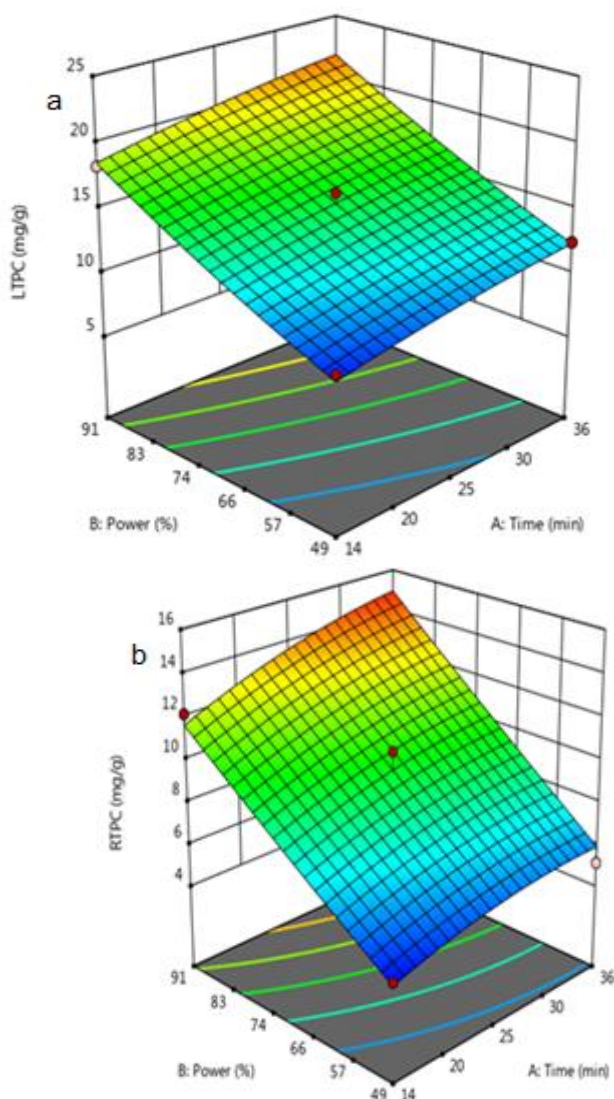


Figure 1. Three-dimensional diagram, the simultaneous effect of two extraction time and sound intensity variables on the amount of total phenolic contents of aqueous extracts of plant leaf (a) and aqueous extracts of plant root (b)

میزان میانگین ترکیبات فنلی کل عصاره‌های استخراجی از برگ و ریشه گیاه داغ قارپوزی با حلال آب مقطر به روش فراصوت به ترتیب ۱۵/۵۳ و ۹/۳۵ میلی گرم بر گرم بدست آمد. میانگین عصاره‌های آبی استخراجی از برگ و ریشه گیاه داغ قارپوزی اختلاف معنی‌داری را با یکدیگر نشان دادند (۵ درصد $P <$). ضریب تبیین (R^2) بالا بین مقادیر واقعی و پیش‌بینی‌شده در این تحقیق بیانگر همبستگی بسیار خوب بین نتایج بدست آمده از روش تجربی و مقادیر

برگ و ریشه گیاه با حلال آبی افزایش یافت. گو^۱ و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای از روش فراصوت به منظور استخراج کاتکین‌ها و کافئین از چای استفاده کردند و اثر گذشت زمان در افزایش میزان استخراج را گزارش کردند [۲۸]. روشن پور و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعه‌ای دیگر با هدف بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنلی از گیاه نعنای فلفلی به کمک امواج فراصوت، اثر معنی‌داری را در افزایش میزان استخراج با گذشت زمان از ۵ دقیقه تا ۵۰ دقیقه به علت برهم‌کنش بیشتر حلال با گیاه و نفوذ آن در بافت‌های گیاهی گزارش کردند [۲۲]. مزارعی و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای به منظور بهینه‌سازی استخراج آبی پلی‌ساکاریدها از برگ گیاه داغ قارپوزی به روش فراصوت یک اثر افزایشی را در میزان استخراج با گذشت زمان از ۶۰ تا ۱۲۰ دقیقه گزارش کردند [۲۱]. استخر و همکاران (۲۰۱۹) در تحقیقی دیگر به بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه متکا به روش فراصوت پرداختند و تاثیر افزایش زمان از ۵ دقیقه به ۵۰ دقیقه را در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه مثبت گزارش کردند [۲۳]. از این رو، روند افزایشی استخراج ترکیبات فنلی از برگ و ریشه گیاه با افزایش زمان منطقی به نظر می‌رسد. از سوی دیگر، امواج فراصوت باعث شکستن فیزیکی دیواره و غشاء سلول‌های گیاهی می‌شوند در نتیجه سرعت نفوذ حلال به درون سلول‌ها افزایش یافته و جریان انتقال جرم بین بافت و انتقال ذرات از درون سلول به درون حلال آسان می‌گردد. از این رو، فرآیند استخراج در مدت زمان کوتاه‌تری صورت می‌گیرد. شدت صوت نیز به دلیل محتوای انرژی بالای امواج باعث ایجاد نیروی برشی و متلاشی‌کردن دیواره‌های سلولی و افزایش احتمال آزادسازی محتویات گیاه به محیط استخراج و بهبود انتقال جرم می‌گردد. علاوه بر این، شدت صوت باعث کاهش اندازه ذرات گردیده و سطح تماس را افزایش می‌دهد و در نتیجه انتشار حلال در بافت افزایش می‌یابد [۲۹].

پیش‌بینی‌شده‌ی میزان استخراج ترکیبات فنلی کل برگ و ریشه با روش‌های آماری هستند (جداول ۳ و ۲). با توجه به پارامترهای معنی‌دار در فرآیند استخراج ترکیبات فنلی کل از برگ و ریشه گیاه با استفاده از حلال آبی بر اساس جداول آنالیز واریانس (جداول ۳ و ۲) معادلات کلی را می‌توان به صورت زیر گزارش کرد:

معادله ۳: معادله کلی میزان استخراج ترکیبات فنلی کل از برگ گیاه با حلال آب مقطر

$$Y = 15.46 + 1/50 X_1 + 4/59 X_2$$

معادله ۴: معادله کلی میزان استخراج ترکیبات فنلی کل از ریشه گیاه با حلال آب مقطر

$$Y = 9.55 + 1/21 X_1 + 4/0.8 X_2$$

که Y : میزان ترکیبات فنلی کل استخراجی بر حسب میلی‌گرم بر گرم، X_1 : زمان بر حسب دقیقه و X_2 : شدت صوت بر حسب درصد می‌باشد. با توجه به معادله‌های ۳ و ۴، شدت صوت (X_2) به عنوان موثرترین فاکتور استخراج ترکیبات فنلی کل از برگ و ریشه گیاه داغ قارپوزی با استفاده از حلال آبی بدست آمد. شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنلی کل از برگ و ریشه گیاه داغ قارپوزی با حلال آب مقطر به روش فراصوت، زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد تعیین گردید. در این شرایط بهینه، میزان ترکیبات فنلی کل برگ ۲۱/۸۰ میلی‌گرم بر گرم و میزان ترکیبات فنلی کل ریشه ۱۴/۹۶ میلی‌گرم بر گرم بدست آمد که نشان دهنده بیشتر بودن محتوای ترکیبات فنلی کل استخراجی از برگ گیاه در مقایسه با ریشه می‌باشد (جداول ۴ و ۵). بویار^۱ و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای، میزان ترکیبات فنلی تام برگ‌های گیاه داغ قارپوزی منطقه ترانس هیمالیا^۲ را بین ۲۱/۴۲ تا ۲۷/۶۲ میلی‌گرم بر گرم گزارش کردند [۳۰] که با میزان بهینه مطالعه حاضر مطابقت دارد. محبوبی و محبوبی (۲۰۱۴)

میزان ترکیبات فنلی کل استخراجی از ریشه گیاه داغ قارپوزی با حلال آب مقطر به روش غرقابی را ۱۵/۴ میلی‌گرم بر گرم گزارش کردند [۱۸]. در مطالعه‌ی حاضر میزان بهینه ترکیبات فنلی کل استخراجی از ریشه گیاه داغ قارپوزی کمتر از این میزان بوده و این اختلاف می‌تواند ناشی از تفاوت در شرایط محیطی محل رویش گیاه باشد [۳۱]. در مطالعه‌ای دیگر، ارار^۳ و همکاران (۲۰۱۳) میزان ترکیبات فنلی کل استخراجی از ریشه گیاه داغ قارپوزی با حلال آب مقطر به روش غرقابی را ۱۵/۵ میلی‌گرم اکی والان اسیدگالیک بر گرم گزارش کردند [۳۲] که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر، ترکیبات فنلی کل استخراجی آبی ریشه بیشتر بوده است. مزارعی و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای به بهینه‌سازی استخراج آبی پلی‌ساکاریدها از برگ گیاه داغ قارپوزی به روش فراصوت پرداختند و بیشترین بازده استخراج پلی‌ساکاریدها را ۶/۷۳ درصد در شرایط بهینه ۱۱۹/۸ دقیقه، دمای ۷۲/۸۴ درجه سانتیگراد حمام فراصوت و نسبت حجمی وزنی حلال به گیاه ۱۵/۹۷ به ۱ گزارش کردند [۲۱] که در مطالعه حاضر دما و نسبت نمونه و حلال ثابت بوده ولیکن در اثر افزایشی زمان در میزان استخراج با یکدیگر مطابقت دارند. روشن پور و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعه‌ای شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی از گیاه نعنای فلفلی به کمک امواج فراصوت را در زمان ۵۰ دقیقه، دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و نسبت حلال اتانول/آب ۵۹/۶ درصد حجمی/حجمی گزارش کردند [۲۲]. استخر و همکاران (۲۰۱۹) نیز در مطالعه‌ای مشابه، شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی-اکسیدانی عصاره متکا به روش فراصوت را در زمان ۳۴/۱ دقیقه، دمای ۵۲/۹ درجه سانتیگراد و غلظت ۵۳/۵ درصد اتانول در حلال اتانول/آب گزارش نمودند [۲۳]. در مطالعه اخیر، متغیرهای مستقل دما، نسبت حلال و غلظت حلال

1 - Bhoyar

2 - Trans-Himalaya region

3 - Arrar

ثابت بوده لیکن در اثر گذشت زمان در افزایش تصاعدی میزان استخراج ترکیبات فنلی با یکدیگر تشابه دارند.

Table 3. ANOVA of the quadratic model of total phenolic contents of aqueous extracts of plant root

Source	Sum of Squares	df	Mean Squares	F-Value	P-Value
Model	147.44	5	29.49	65.49	<0.0001
X ₁	11.81	1	11.81	26.23	0.0014
X ₂	133.39	1	133.39	296.27	<0.0001
X ₁ X ₂	0.7744	1	0.7744	1.72	0.2311
X ₁ ²	1.29	1	1.29	2.88	0.1338
X ₂ ²	0.0643	1	0.0643	0.1428	0.7167
Residual	3.15	7	0.4502		
Lack of fit	2.21	3	0.7362	3.12	0.1501
Pure error	0.9431	4	0.2358		
R ²	0.9791				
Adj. R ²	0.9641				
Pred. R ²	0.8859				

Table 2. ANOVA of the quadratic model of total phenolic contents of aqueous extracts of plant leaf

Source	Sum of Squares	df	Mean Squares	F-Value	P-Value
Model	188.42	5	37.68	123.09	<0.0001
X ₁	18.03	1	18.03	58.89	0.0001
X ₂	168.44	1	168.44	550.19	<0.0001
X ₁ X ₂	0.0812	1	0.0812	0.2653	0.6224
X ₁ ²	0.5449	1	0.5449	1.78	0.2239
X ₂ ²	1.09	1	1.09	3.55	0.1016
Residual	2.14	7	0.3062		
Lack of fit	1.37	3	0.4753	2.37	0.2114
Pure error	0.7713	4	0.1928		
R ²	0.9888				
Adj. R ²	0.9807				
Pred. R ²	0.9425				

Table 4. Results of the optimization process for antioxidant tests of aqueous extracts of plant leaf

Desirability	IC ₅₀ (µg/mg)	TPC (mg/g)	Time (min)	Sound Intensity (%)	Optimal Points
0.957	11.75	21.80	36	91	1
0.947	12.13	21.45	36	90	2
0.947	12.00	21.60	34	91	3
0.921	12.59	21.16	30	91	4

Table 5. Results of the optimization process for antioxidant tests of aqueous extracts of plant root

Desirability	IC ₅₀ (µg/mg)	TPC (mg/g)	Time (min)	Sound Intensity (%)	Optimal Points
0.985	52.17	14.96	36	91	1
0.982	52.43	14.91	35	91	2
0.969	53.49	14.67	32	91	3
0.963	54.00	14.54	31	91	4

گیاه داغ قارپوزی با حلال آب مقطر به روش فراصوت به ترتیب ۲۱/۴۱ و ۷۱/۰۱ میکروگرم بر میلی گرم بدست آمد که نشان دهنده بیشتر بودن ترکیبات آنتی اکسیدانی برگ نسبت به ریشه گیاه است (۵ درصد <P). میزان IC₅₀ پیشگویی شده عصاره های استخراجی توسط مدل به طریق

۳-۳ اثر زمان و شدت فراصوت بر IC₅₀ عصاره های استخراجی از برگ و ریشه گیاه

شکل ۲ تاثیر زمان و شدت فراصوت را بر میزان IC₅₀ عصاره های برگ و ریشه گیاه داغ قارپوزی نشان می دهد. میانگین میزان IC₅₀ عصاره های استخراجی از برگ و ریشه

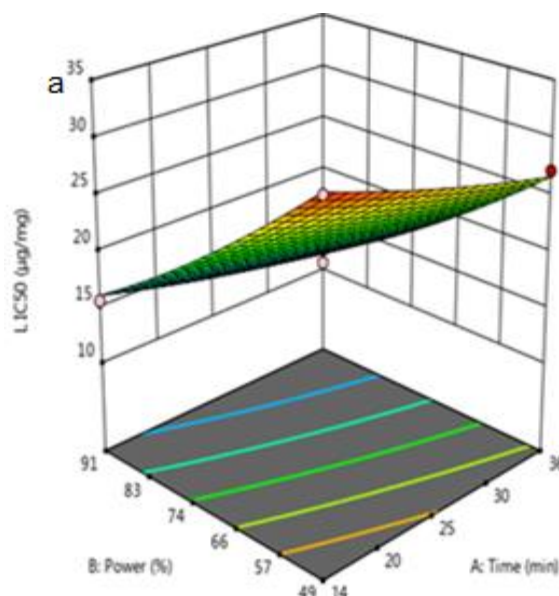


Figure 2. Three-dimensional diagram, the simultaneous effect of two extraction time and sound intensity variables on the amount of IC₅₀ of aqueous extracts of plant leaf (a) and aqueous extracts of plant root (b)

با توجه به پارامترهای معنی‌دار در فرآیند استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از برگ و ریشه بر اساس جداول آنالیز واریانس (جداول ۷ و ۶) معادلات کلی را می‌توان به صورت زیر گزارش کرد:

معادله ۵: معادله کلی تعیین میزان IC₅₀ عصاره استخراجی از برگ گیاه با حلال آب مقطر

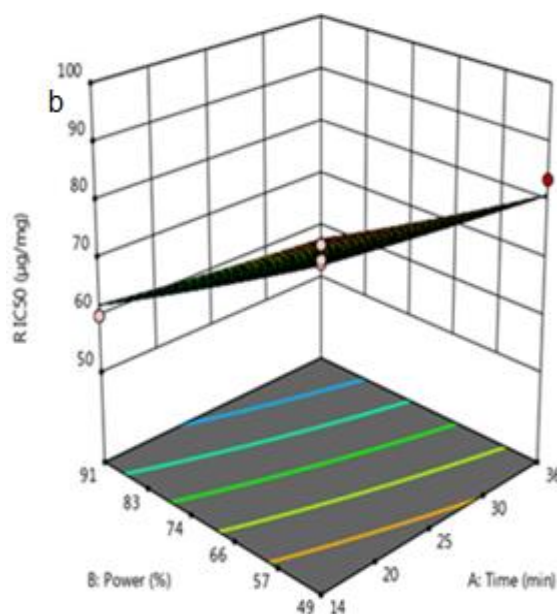
$$Y = 20.66 - 2.66 X_1 - 7.94 X_2 + 0.8217 X_2^2$$

معادله ۶: معادله کلی تعیین میزان IC₅₀ عصاره استخراجی از ریشه گیاه با حلال آب مقطر

$$Y = 70.63 - 4.59 X_1 - 14.19 X_2$$

با توجه به معادله‌های ۵ و ۶، شدت صوت (X_2) به عنوان موثرترین فاکتور استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از برگ و ریشه گیاه داغ قارپوزی بدست آمد. شرایط بهینه رادیکال گیرندگی (IC₅₀) عصاره‌های استخراجی از برگ و ریشه گیاه با حلال آب مقطر به روش فراصوت، زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد تعیین گردید. در این شرایط بهینه، میزان IC₅₀ عصاره‌های آبی برگ ۱۱/۷۵ میکروگرم بر میلی‌گرم و میزان IC₅₀ عصاره‌های آبی ریشه ۵۲/۱۷

آماري همبستگی بسیار خوبی را با نتایج بدست آمده برای برگ و ریشه به روش تجربی نشان داد (جداول ۷ و ۶). IC₅₀ بیانگر غلظتی از عصاره است که توانایی مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد دی پی پی اچ را دارد. ارزیابی مهار رادیکال‌های دی پی پی اچ که همان اندازه‌گیری توانایی ترکیبات احیاکننده نظیر فنل‌ها در انتقال اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد است، رایج‌ترین روش اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها بوده و بر پایه بی رنگ شدن محلول دی پی پی اچ توسط آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره استوار است. بنابراین هر چه عصاره دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بیشتری باشد میزان IC₅₀ کمتر خواهد بود. با توجه به شکل ۲ با افزایش زمان و شدت صوت، میزان IC₅₀ عصاره‌های آبی استخراجی از برگ و ریشه گیاه داغ قارپوزی کاهش یافت.



میکروگرم بر میلی گرم بدست آمد (جداول ۵ و ۴). در شرایط بهینه، کارایی عصاره آبی برگ گیاه داغ قارپوزی در جمع آوری رادیکال های دی پی پی اچ خیلی بیشتر از عصاره های آبی ریشه بود که با میزان ترکیبات فنلی موجود در برگ گیاه رابطه مستقیم داشت. فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتر برگ گیاه را می توان به وجود ترکیبات فلاونوئیدی شاخص از جمله روتین نسبت داد [۳۳]. علیازی کیوگلو^۱ و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه ای به بررسی ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی اکسیدانی و پروفایل مواد معدنی گیاه داغ قارپوزی استخراجی با حمام فراصوت پرداختند و میانگین غلظت بازدارنده ترکیبات گیاه را ۰/۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش کردند [۳۱] که در مقایسه با نتایج مطالعه حاضر فعالیت آنتی اکسیدانی کمتری را نشان می دهند. مزارعی و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه ای به بهینه سازی شرایط استخراج آبی پلی ساکاریدها از برگ گیاه داغ قارپوزی به روش فراصوت پرداختند و میزان فعالیت گیرندگی رادیکال های دی پی پی اچ و رادیکال های هیدروکسیل توسط پلی ساکاریدهای خام برگ گیاه داغ قارپوزی را بین ۵۰ تا ۳۰۰ میکروگرم بر لیتر گزارش کردند [۲۱] که نسبت به مطالعه حاضر فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری را نشان می دهند.

محبوبی و محبوبی (۲۰۱۴) در مطالعه ای، میزان IC_{50} عصاره های آبی استخراجی از ریشه گیاه داغ قارپوزی به روش غرقابی را بیشتر از ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش کردند و عدم توانایی عصاره های آبی ریشه گیاه در مهار رادیکال های آزاد را بیان نمودند [۱۸] که در مقایسه با مطالعه حاضر خاصیت آنتی اکسیدانی بسیار کمتری را نشان داده اند. این تفاوت می تواند ناشی از تاثیر امواج فراصوت در استخراج کارآمد ترکیبات آنتی اکسیدان بویژه ترکیبات فنلی از گیاه نسبت به روش استخراج سنتی غرقابی باشد.

تنش برشی حاصل از امواج فراصوت باعث شکسته شدن مولکول های پلیمری بزرگ و استخراج بهتر ترکیبات فنلی نسبت به روش غرقابی می شود. در مطالعه ای دیگر، ارار و همکاران (۲۰۱۳) میزان IC_{50} عصاره های آبی استخراجی از ریشه گیاه داغ قارپوزی به روش غرقابی را حدود ۱/۶ میلی گرم بر گرم گزارش کردند [۳۲] که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر، میزان IC_{50} عصاره های آبی ریشه بیشتر بوده و عصاره های استخراجی دارای ترکیبات آنتی اکسیدان کمتری هستند. این تفاوت در میزان IC_{50} می تواند ناشی از تفاوت در روش استخراج عصاره ها و اثر استخراج کارآمد فراصوت در زمان کوتاه نسبت به روش غرقابی باشد.

در مطالعه حاضر ارتباط مستقیمی بین تغییرات ترکیبات فنلی کل و فعالیت آنتی رادیکالی عصاره های آبی استخراجی از برگ و ریشه گیاه داغ قارپوزی به کمک امواج فراصوت وجود داشت. به طوری که با افزایش فاکتورهای زمان و شدت امواج فراصوت میزان استخراج ترکیبات فنلی و مهارکننده رادیکال های آزاد (فعالیت آنتی اکسیدانی) از گیاه به طور تصاعدی افزایش یافت. کاربرد امواج فراصوت با شدت بالا در گذر زمان باعث افزایش راندمان استخراج ترکیبات زیست فعال از جمله ترکیبات فنلی از گیاهان می گردد. ترکیبات فنلی به دلیل دارا بودن هسته های آروماتیک و یک یا چند گروه هیدروکسیل در ساختار خود دارای ماهیت ردوکس و احیا کننده بوده و می توانند به عنوان عوامل کاهنده (دهنده های پروتون) در پاکسازی رادیکال های اکسیژن یگانه دخالت نموده و از این طریق اثر آنتی رادیکالی خود را ایفا کنند [۳۴]. از اینرو، در تحقیقات متعدد، عصاره های حاوی ترکیبات فنلی بیشتر اثر آنتی رادیکالی قوی تری را از خود نشان داده اند. صفرزائی و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه ای به بهینه سازی شرایط استخراج الکلی ترکیبات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی برگ و ریشه گیاه کبر به روش فراصوت پرداختند. آنها اثر افزایشی زمان (از ۱۰-۴۰ دقیقه) و شدت امواج فراصوت

Pure error	6.60	4	1.65
R ²	0.9814		
Adj. R ²	0.9681		
Pred. R ²	0.8879		

۴- نتیجه گیری

استفاده از فناوری غیرحرارتی فراصوت در استخراج ترکیبات گیاهی بسیار کارآمد بوده و زمان استخراج ترکیبات موثره از گیاهان را نسبت به روش‌های استخراج سنتی کاهش می‌دهد. نتایج این تحقیق بیانگر آن بود که با افزایش فاکتورهای زمان و شدت صوت، استخراج ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی از برگ و ریشه گیاه افزایش می‌یابد و اثر مستقیمی بین میزان ترکیبات فنلی و فعالیت رادیکال گیرندگی عصاره‌های آبی وجود دارد. عصاره‌های آبی برگ به دلیل وجود ترکیبات فنلی بیشتر از جمله روتین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به عصاره‌های آبی ریشه بوده‌اند. در این مطالعه، شدت صوت به عنوان موثرترین فاکتور استخراج ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی از برگ و ریشه گیاه داغ قارپوزی شناخته شد و شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی از برگ و ریشه، زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد حمام فراصوت بدست آمد.

(از ۴۰-۱۰۰ درصد) در استخراج ترکیبات فنلی و آنتی رادیکالی از گیاه را مثبت گزارش نموده و ارتباط مستقیمی را بین تغییرات ترکیبات فنلی کل و فعالیت آنتی‌رادیکالی عصاره‌های استخراجی گزارش کردند [۲۵]. ون^۱ و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای گزارش کردند که همبستگی مطلوبی بین میزان ترکیبات فنلی کل و قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد عصاره‌های هیدروالکلی استخراجی از برگ گیاه *Gynura divaricate* وجود دارد [۳۵]. مونیز-مارکوئز^۲ و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای دیگر استفاده از امواج فراصوت را باعث افزایش استخراج ترکیبات فنلی کل از گیاه برگ بو و به تبع آن افزایش قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH گزارش کردند [۳۶].

Table 6. ANOVA of the quadratic model of IC₅₀ of aqueous extracts of plant leaf

Source	Sum of Squares	df	Mean Squares	F-Value	P-Value
Model	567.22	5	113.44	179.72	<0.0001
X ₁	56.76	1	56.76	89.82	<0.0001
X ₂	504.28	1	504.28	789.87	<0.0001
X ₁ X ₂	0.8930	1	0.8930	1.41	0.2731
X ₁ ²	1.08	1	1.08	1.71	0.2319
X ₂ ²	4.70	1	4.70	7.44	0.0294
Residual	4.42	7	0.6312		
Lack of fit	1.22	3	0.4057	0.5068	0.6984
Pure error	3.20	4	0.8004		
R ²	0.9923				
Adj. R ²	0.9867				
Pred. R ²	0.9761				

Table 7. ANOVA of the quadratic model of IC₅₀ of aqueous extracts of plant root

Source	Sum of Squares	df	Mean Squares	F-Value	P-Value
Model	1782.32	5	356.46	73.85	<0.0001
X ₁	168.73	1	168.73	34.96	0.0006
X ₂	1611.97	1	1611.97	333.95	<0.0001
X ₁ X ₂	0.3481	1	0.3481	0.0721	0.7960
X ₁ ²	1.02	1	1.02	0.2120	0.6592
X ₂ ²	0.3957	1	0.3957	0.0820	0.7829
Residual	33.79	7	4.83		
Lack of fit	27.19	3	9.06	5.49	0.0667

¹ - Wan

² - Muñoz-Márquez

۵- منابع

- [1] Mishra, B. B., & Tiwari, V. K. (2011). Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(10): 4769-4807.
- [2] Rodrigues, S., Pinto, G. A. S., & Fernandes, F. A. N. (2008). Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(1): 95-100.
- [3] Koehn, F. E., & Carter, G. T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(3): 206-220.
- [4] Tai, C. J., Wang, W. C., Wang, C. K., Wu, C. H., Yang, M. D., Chang, Y. J., ... & Tai, C. J. (2013). Fermented wheat germ extract induced cell death and enhanced cytotoxicity of Cisplatin and 5-Fluorouracil on human hepatocellular carcinoma cells. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013: 1-9.
- [5] Aslam, M., & Sial, A. A. (2014). Effect of hydroalcoholic extract of *Cydonia oblonga* miller (Quince) on sexual behaviour of wistar rats. *Advances in Pharmacological Sciences*, 20(3): 1-6.
- [6] Heydari Majd, M., Rajaei, A., Salar Bashi, D., Mortazavi, S. A., & Bolourian, S. (2014). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine pennyroyal (*Phlomischema parviflorum*) leaves using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 57: 195-202.
- [7] Leong, T. S. H., Manickam, S., Martin, G. J., Li, W., & Ashokkumar, M. (2018). *Ultrasonic Production of Nano-emulsions for Bioactive Delivery in Drug and Food Applications*. Springer, 46.
- [8] Wu, Y., Cui, S. W., Tang, J., & Gu, X. (2007). Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds by response surface methodology. *Food chemistry*, 105(4): 1599-1605.
- [9] Luque-Garcia, J., & De Castro, M. L. (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(1): 41-47.
- [10] Chedraoui, S., Abi-Rizk, A., El-Beyrouthy, M., Chalak, L., Ouaini, N., & Rajjou, L. (2017). *Capparis spinosa* L. in a systematic review: A xerophilous species of multi values and promising potentialities for agrosystems under the threat of global warming. *Frontiers in plant science*, 8: 1845.
- [11] Gan, L., Zhang, C., Yin, Y., Lin, Z., Huang, Y., Xiang, J., ... & Li, M. (2013). Anatomical adaptations of the xerophilous medicinal plant, *Capparis spinosa*, to drought conditions. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 54(2): 156-161.
- [12] Moufid, A., & Farid, O. M. Eddouks (2015). Pharmacological Properties of *Capparis spinosa* Linn. *Int J Diabetol Vasc Dis Res*, 3(5): 99-104.
- [13] Zhou, H., Jian, R., Kang, J., Huang, X., Li, Y., Zhuang, C., ... & Wu, T. (2010). Anti-inflammatory effects of caper (*Capparis spinosa* L.) fruit aqueous extract and the isolation of main phytochemicals. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(24): 12717-12721.
- [14] Fallah Huseini, H., Hasani-Rnjbar, S., Nayeibi, N., Heshmat, R., Sigaroodi, F. K., Ahvazi, M., ... & Kianbakht, S. (2013). *Capparis spinosa* L. (Caper) fruit extract in treatment of type 2 diabetic patients: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Medicine*, 21(5): 447-452.
- [15] Mollica, A. (2017). Anti-diabetic and anti-hyperlipidemic properties of *Capparis spinosa* L.: In vivo and in vitro evaluation of its nutraceutical potential. *Journal of functional foods*, 35: 32-42.
- [16] Yang, T., Liu, Y., Wang, C., & Wang, Z. (2008). Advances on investigation of chemical constituents, pharmacological activities and clinical applications of *Capparis spinosa*. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*, 33(21): 2453-2458.
- [17] Zeggwagh, N., Michel, J., & Eddouks, M. (2007). Cardiovascular effect of *Capparis spinosa* aqueous extract. part VI: in vitro vasorelaxant Effect. *Am J Pharmacol Toxicol*, 2(3): 135-139.
- [18] Mahboubi, M., & Mahboubi, A. (2014). Antimicrobial activity of *Capparis spinosa* as its usages in traditional medicine. *Herba Polonica*, 60(1): 39-48.
- [19] Mansour, R. B., Jilani, I. B., Bouaziz, M., Gargouri, B., Elloumi, N., Attia, H., ... & Lassoued, S. (2016). Phenolic contents and antioxidant activity of ethanolic extract of *Capparis spinosa*. *Cytotechnology*, 68(1): 135-142.
- [20] Boudries, H., Nabet, N., Chougui, N., Souagui, S., Loupassaki, S., Madani, K., & Dimitrov, K. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant phenolics from *Capparis spinosa* flower buds and LC-MS analysis. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(3): 2241-2252.
- [21] Mazarei, F., Jooyandeh, H., Noshad, M., & Hojjati, M. (2017). Polysaccharide of caper (*Capparis spinosa* L.) Leaf: Extraction optimization, antioxidant potential and antimicrobial activity.

- International journal of biological macromolecules, 95: 224-231.
- [22] Roshanpour, S., Tavakoli, J., Beigmohammadi, F., Alaei, S., & Mousavi Khaneghah, A. (2021). Extraction of phenol compound from *Mentha piperita* by ultrasonic waves based on a response surface methodology. *Food Science & Nutrition*.
- [23] Estakhr, P., Tavakoli, J., Beigmohammadi, F., & Alaei, S. (2019). Optimization of antioxidant activity of *Ferula persica* by Ultrasound waves using various ratios of ethanol-water solvent at different temperatures with Response Surface Methodology. *Food Science and Technology*, 16(91): 291-303 [In Persian].
- [24] Tavakoli, J., Khani, J., & Shahrooz, M. (2019). Investigating the effect of extracts from the germs of different wheat cultivars (usual and under the ultrasonic process) in oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 16(88): 97-107 [In Persian].
- [25] Safarzaei, A., Sarhadi, H., Dashipour, A. R. (2022). Optimization of antimicrobial and antioxidant extraction of Caper (*Capparis spinosa*) leaves and roots assisted by ultrasonic waves. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 13(4): 31-50 [In Persian].
- [26] Hayouni, E. A., 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(3): 1126-1134.
- [27] Sharififar, F., Moshafi, M., Mansouri, S., Khodashenas, M., & Khoshnoodi, M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food control*, 18(7): 800-805.
- [28] Gu, X., Cai, J., Zhang, Z., & Su, Q. (2007). Dynamic Ultrasound-Assisted Extraction of Catechins and Caffeine in Some Tea Samples. *Annali di Chimica: Journal of Analytical, Environmental and Cultural Heritage Chemistry*, 97(5-6): 321-330.
- [29] Li, J. W., Ding, S. D., & Ding, X. L. (2007). Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. *jinsixiaozao*. *Journal of food engineering*, 80(1): 176-183.
- [30] Bhoyar, M. S., Mishra, G. P., Naik, P. K., & Srivastava, R. B. (2011). Estimation of antioxidant activity and total phenolics among natural populations of Caper (*Capparis spinosa*) leaves collected from cold arid desert of Trans-Himalayas. *Australian Journal of Crop Science*, 5(7): 912-919.
- [31] Aliyazicioglu, R., Eyupoglu, O. E., Sahin, H., Yildiz, O., & Baltas, N. (2013). Phenolic components, antioxidant activity, and mineral analysis of *Capparis spinosa* L. *African Journal of Biotechnology*, 12(47): 6643-6649.
- [32] Arrar, L., Benzidane, N., Krache, I., Charef, N., Khennouf, S., & Baghiani, A. (2013). Comparison between polyphenol contents and antioxidant activities of different parts of *Capparis spinosa* L. *Pharmacognosy Communications*, 3(2): 70-74.
- [33] Moghaddasian, B., Eradatmand, A., & Alaghemand, A. (2012). Quantitative analysis of quercetin in different parts of *Capparis spinosa* by HPLC. *Annals of Biological Research*, 3(12): 5775-5778.
- [34] Saboura, A., Ahmadi, A., Zeinali, A., & Parsa, M. (2014). Comparison between the contents of phenolic and flavonoid compounds and aerial part antioxidant activity in *scutellaria pinnatifida* in two NorthIranian populations. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 13(3): 249-266 [In Persian].
- [35] Wan, C., Yu, Y., Zhou, S., Liu, W., Tian, S., & Cao, S. (2011). Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of *Gynura divaricata* leaf extracts at different temperatures. *Pharmacognosy magazine*, 7(25): 40.
- [36] Muñoz-Márquez, D. B., Martínez-Ávila, G. C., Wong-Paz, J. E., Belmares-Cerda, R., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2013). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(5): 1149-1154.



Scientific Research

Optimization of aqueous extraction conditions of phenolic and antioxidant compounds of Caper (*Capparis spinosa*) leaves and roots using response surface methodology

Abdolvahed Safarzaei¹, Reza Esmaeilzadeh Kenari^{*2}, Reza Farahmandfar³

¹Ph.D Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

^{*2}Ph.D, Full Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

³Ph.D, associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

ABSTRACT

ARTICLE INFO

The aim of this study was to evaluate the efficiency of ultrasonic waves in the aqueous extraction of phenolic and antioxidant compounds of *Capparis spinosa* leaves and roots. Response surface methodology (RSM) and Box–Behnken design were used to optimize the extraction factors, including extraction time (10, 25, 40 min) and sound intensity (40, 70, 100 %) with aqueous solvent. The results showed sound intensity was more effective factor than time. By increasing time and sound intensity, the extraction amount of these compounds increased. Significant effects of independent variables on the extraction of total phenolic compounds and DPPH radicals scavenging power of aqueous leaf extracts, with the regression coefficients of 0.99 and 0.99, respectively, were obtained. Significant effects of independent variables on the extraction of total phenolic compounds and DPPH radicals scavenging power of aqueous root extracts, with the regression coefficients of 0.98 and 0.98, respectively, were obtained. The optimum conditions for extraction of phenolic and antioxidant compounds with ultrasonic bath were as follows: extraction time 36 min and sound intensity 91 percent. Total phenolic content in these conditions was obtained 21.80 mg/g in leaf and 14.96 mg/g in root and IC₅₀ was obtained 11.75 µg/mg in leaf and 52.17 µg/mg in root.

Article History:

Received: 2021/10/26

Accepted: 2022/5/31

Keywords:

Capparis spinosa,

Ultrasonic bath,

Extract,

Antioxidant

DOI: 10.22034/FSCT.20.138.26

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.138.3.5

*Corresponding Author E-Mail:
r.esmaeilzade@sanru.ac.ir