



بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه کلخونگ (*Pistacia khinjuk*) به کمک امواج فراصوت با روش سطح پاسخ

مرضیه‌السادات حسین‌الهاشمی^۱، جواد توکلی^{۲*}، علیرضا رفعتی^{۳*}، فاطمه احمدی^۴

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی و تغذیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سروستان، ایران.

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم، فارس، ایران.

۳- گروه فارماکولوژی، شیمی دارویی و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سروستان، ایران.

۴- گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، فارس، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	در تحقیق حاضر، بهینه‌سازی فرایند استخراج ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (قدرت مهارکنندگی رادیکالهای آزاد DPPH، قدرت احیا کنندگی آهن (FRAP) و شاخص پایداری اکسایشی) میوه کلخونگ (<i>Pistacia khinjuk</i>) با استفاده از امواج فراصوت از طریق روش سطح پاسخ بررسی شد. جهت بهینه‌سازی فرایند استخراج از طرح مرکب مرکزی با سه متغیر مستقل زمان (۵، ۲۷.۵ و ۵۰ دقیقه)، دما (۲۵، ۴۵ و ۶۵ درجه سانتیگراد) و نسبت اتانول در حلال آب-اتانول (۰، ۵۰ و ۱۰۰ درصد) استفاده شد. به طور کلی نتایج آنالیز واریانس نشان داد، که پارامترهای مستقل دارای اثر معنی‌داری بر میزان استخراج ترکیبات فنلی کل، قدرت جذب رادیکالهای آزاد DPPH، قدرت احیا کنندگی آهن و شاخص پایداری اکسایشی عصاره میوه کلخونگ بودند که ضریبهای رگرسیونی آنها به ترتیب ۹۷.۶۵، ۹۸.۰۹، ۹۸.۶۲ و ۹۸.۳۸ درصد تعیین شد. در بین پارامترهای مستقل، غلظت اتانول موثرترین پارامتر بود چون دو اثر درجه ۲ و خطی در مدل‌های پیشنهادی آزمونهای مختلف مشاهده شد. همچنین اثر متقابل در مدل‌های این تحقیق مشاهده نشد. قوی‌ترین مدل نیز مربوط به آزمون استخراج ترکیبات فنلی بود؛ چون در این آزمون علاوه بر اثر خطی پارامترهای مستقل که در بین همه آزمونها مشترک بود، اثر درجه دوم نیز در پارامترهای زمان و غلظت اتانول مشاهده شد. بررسی نتایج نیز نشان داد که با در نظر گرفتن مجموع آزمونهای این تحقیق، زمان ۵۰ دقیقه، دمای ۶۵ درجه سانتی گراد و غلظت اتانول ۵۷.۷ درصد در حلال اتانول - آب به عنوان شرایط بهینه کلی تعیین شد. در نهایت مشخص شد که نتایج آزمونهای تجربی به مقادیر پیش بینی شده توسط روش سطح پاسخ نزدیک بود.
تاریخ دریافت: ۹۹/۱۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۱۴	
کلمات کلیدی: متغیر مستقل، احیا کنندگی آهن، مهارکنندگی رادیکال آزاد، آزمون رنسیمت، اعتبارسنجی.	
DOI: 10.29252/fsct.18.06.08	
* مسئول مکاتبات: javadtavakoli@jahromu.ac.ir rafati@iausarv.ac.ir	

۱- مقدمه

پسته با نام علمی *Pistacia* جز خانواده *Anacardiaceae* طبقه‌بندی می‌شود که شامل ۱۱ گونه می‌باشد. سه گونه پسته در ایران وجود دارد که شامل پسته خندان (*Pistacia vera*)، بنه (*Pistacia atlantica*) و کلخونگ (*Pistacia khinjuk*) می‌باشد [۱]. درختان کلخونگ در کنار درختان بنه، به صورت وحشی رشد می‌کند و در نواحی غربی و جنوب غرب، مرکزی و شرقی کشور، وسعتی بیش از ۷۰۰ هزار هکتار را اشغال کرده است [۲]. میوه کلخونگ دارای مغز، پوست سخت و چوبی و پوست نرم بیرونی (با رنگ سبز روشن) می‌باشد که به ترتیب تقریباً ۳۷، ۲۶ و ۳۷٪ از کل میوه را شامل می‌شوند [۳]. تحقیقات مختلفی که در مورد روغن میوه کلخونگ صورت گرفته است، بیانگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پایداری اکسایشی بالا آن در مقایسه روغنهای خوراکی رایج بود [۴، ۵]. حاتم‌نیا و همکاران در تحقیقی که به بررسی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدهای موجود در میوه کلخونگ مطالعه پرداختند، گزارش کردند که پوست سبز بیرونی کلخونگ، دارای بیشترین میزان ترکیبات فنلی (۲۵.۹ میلی گرم بر گرم) بود و بعد از آن به ترتیب پوست چوبی داخلی و مغز آن (به ترتیب ۴.۱ و ۳.۱ میلی گرم بر گرم) قرار داشتند. همچنین مقدار فلاونوئیدهای عصاره پوست سبز کلخونگ به ترتیب حدود ۴.۵ و ۸.۷ برابر بیشتر از عصاره پوست چوبی و مغز کلخونگ بود و این خود نشان دهنده فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی پوست سبز کلخونگ بود [۶]. در تحقیقی دیگر گزارش شد که عصاره متانولی میوه کلخونگ به دلیل مقدار زیاد ترکیبات فنلی، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی برتر از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بود [۷]. امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدانهای طبیعی به دلیل خصوصیات سلامتی‌بخش رو به گسترش است و تحقیقات مختلفی در زمینه استخراج این ترکیبات به روشهای سنتی (سوکسله و غرقابی) و نوین (استفاده از ماکروویو و امواج فراصوت) صورت گرفته است [۸]. مشکل روشهای سنتی طولانی بودن زمان فرایند، مصرف بالای حلال و تحت کنترل نبودن دما است که باعث تجزیه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌شود و همچنین باعث گران بودن هزینه استخراج آنها می‌شود [۹]. برای حل این مشکل امروزه تحقیقات مختلفی در مورد بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، به کمک روشهای نوین صورت گرفته است که

در نتیجه نوع حلال و مقدار مصرفی آن و دمایی که باعث بهترین شرایط فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها می‌شود، مشخص می‌گردد. در بین روشهای نوین، استفاده از امواج فراصوت بیشترین کاربرد را دارد. در صنایع غذایی، امواج فراصوت با فرکانس پایین (۱۸ تا ۱۰۰ کیلوهرتز) بیشترین استفاده را دارد [۱۰]. هاشمی و همکاران، به بررسی اثر امواج فراصوت بر بازدهی استخراج روغن پوست کلخونگ و کیفیت آن پرداختند که نتایج نشان دهنده اثر مثبت این امواج بر پارامترهای ذکر شده بود. همچنین مشخص شد که زمان استخراج روغن نیز در مقایسه با نمونه تحت امواج فراصوت قرار نگرفته، کاهش یافت [۱۱]. توکلی و همکاران، 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 [۱۲]. نتایج نشان داد که عصاره آبی-اتانولی (۵۰:۵۰) جوانه‌های گندم قرار گرفته تحت امواج فراصوت دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر از عصاره معمولی در روغن سویا بودند که دلیل آن به استخراج بیشتر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مربوط بود. رایجترین روشی که جهت بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌گردد، روش سطح پاسخ^۱ می‌باشد [۱۳، ۱۴] در این روش تجزیه و تحلیل سطح پاسخ، اثرات مابین متغیرهای مستقل را به تنهایی یا در ترکیب با سایرین تعریف می‌نماید [۱۵]. در مطالعه ای که به بررسی اثر بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه متکا به کمک امواج فراصوت با استفاده از دماها و زمانهای متفاوت و نسبتهای مختلف حلال اتانول-آب پرداختند، مشخص شد که شرایط بهینه این تحقیق زمان ۳۴.۱ دقیقه، دمای ۵۲.۹ درجه سانتیگراد و غلظت ۵۳.۵ درصد اتانول بود [۱۶]. در تحقیقی دیگر مشخص شد که بهترین شرایط فعالیت آنتی‌اکسیدانی گندم کامل و سبوس آن به ترتیب در غلظت اتانول ۵۳ درصد، دمای ۶۱ درجه سانتیگراد و زمان ۶۴ دقیقه و غلظت اتانول ۴۹ درصد، دمای ۶۴ درجه سانتیگراد و زمان ۶۰ دقیقه حاصل شد [۱۷]. در تحقیقی دیگر که به بررسی بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی دانه انگور و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن پرداخته شد، نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت اتانول ۵۰ درصد، دمای ۶۱ درجه سانتیگراد و ۳۰.۵ دقیقه قرار گرفتن تحت

استاندارد اسید گالیک رسم شده بر حسب میلی گرم گالیک اسید بر ۱۰۰ گرم عصاره گزارش شد [۲۰].

۲-۴- اندازه گیری قدرت مهار کنندگی

رادیکال آزاد DPPH

به منظور سنجش قدرت آنتی رادیکالی عصاره‌ها در جذب رادیکال‌های آزاد DPPH (۲ و ۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازین) ۵۰ از روش بیم و همکاران استفاده شد. بعد از ۳۰ دقیقه تاریک خانه گذاری در دمای اتاق آزمایشگاه جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقابل شاهد خوانده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها طبق فرمول زیر بر اساس درصد مهار گزارش شد [۲۱].

$$\%A = \left[1 - \frac{AS}{AC} \right] \times 100$$

که A درصد مهر رادیکال‌های آزاد As.DPPH جذب نمونه و AC جذب شاهد است.

۲-۵- اندازه‌گیری قدرت احیا کنندگی آهن

(FRAP)

جهت اندازه‌گیری قدرت احیا کنندگی آهن از روش رازالی و همکاران استفاده گردید. ابتدا معرف FRAP با مخلوط کردن ۳۰۰ میلی مولار سدیم استات در آب دیونیزه (PH= ۳/۶)، ۲۰ میلی مولار کلرو آهن III شش‌آبه در آب دیونیزه و ۱۰ میلی مولار معرف فریک تری پریدیدل تیرازین (TPTZ) در اسید کلرید ریک ۴۰ میلی مولار با نسبت‌های ۱:۱:۱۰ حجمی تهیه گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر عصاره (غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) با ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه و ۹۰۰ میکرولیتر معرف FRAP مخلوط شد. جذب محلول‌ها در ۵۹۳ نانومتر پس از ۳۰ دقیقه انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در مقابل شاهد خوانده شد. در نهایت داده‌ها بر حسب میلی مول آهن II ب ۱۰۰ گرم عصاره گزارش شد [۲۲].

۲-۶- خالص‌سازی روغن آفتابگردان

به منظور حذف ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از روغن آفتابگردان، ۲۰۰ گرم روغن از داخل ستون آلومینا ۶۰ که قبل از استفاده، به مدت ۳ ساعت در دمای ۲۰۰ درجه سانتیگراد فعال شده است، عبور کرد. برای عبور روغن، ستون آلومینا به ارلن بوخنر متصل به خلا وصل شد. اطراف ستون و ارلن بوخنر با ورقه

امواج فراصوت حاصل شد [۱۸]. بنابراین بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاهان مختلف و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها امری لازم و ضروری است. با توجه به موارد ذکر شده و عدم انجام مطالعه در مورد بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه درخت کلخونگ، در تحقیق حاضر به بررسی بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه کلخونگ به کمک امواج فراصوت با استفاده از نسبت‌های مختلف حلال اتانول-آب در زمانها و دماهای مختلف پرداخته شد.

۲-۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد

میوه درخت کلخونگ از جنگلهای منطقه میمند در استان فارس تهیه شد. میوه‌های کلخونگ را پس از تمیز نمودن، در دمای محیط در سایه خشک شده و سپس به وسیله آسیاب (Molinox-684-French) به صورت پودر در آمد. روغن آفتابگردان بدون آنتی‌اکسیدان نیز از کارخانه روغن نباتی نرگس شیراز تهیه گردید. پودر میوه کلخونگ تا زمان انجام آزمایشات (یک هفته) در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سایر مواد شیمیایی مورد نیاز نیز از دو کمپانی مرک و سیگما خریداری شد.

۲-۲- استخراج عصاره میوه کلخونگ

به منظور تعیین بهترین تیمار، ۵۰ گرم نمونه با ۲۵۰ میلی لیتر از حلال‌های آب و اتانول با نسبت‌های ۱۰۰:۵۰، ۵۰:۵۰ و ۱۰۰:۱۰۰:۰ مخلوط شد. سپس ارلنهای حاوی نمونه در حمام فراصوت (DT 102H, Bandelin, Germany) تحت امواج فراصوت قرار گرفتند. جهت بهینه‌یابی شرایط استخراج با فراصوت، از دمای ۲۵ تا ۶۵ درجه سانتیگراد و زمان‌های مختلف ۵ تا ۵۰ دقیقه در حمام فراصوت استفاده شد. سپس محلولها با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف و حلالها توسط آن تحت خلأ تبخیر شدند. عصاره‌های حاصل تا زمان انجام آزمایش در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شدند [۱۹].

۲-۳- اندازه‌گیری ترکیبات پلی‌فنلی کل

میزان ترکیبات فنلی کل بر اساس روش فولین - سیوکالچو توضیح داده شده توسط اسفهلان و همکاران (۲۰۰۹) اندازه‌گیری شد. میزان ترکیبات پلی‌فنلی با استفاده از منحنی

(X₂) و نسبت اتانول: آب (X₃) و متغیرهای وابسته شامل میزان ترکیبات فنلی کل، میزان جذب رادیکال های آزاد DPPH، قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP) و شاخص پایداری اکسایشی بود. دامنه متغیرهای مستقل بر اساس آزمایشات اولیه تعیین گردید. این طرح آزمایش شامل سه سطح فاکتوری کد بندی (+1، صفر، -1) بود که -1 مربوط به سطح پایین فاکتور، +1 سطح بالا و صفر سطح میانی می باشد (جدول ۱). داده های حاصل از طرح مرکب مرکزی محوری قابل چرخش با مدل چند جمله ای درجه دوم زیر متناسب بود:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i = 1\beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j = 0\sum \beta_{ij} X_i X_j$$

در این مدل Y پاسخ پیش گویی شده، β_0 ، β_i ، β_{ii} ، β_{ij} به ترتیب ثابت، ضریب رگرسیونی خطی فاکتور X_i ، ضریب رگرسیونی درجه دوم فاکتور X_i و اثر متقابل X_1 و X_2 و X_3 نیز متغیرهای مستقل هستند. مناسب بودن مدل از روی داده های Lack of fit، ضریب رگرسیونی (R²) و F-value حاصل از جدول آنالیز واریانس (ANOVA) بررسی شد. معنی داری مدل و متغیرهای آن در سطح ۰/۰۵ درصد (P < ۰/۰۵) تعیین شد.

Table 1 Independent variables and their coded and actual values used for optimization.

Independent variable	Symbol	Coded level		
		-1	0	1
Time (min)	X ₁	5	27.5	50
Temperature (C°)	X ₂	25	45	65
Concentration of ethanol (%)	X ₃	0	50	100

شد. به صورت متداول جهت بررسی صحت مدل، از ضریب رگرسیون و آزمون عدم برازش داده استفاده می شود. معنی دار بودن آزمون عدم برازش داده برای یک مدل، بیانگر این است که نقاط به خوبی اطراف مدل قرار نگرفته اند و نمی توان از مدل برای پیشگویی مقادیر متغیرهای تابع استفاده نمود، بنابراین با عدم معنی داری آزمون عدم برازش داده، می توان دریافت، مدل به خوبی می تواند بر داده های مورد بررسی برازش شود. در بین پارامترهای مختلف، پارامتری که بیشترین مجموع مربعات را داشته باشد، به عنوان اثرگذارترین پارامتر و برعکس انتخاب می شود [۲۴]. همانطور که نتایج آنالیز واریانس (جدول ۲، ۳، ۴ و ۵) نشان می دهد، مدل های پیشنهادی برای استخراج ترکیبات فنلی، قدرت جذب رادیکال های آزاد

آلومینیومی پوشانیده شد تا از اکسایش روغن جلوگیری به عمل آید. برای اطمینان از حذف ترکیبات آنتی اکسیدانی، روغن حاصل دوباره از ستون پر شده با آلومینای تازه عبور داده شد [۲۳].

۲-۷- اندازه گیری شاخص پایداری اکسایشی روغن آفتابگردان با رنسیمت

برای تعیین قدرت اکسایشی عصاره ها، از دستگاه رنسیمت (شرکت Metrohm، مدل ۷۴۳) استفاده شد به این ترتیب که ۳ گرم روغن آفتابگردان فاقد آنتی اکسیدان حاوی ۱۵۰۰ پی پی ام عصاره در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد با سرعت جریان هوا ۱۵ لیتر بر ساعت مورد آزمایش قرارگرفت. داده های به دست آمده بر مبنای شاخص پایداری اکسایشی روغن (ساعت) مقایسه شدند [۲۳].

۲-۸- طرح آماری و بهینه یابی فرآیند

طرح آزمایشی، آنالیز نتایج و تعیین شرایط بهینه استخراج با استفاده از روش سطح پاسخ و نرم افزار Minitab انجام شد. در این تحقیق از طرح مرکب مرکزی محوری قابل چرخش با سه متغیر مستقل، چهار متغیر وابسته، سه سطح و سه تکرار در نقطه مرکزی طرح (به منظور بررسی تکرار پذیری طرح) استفاده شد [۲۲]. متغیرهای مستقل شامل زمان (X₁)، دما

۳- بحث و نتیجه گیری

۳-۱- بررسی مدل های حاصل از روش سطح پاسخ

بررسی نتایج حاصل از روش سطح پاسخ و مقایسه میان مدل های رگرسیونی مختلف تحقیق حاضر، حاکی از آن بود که مدل چند جمله ای درجه دوم، برای تمامی آزمون های اندازه گیری شده در این مطالعه، دارای اختلاف معنی داری با سایر مدل ها بود. کفایت مدل ها با استفاده از F-test، عدم برازش داده (lack of fit)، ضریب رگرسیون، ضریب رگرسیون پیش بینی شده، ضریب رگرسیون تنظیم شده و P-value بررسی

زمان و غلظت اتانول) در استخراج ترکیبات فنلی، قدرت جذب رادیکال های آزاد DPPH، قدرت احیا کنندگی آهن و شاخص پایداری اکسایشی عصاره های میوه کلخونگ وجود داشت که ضریب رگرسیونی آنها به ترتیب ۰.۹۷۰۹، ۰.۹۸۰۹، ۰.۹۸۰۹ و ۰.۹۸۰۹ درصد تعیین شد.

DPPH، شاخص پایداری اکسایشی (آزمون رنسیمت) دارای کمترین سطح P-value با ضریب رگرسیون، ضریب رگرسیون پیشینی شده و ضریب رگرسیون تنظیم شده بالاتر از ۹۳٪ و عدم معنی داری عدم برازش ($P > 0.05$) بودند. به طور کلی نتایج آنالیز واریانس نشان داد، ارتباط و همبستگی مناسب و معنی داری بین پاسخها و پارامترهای مستقل (دما،

Table 2 Analysis of variance of the quadratic model adjusted for total phenolic compounds.

Squares	DF	Sum of Square	Mean Square	F-Value	P-value
Model	5	574.80	114.960	66.60	0.000
Linear	3	166.58	55.526	32.17	0.000
X ₁	1	66.88	66.880	38.74	0.000
X ₂	1	19.09	19.093	11.06	0.010
X ₃	1	65.90	65.895	38.17	0.000
Square	2	408.22	204.111	118.24	0.000
X ₁ ²	1	10.96	10.963	6.35	0.036
X ₃ ²	1	366.29	366.289	212.19	0.000
Error	8	13.81	1.726		
Total	13	588.61			
R ²		97.65%			
Adj. R ²		96.19%			
Pred. R ²		93.48%			

Table 3 Analysis of variance of the quadratic model adjusted for DPPH radical-scavenging assay.

Squares	DF	Sum of Square	Mean Square	F-Value	P-value
Model	4	1150.65	287.663	115.64	0.000
Linear	3	394.02	131.341	52.80	0.000
X ₁	1	77.07	77.074	30.98	0.000
X ₂	1	37.31	37.310	15.00	0.004
X ₃	1	257.99	257.986	103.71	0.000
Square	1	756.63	756.629	304.16	0.000
X ₃ ²	1	756.63	756.629	304.16	0.000
Error	9	22.39	2.488		
Total	13	1173.04			
R ²		98.09%			
Adj. R ²		97.24%			
Pred. R ²		95.67%			

Table 4 Analysis of variance of the quadratic model adjusted for FRAP test.

Squares	DF	Sum of Square	Mean Square	F-Value	P-value
Model	4	18.3557	4.5889	160.33	0.000
Linear	3	5.8206	1.9402	67.79	0.000
X ₁	1	1.6046	1.6046	56.06	0.000
X ₂	1	0.5639	0.5639	19.70	0.002
X ₃	1	3.2640	3.2640	114.04	0.000
Square	1	12.5351	12.5351	437.95	0.000
X ₃ ²	1	12.5351	12.5351	437.95	0.000
Error	9	0.2576	0.0286		
Total	13	18.6133			
R ²		98.62%			
Adj. R ²		98%			
Pred. R ²		96.53%			

Table 5 Analysis of variance of the quadratic model adjusted for oxidative stability index.

Squares	DF	Sum of Square	Mean Square	F-Value	P-value
Model	4	4.91294	1.22823	136.83	0.000
Linear	3	1.19865	0.39955	44.51	0.000
X ₁	1	0.34457	0.34457	38.39	0.000
X ₂	1	0.13825	0.13825	15.40	0.003
X ₃	1	0.62720	0.62720	69.87	0.000
Square	1	3.71429	3.71429	413.80	0.000
X ₃ ²	1	3.71429	3.71429	413.80	0.000
Error	9	0.08078	0.00898		
Total	13	4.99372			
R ²	98.38%				
Adj. R ²	97.66%				
Pred. R ²	96.31%				

اتانول فاقد اثر معنی‌دار بر استخراج ترکیبات فنلی گیاه متکا بود [۱۶].

در شکل ۱ منحنی سطح پاسخ (Response) و کنتور (contour) اثر متقابل متغیرهای مختلف را صورت دوتایی بر راندمان استخراج ترکیبات فنلی گونه میوه کلخونگ نشان داده شده است. همچنین شرایط بهینه این آزمون با در نظر گرفتن سه پارامتر مستقل دما، زمان و غلظت اتانول در شکل ۲ آورده شده است. همانگونه که مشخص است، شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنلی در زمان ۵۰ دقیقه، دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و غلظت ۵۶.۶ درصد اتانول مشاهده شد. زمان، تاثیر به سزایی در زمان استخراج دارد. افزایش زمان باعث برهمکنش بیشتر ماده حل شونده و حلال می‌شود که باعث نفوذ بیشتر ترکیبات موثر گیاه به داخل حلال می‌شود. افزایش دما در شرایط بهینه باعث می‌شود ترکیبات فنلی که در که در ماتریکس گیاه باند شده هستند، آزاد شوند و میزان استخراج این ترکیبات افزایش یابد [۲۵]. پینلو و همکاران بیان داشتند که افزایش زمان استخراج به طور معنی‌داری بر روی میزان استخراج ترکیبات فنلی توت و تفاله انگور موثر بود [۲۶] که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت. در مطالعات دیگر نیز بالاترین میزان استخراج ترکیبات فنلی پس از گذشت ۴۵ تا ۹۰ دقیقه اعمال امواج فراصوت بدست آمد و ادامه فرایند در زمانهای بالاتر، منجر به کاهش بازده استخراج و تجزیه و تخریب این ترکیبات گردید [۲۷]. همچنین یاکین و همکاران بیان کردند که با افزایش دما، روند صعودی استخراج ترکیبات فنلی از پوست نوعی از مرکبات مشاهده شد اما در دماهای بالاتر این روند حالت کاهش یافت. این محققان دلیل این امر را تجزیه حرارتی یا واکنشهای پلیمریزاسیون ترکیبات فنلی با خودشان بیان کردند [۲۸].

۳-۲- آنالیز سطوح پاسخ و اثر فاکتورهای مختلف بر میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی

۳-۲-۱- تعیین شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنلی

پلی‌فنلها از مهمترین ترکیبات آنتی اکسیدانی رایج در گیاهان است که اثرات سلامتی بخش آنها تایید شده است. بر اساس نتایج آنالیز واریانس بین میزان ترکیبات فنلی و پارامترهای استخراجی ارتباط درجه دوم با ضریب رگرسیون ۹۷.۶۵ درصد وجود داشت. معادله ۲، مدل پیشنهادی و متناسبی است که توسط روش سطح پاسخ تعیین شد:

$$\text{معادله ۲: } TP = 23.71 - 0.205 X_1 + 0.0640 X_2 + 0.5262 X_3 + 0.00566 X_1^2 - 0.004688 X_3^2$$

در این تحقیق X₁، X₂ و X₃ به ترتیب زمان، دما و غلظت اتانول در حلال آب-اتانول است. این مدل نشان داد که پارامترهای زمان و غلظت اتانول دارای اثرات درجه دوم و خطی بر پاسخ استخراج ترکیبات فنلی بود که از نظر آماری اثر معنی‌داری (P < ۰/۰۵) داشت. همچنین مشخص شد که پارامتر دما، تنها دارای اثر خطی بر پاسخ میزان ترکیبات فنلی به عنوان یک پارامتر وابسته بود. بنابراین تایید شد که اثرگذاری دو پارامتر زمان و غلظت اتانول بر استخراج ترکیبات فنلی عصاره های میوه کلخونگ بیشتر از پارامتر دما بود. همچنین مشخص شد در این آزمون، اثر متقابل بین پارامترهای مستقل مشاهده نشد. همیشه اثر پارامترهای مستقل بر استخراج ترکیبات فنلی معنی‌دار نبوده است. استخر و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که پارامترهای دما، زمان و غلظت

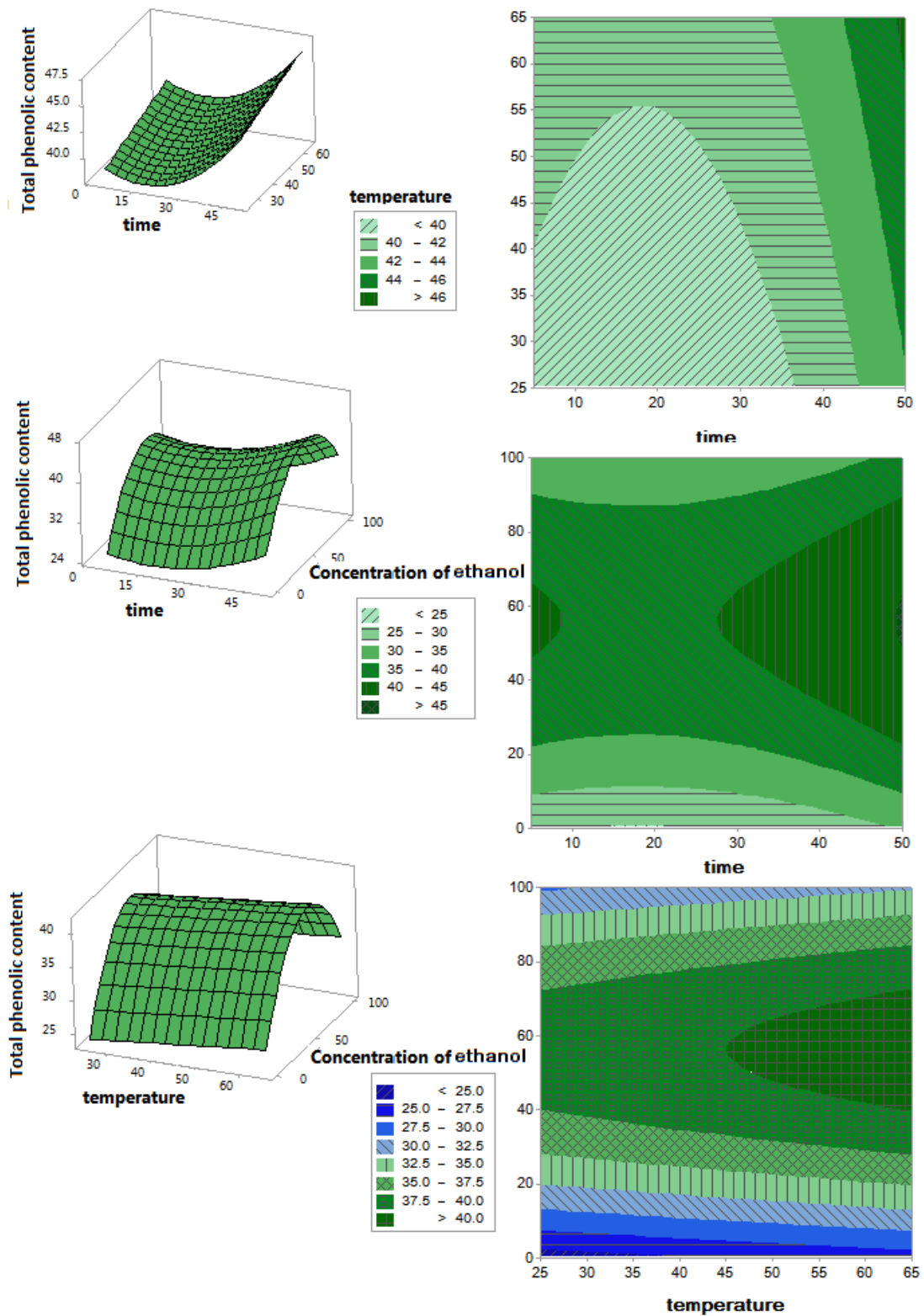


Fig 1 Response and contour plot for the effect of different parameters (Time (min), Temperature (°C) and Concentration of Ethanol (%)) on the amount of total phenolic content (mg/100gr).

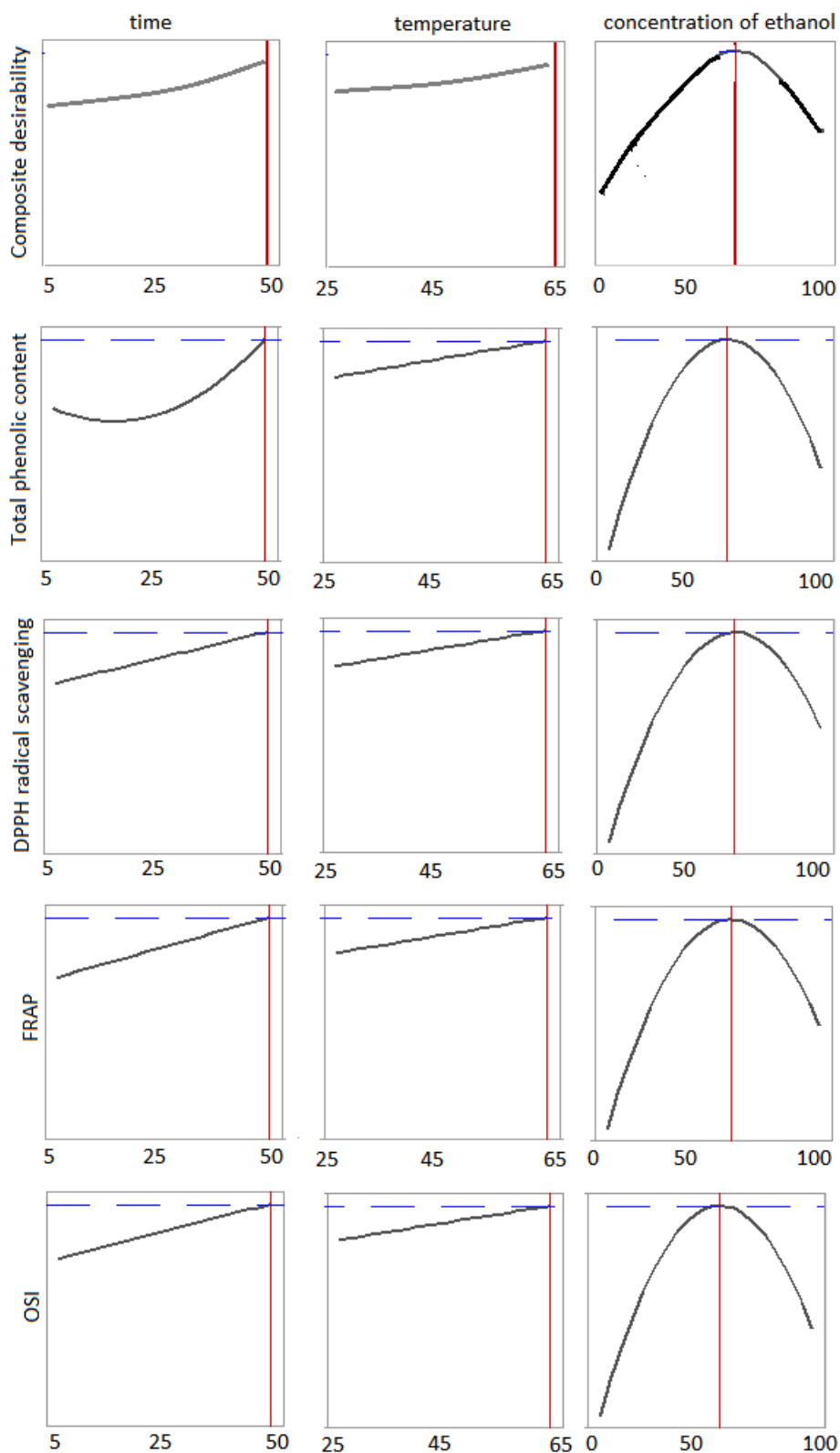


Fig 2 Optimum conditions of phenolic compounds extraction, DPPH radical-scavenging, FRAP test and Oxidative stability index (OSI) and Composite desirability of mention assay under 3 independent parameters (Time (min), Temperature (°C) and Concentration of Ethanol (%))

می‌شود و بعد از آن میزان استخراج این ترکیبات کاهش می‌یابد. نتایج حاصل از تحقیق رحیمی پناه و همکاران در

همچنین مشخص شد که افزایش غلظت اتانول در حلال اتانول-آب تا حدی باعث افزایش استخراج ترکیبات فنلی

پلی فنلی باشند، در اثر دما شکسته شده و به چندین ملکول ساده تر تبدیل می‌شوند و در نتیجه میزان کلی این ترکیبات افزایش می‌یابد. همچنین خروج این ترکیبات پلی فنلی پیچیده از بافت گیاه، به دلیل ممانعت‌های ناشی از حجم زیاد آنها نیز، به راحتی صورت نمی‌گیرد. افزایش دما در طول زمان با تغییر در بافت و یا شکستن این ترکیبات، جریان خروج آنها را تسهیل می‌کند [۳۳، ۳۴]. خروج این ترکیبات با ساختمان ساده از بافت گیاه نیز راحت تر هست. با توجه به نتایج گرفته شده در این تحقیق، احتمالاً ترکیبات فنلی میوه کلخونگ دارای ساختمان بزرگ و پیچیده می‌باشد. بررسی اثر غلظت اتانول بر استخراج ترکیبات فنلی نیز نشان داد که احتمالاً فنلهای این گیاه دارای قطبیتی هستند که در حلال با نسبت ۵۶.۶ به ۴۳.۴ اتانول - آب خیلی بیشتر از آب یا اتانول خالص حل می‌شوند.

۲-۲-۳- تعیین شرایط بهینه قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH

آزمون مهار کنندگی رادیکالهای آزاد DPPH، از آزمونهای معتبر و قابل اطمینان برای ارزیابی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها می‌باشد که در عموم تحقیقات از آن استفاده می‌شود [۲۲، ۳۵]. بر اساس نتایج آنالیز واریانس بین میزان قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH و پارامترهای استخراجی ارتباط درجه دوم با ضریب رگرسیون ۹۷.۶۵ درصد وجود داشت. معادله ۳، مدل پیشنهادی و متناسبی است که توسط روش سطح پاسخ تعیین شد:

$$\text{DPPH radical scavenging} = 42.54 + 0.1142 X_1 + 0.0894 X_2 + 0.7078 X_3 - 0.005942 X_3^2$$

این مدل نشان داد که پارامترهای دما، زمان و غلظت اتانول بر مهار کنندگی رادیکال آزاد موثر است. همچنین دو اثر خطی و درجه دوم در این آزمون مشاهده شد که اثر درجه دوم فقط مربوط به غلظت اتانول بود. همچنین مشخص شد که اثر متقابل بین پارامترهای مختلف وجود نداشت. بنابراین مشخص شد که پارامتر غلظت اتانول دارای اثر بیشتری بر مهار کنندگی رادیکالهای آزاد DPPH عصاره های حاصل از میوه کلخونگ در مقایسه با فاکتور زمان و دما بود.

شکل ۳ منحنی سطح پاسخ و کنتور اثر متقابل متغیرهای مختلف را به صورت دوتایی بر قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH میوه کلخونگ نشان می‌دهد. با در نظر گرفتن سه پارامتر مستقل زمان، دما و غلظت اتانول مشخص شد که شرایط بهینه مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH در زمان ۵۰

ارزیابی برخی عوامل موثر بر میزان ترکیبات فنولی پوست سبز گردو نشان داد که افزایش زمان استخراج، منجر به افزایش میزان استخراج ترکیبات فنولی شد در حالیکه در مورد غلظت متانول وضعیت برعکس بود. با کاهش غلظت متانول از ۱۰۰٪ به ۶۰٪، میزان ترکیبهای فنولی استخراجی افزایش یافت [۲۹]. همچنین در تحقیقی دیگر مشخص شد که بهترین شرایط استخراج ترکیبات فنلی از گندم کامل و سبوس آن به ترتیب در زمان ۶۴ دقیقه و غلظت اتانول ۵۳ درصد و زمان ۶۰ دقیقه و غلظت اتانول ۴۹٪ مشاهده شد. افزایش زمان استخراج و غلظت تقریباً نزدیک اتانول و آب در حلال باعث بیشترین استخراج ترکیبات فنولی شد که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت [۱۸].

در تحقیقی که توسط سیلوا و همکاران (۲۰۰۷) به منظور بهینه سازی اثر متقابل سه فاکتور غلظت حلال اتانول، دما و زمان استخراج به منظور استخراج ترکیبات فنولی از برگ گیاه *inga edulis* (گیاهی در شمال آمریکا) به وسیله طرح سطح پاسخ داشتند، مشخص شد که با افزایش غلظت اتانول و دمای استخراج مقدار استخراج ترکیبات فنلی افزایش می‌یابد [۳۰].

تبرکی و ناطقی در پژوهشی به بررسی بهینه سازی استخراج ترکیبات فنلی سبوس برنج با کمک امواج فراصوت پرداختند که مشخص شد، بهترین شرایط استخراج این ترکیبات در دمای ۵۱ تا ۵۴ درجه سانتیگراد، زمان ۴۰ تا ۴۵ دقیقه و غلظت اتانول ۶۵ تا ۶۷ درصد تعیین شد [۳۱]. در تحقیقی دیگر، بررسی بهینه سازی استخراج ترکیبات فنلی پوست سبز پسته با کمک امواج فراصوت انجام شد. بهترین شرایط استخراج در نسبت حلال اتانول به مواد جامد ۲۰، دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و زمان ۲۵ دقیقه بود [۹]. همچنین نتایج تحقیق دیگر نشان داد که با افزایش دما و زمان فرایند فراصوت و کاهش pH، استخراج ترکیبات فنلی پونه گاوی بیشتر شد. بهترین نتیجه در زمان ۳۵ تا ۵۵ دقیقه، دمای ۳۵ تا ۴۵ درجه سانتیگراد و pH بین ۶ تا ۶.۵ حاصل شد [۳۲].

با توجه به نتایج حاصل شده، مشخص شد که خروج ترکیبات فنلی از بافت میوه کلخونگ در دما و زمانهای پایین به راحتی صورت نمی‌گیرد. با افزایش دما در طول زمان بافت گیاه دچار تغییر شده و خروج ترکیبات فنلی به محیط بیشتر می‌شود. از طرف دیگر، فاکتور دما علاوه بر راحت تر کردن استخراج ترکیبات پلی فنلی از بافت، به گونه ای دیگر نیز بر میزان استخراج ترکیبات پلی فنلی موثر است. ترکیبات فنلی در صورتیکه ساختمان بزرگ و پیچیده داشته باشند و به حالت

فنلی، باعث افزایش قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد شد. همچنین محققین ثابت کرده‌اند که تحت تاثیر پارامترهای مختلف استخراج مانند زمان، دما، غلظت و نسبت حلال به ماده جامد ساختار ترکیبات فنلی می‌تواند متفاوت باشد و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها نیز با هم متفاوت باشد [۳۶].

دقیقه، دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و غلظت ۵۹.۶ درصد اتانول (شکل ۲) مشاهده شد. این نتایج حاکی از این بود، در آزمون قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH در شرایط کمی بالاتر از نقطه مرکزی پارامتر غلظت اتانول و بالاترین دما و زمان، بهترین نتایج حاصل شد که با شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنلی بسیار نزدیک بود. افزایش استخراج ترکیبات

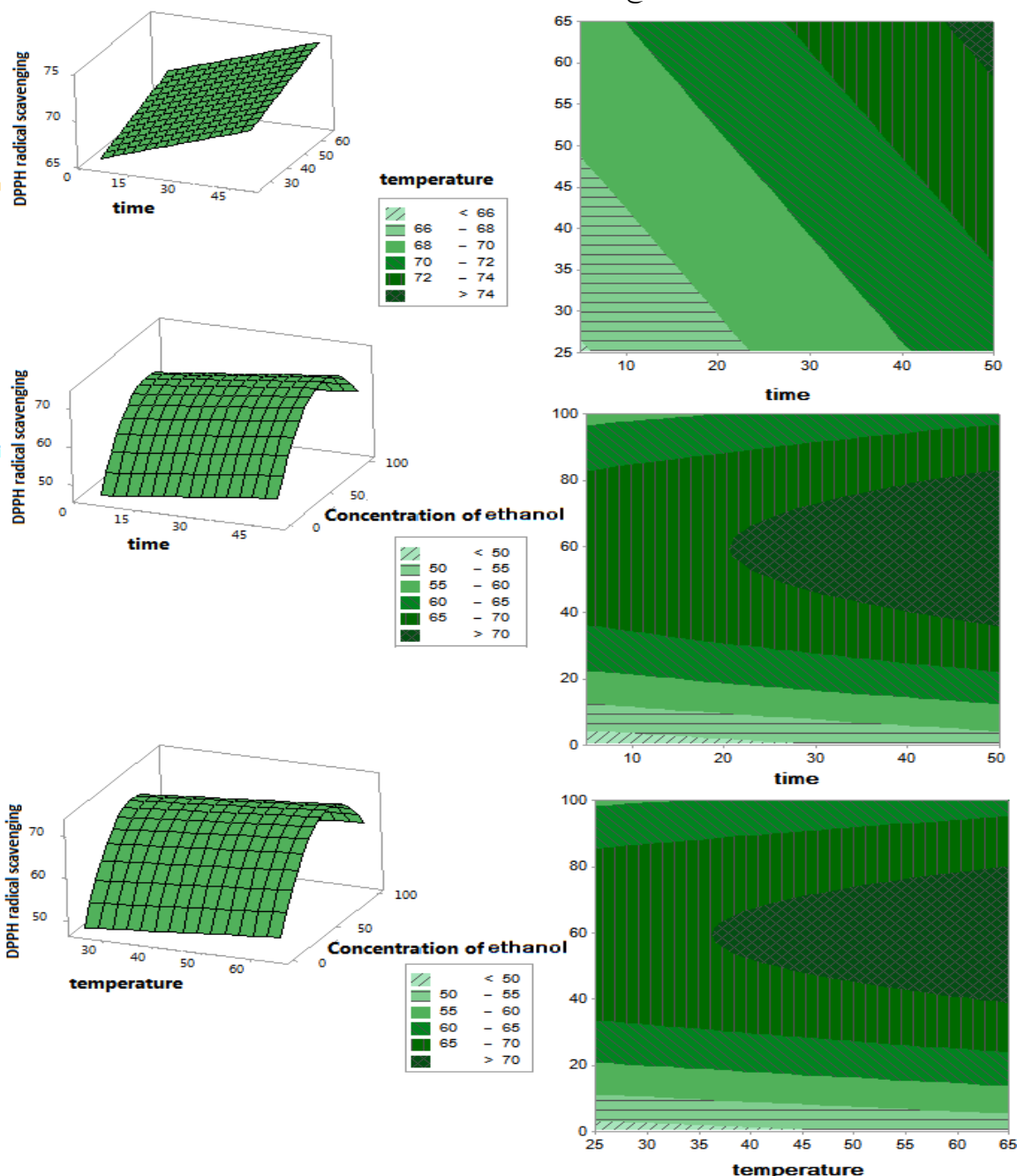


Fig 3 Response and contour plot for the effect of different parameters (Time (min), Temperature (°C) and Concentration of Ethanol (%)) on the amount of DPPH radical-scavenging power (%).

سطح پاسخ پرداخته شد، شرایط بهینه آزمون مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH زمان ۳۳.۲ دقیقه، دمای ۵۱.۷ درجه سانتیگراد و غلظت اتانول ۵۲.۵ درصد تعیین شد [۱۶].

در تحقیقی که به بررسی بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه متکا به کمک امواج فراصوت با استفاده از دماها و زمانهای متفاوت و نسبتهای مختلف حلال اتانول-آب به روش

قدرت احیا کنندگی آهن در زمان ۵۰ دقیقه، دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و غلظت اتانول ۵۸.۴ درصد مشاهده شد. نتایج حاصل با نتایج حاصل از مطالعات مویو و همکاران و بیم و همکاران دارای تشابه بود. آنها نیز گزارش کردند که در شرایط استخراج با فراصوت اثر خطی پارامترها بر پاسخ FRAP کمتر از اثر درجه دو آنها بود [۲۱، ۳۹]. استخراج و همکاران در تحقیقی گزارش کردند شرایط بهینه آزمون FRAP عصاره گیاه متکا در زمان ۳۵.۵ دقیقه، دمای ۵۱.۳ درجه سانتیگراد و غلظت اتانول ۵۲.۹ درصد بود که با نتایج تحقیق حاضر متفاوت بود [۱۶]. سهین و سملی؛ چن و همکاران و رودریگز - پرز و همکاران در بررسی خصوصیات آنتی-اکسیدانی ترکیبات پلی فنلی برگ زیتون، سبوس آرکا و برگ *Moringa oleifera* به این نتیجه رسیدند که مؤثرترین پارامتر از میان زمان، دما و نوع حلال، حلال اتانول - آب ۵۰ درصد بود [۴۱، ۴۰، ۳۸]. خو و همکاران در تحقیقی به بررسی بهینه سازی ظرفیت آنتی اکسیدانی *Canarium odontophyllum* Miq با استفاده از روش سطح پاسخ پرداختند که بهترین شرایط در زمان ۱ دقیقه فرایند استخراج با شیکر با ۵۳ درصد متانول در حلال آب - متانول حاصل شد [۴۲].

۳-۲-۴- تعیین شرایط بهینه شاخص پایداری اکسایشی

آزمون رنسیمت اغلب برای تخمین شاخص پایداری اکسایشی روغها بر اساس تغییرات در میزان هدایت الکتریکی آب در نتیجه تولید اسیدهای فرار (از جمله فرمیک اسید) مورد استفاده قرار می گیرد. به این ترتیب که بیشترین شاخص پایداری اکسایشی بر حسب زمان (ساعت) نشان دهنده بالاترین قدرت آنتی اکسیدانی می باشد [۴]. در این پژوهش از آزمون رنسیمت به عنوان یک سنجش قدرت آنتی اکسیدانی برای بهینه یابی شرایط استخراج عصاره با فراصوت استفاده شد [۱۶]. برای این منظور، عصاره های استخراجی در غلظت ۱۵۰۰ پی پی ام به روغن آفتابگردان تصفیه شده فاقد آنتی اکسیدان که تحت فرایند خالص سازی قرار گرفته، اضافه شدند و سپس تأثیر آنها بر پایداری اکسایشی - حرارتی روغن آفتابگردان در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد مورد ارزیابی قرار گرفت. لازم به ذکر است که شاخص پایداری اکسایشی روغن آفتابگردان تصفیه شده فاقد آنتی اکسیدان 1.05 ± 0.1 ساعت تعیین شد. مطابق با

مورلی و پرادو در بهینه یابی استخراج با فراصوت ترکیبات فنلی میوه انگور قرمز به این نتیجه رسیدند که بیشترین قدرت جذب رادیکال های DPPH در عصاره استخراجی با اتانول - آب ۶۰ درصد در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و زمان ۲۰ دقیقه حاصل شد [۳۷]. همچنین در تحقیقی دیگر مشخص شد که بهترین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ زیتون قرار گرفته تحت امواج فراصوت در زمان ۶۰ دقیقه، غلظت اتانول ۵۰ درصد و نسبت حلال به ماده خشک ۱۰ به ۰.۵ (میلی لیتر به گرم) مشاهده شد [۳۸]. لای و همکاران به بررسی بهینه سازی استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی لوبیای سیاه پرداختند که نتایج نشان داد که دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، زمان ۳۲.۱۳ دقیقه و نسبت حلال اتانول به ماده خشک ۲۹.۱۹ به ۱ به عنوان بهترین شرایط معرفی کردند [۳۹].

۳-۲-۳- تعیین شرایط بهینه قدرت احیا کنندگی آهن

آزمون قدرت احیا کنندگی آهن یا FRAP یک روش ساده، قابل تکرار، سریع و ارزان برای تعیین قدرت احیا یون فریک به یون فرو می باشد. آنتی اکسیدان هایی با قدرت احیا کنندگی آهن بالاتر، دارای توانایی بیشتری در پایان دادن به واکنش های مخرب زنجیره ای رادیکالی هستند [۳۹]. معادله ۴ مدل پیشنهادی مرتبط با آزمون FRAP است که اثر معنی دار پارامترهای مستقل توسط روش سطح پاسخ با ضریب همبستگی ۹۸.۶۲ درصد را نشان می دهد:

$$\text{FRAP} = 4.165 + 0.01648 X_1 + 0.01099 X_2 + 0.08926 X_3 - 0.000765 X_3^2$$

مدل آزمون قدرت احیا کنندگی آهن نشان داد که پارامترهای زمان، دما و درصد حلال اتانول - آب دارای اثرات خطی بر پاسخ قدرت احیا کنندگی آهن ($P < 0.05$) بودند گرچه اثر درجه دوم فقط مربوط به غلظت اتانول بود. همچنین اثر متقابل معنی داری بین پارامترهای مختلف مشاهده نشد. همانند آزمونهای دیگر مؤثرترین پارامتر مستقل در قدرت احیا کنندگی آهن، مربوط به غلظت اتانول بود.

شکل ۳ منحنی سطح پاسخ و کنتور اثر متقابل متغیرهای مختلف را به صورت دوتایی بر قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH میوه کلخونگ را نشان می دهد. با در نظر گرفتن مجموعه ۳ پارامتر مستقل و متغیرهای ذکر شده، بیشترین توانایی آنتی اکسیدانی عصاره های میوه کلخونگ در آزمون

بررسی این مدل نشان داد که همانند آزمون مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیا آهن، تمامی پارامترهای زمان، دما و نسبت اتانول - آب دارای تأثیر معنی دار بر پاسخ رنسیمت بود و دارای اثر خطی بر شاخص پایداری اکسایشی بودند. اثر درجه دوم تنها در پارامتر غلظت اتانول مشاهده شد. به همین دلیل این پارامتر موثرترین پارامتر مستقل شناخته شد. اثر متقابل متغیرهای مختلف به صورت دوتایی بر بهینه سازی شاخص پایداری اکسایشی حاصل از عصاره های مختلف در شکل ۴ نشان داده شده است.

جدول ۶ افزودن تمامی عصاره های مختلف میوه کلخونگ تهیه شده در شرایط مختلف باعث افزایش شاخص پایداری اکسایشی روغن آفتابگردان خالص شد.

معادله پیش بینی شده ۵ توسط روش سطح پاسخ برای تعیین شاخص پایداری اکسایشی تأثیر یافته از پارامترهای مستقل معنی دار به صورت زیر تعیین شد:

$$OSI = 1.0725 + 0.00764 X_1 + 0.00544 X_2 + 0.04723 X_3 - 0.000416 X_3^2$$

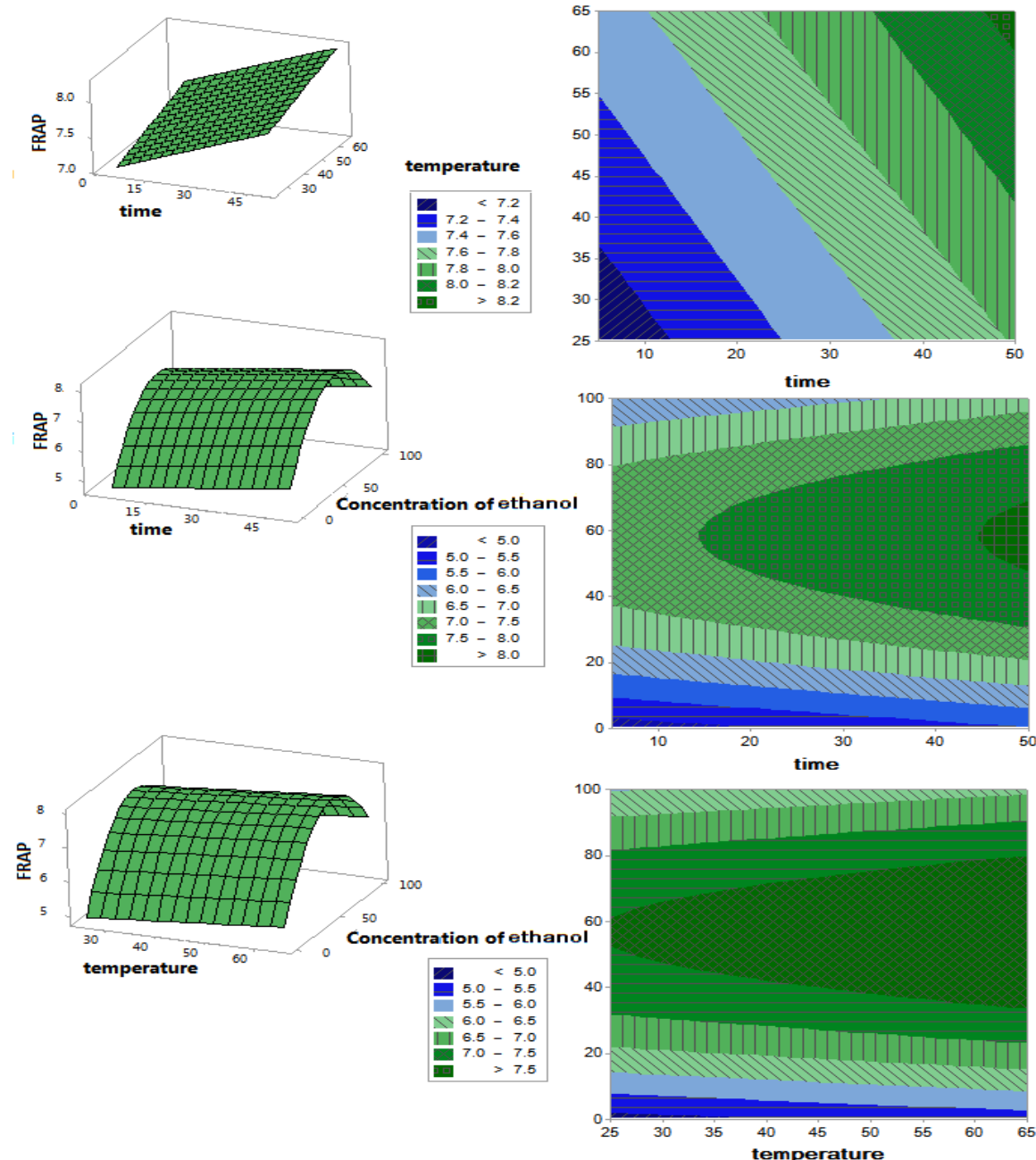


Fig 4 Response surface and contour plot for the effect of different parameters ((Time (min), Temperature (°C) and Concentration of Ethanol (%)) on the amount of FRAP test (mmol Fe²⁺/L).

رنسیمت در زمان ۵۰ دقیقه، دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و غلظت اتانول ۵۰ درصد مشاهده شد. تنها تفاوت نسبت به تحقیق حاضر در غلظت اتانول در حلال آب- اتانول مشاهده شد که به تفاوت در نوع و قطبیت ترکیبات فنلی مربوط می‌شود.

تقوی و همکاران در تحقیقی به بررسی امواج ماکروویو، میزان رطوبت و نسبت حلال به ماده خشک بر ویژگیهای شیمیایی روغن استخراج شده از پنبه دانه پرداختند. نتایج نشان داد که در زمان تشعشع ۳.۵۷ دقیقه، رطوبت پنبه دانه ۱۴ درصد و نسبت حلال به ماده خشک ۴ به ۱ بهترین شاخص پایداری اکسایشی (۱۱.۵ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد) شناخته شد [۴۳].

با در نظر گرفتن سه پارامتر مستقل زمان، دما و غلظت اتانول مشخص شد که شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنلی شامل زمان ۵۰ دقیقه، دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و غلظت اتانول ۵۶.۷ درصد (شکل ۲) بود. نتایج حاصل از این آزمون به شرایط بهینه آزمون استخراج ترکیبات فنلی، قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاکنندگی آهن بسیار نزدیک بود. استخراج بیشتر ترکیبات فنلی در شرایط بهینه به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موثر، باعث ایجاد بهترین شرایط آزمون رنسیمت شد. در مطالعات محدودی از آزمون رنسیمت به عنوان یک پارامتر وابسته در روش سطح پاسخ استفاده شده است. استخر و همکاران در تحقیقی که به بررسی بهینه سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه متکا پرداختند که شرایط بهینه آزمون

Table 6 Comparison of the observed value and predicted data by central composite rotatable design equations of Response surface methodology

Runs	Independent variable			Observed value							
	Time (min)	Temperature (°C)	Concentration of ethanol (%)	Total phenolic content (mg/gr)		DPPH radical-scavenging (%)		FRAP		Oxidative stability index (hour)	
	X ₁	X ₂	X ₃	Observed value	Predicted value	Observed value	Predicted value	Observed value	Predicted value	Observed value	Predicted value
1	5	25	0	25.5±0.6	244	45.2±0.4	453	4.62±0.17	4.52	1.21±0.05	1.2
2	5	65	0	26.9±0.4	270	48.1±0.9	489	4.81±0.11	4.96	1.4±0.04	1.5
3	50	25	0	29.6±0.6	292	50.1±0.6	505	5.13±0.14	5.26	1.65±0.06	1.6
4	50	65	0	30.5±0.8	318	55.4±1.5	541	5.89±0.11	5.70	1.85±0.05	1.8
5	27.5	65	50	48.2±0.9	460	76.1±1.2	740	8.1±0.15	8.00	3±0.05	3.0
6	5	25	100	31.1±0.8	302	58.4±1.8	567	6.01±0.19	5.80	1.93±0.07	1.8
7	5	65	100	33.3±0.6	327	60.5±1.4	603	6.19±0.08	6.24	2±0.04	2.0
8	50	25	100	34.1±0.7	350	62.0±0.7	618	6.55±0.12	6.54	2.12±0.05	2.2
9	50	65	100	36.9±0.5	375	63.4±1.2	654	6.81±0.14	6.98	2.3±0.04	2.4
10	5	25	50	37.7±0.9	390	64.5±1.3	659	7.04±0.11	7.07	2.45±0.08	2.6
11	27.5	25	50	38.9±0.5	385	67.2±1.2	685	7.22±0.2	7.44	2.66±0.05	2.7
12	5	45	50	39.2±0.9	403	69.6±1.6	677	7.36±0.15	7.29	2.84±0.07	2.7
13	27.5	65	50	40.7±0.7	41.1	70.4±0.14	720	7.82±0.13	7.88	2.95±0.06	3.0
14	50	45	50	45.1±0.4	45.1	73.6±1.1	728	8.11±0.09	8.03	3.02±0.04	3.0
15	50	65	50	48.7±0.5	464	76.2±1.5	746	8.43±0.14	8.25	3.17±0.06	3.1

رادیکال آزاد DPPH، آزمون FRAP و رنسیمت، زمان ۵۰ دقیقه، دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و غلظت اتانول ۵۶.۷ درصد در حلال اتانول آب به عنوان شرایط بهینه نهایی تحقیق حاضر تعیین شد که به شرایط بهینه آزمونهای دیگر به صورت تنها کاملاً نزدیک بود. تنها تفاوت ناچیزی در غلظت اتانول مشاهده شد و زمان و دمای شرایط بهینه کاملاً یکسان بود. همانگونه که مشخص است دو فاکتور زمان و دما در بالاترین سطح خود و فاکتور غلظت اتانول در کمی بالاتر از حد میانگین بهترین اثر خود را داشتند که این مطلب به خوبی تأیید کننده اثر درجه دوم پارامتر غلظت اتانول بود.

رضایی و همکاران در تحقیقی گزارش کردند که روغن سویا حاوی عصاره آبی پوست بنه استخراج شده تحت امواج فراصوت دارای پایداری اکسایشی - حرارتی بیشتری نسبت به روغن حاوی عصاره های اتانولی بود [۳۰] که با نتایج تحقیق حاضر که غلظت ۵۶.۷ درصد اتانول باعث بهترین شاخص پایداری اکسایشی شد، متفاوت بود. علت این نتایج مختلف می‌تواند به تفاوت در نوع ترکیبات فنلی کلخونگ و پوست بنه باشد.

۳-۳- تعیین شرایط بهینه نهایی

با در نظر گرفتن سه پارامتر دما، زمان و غلظت اتانول و مجموع نتایج ۴ آزمون استخراج ترکیبات فنلی، مهار کنندگی

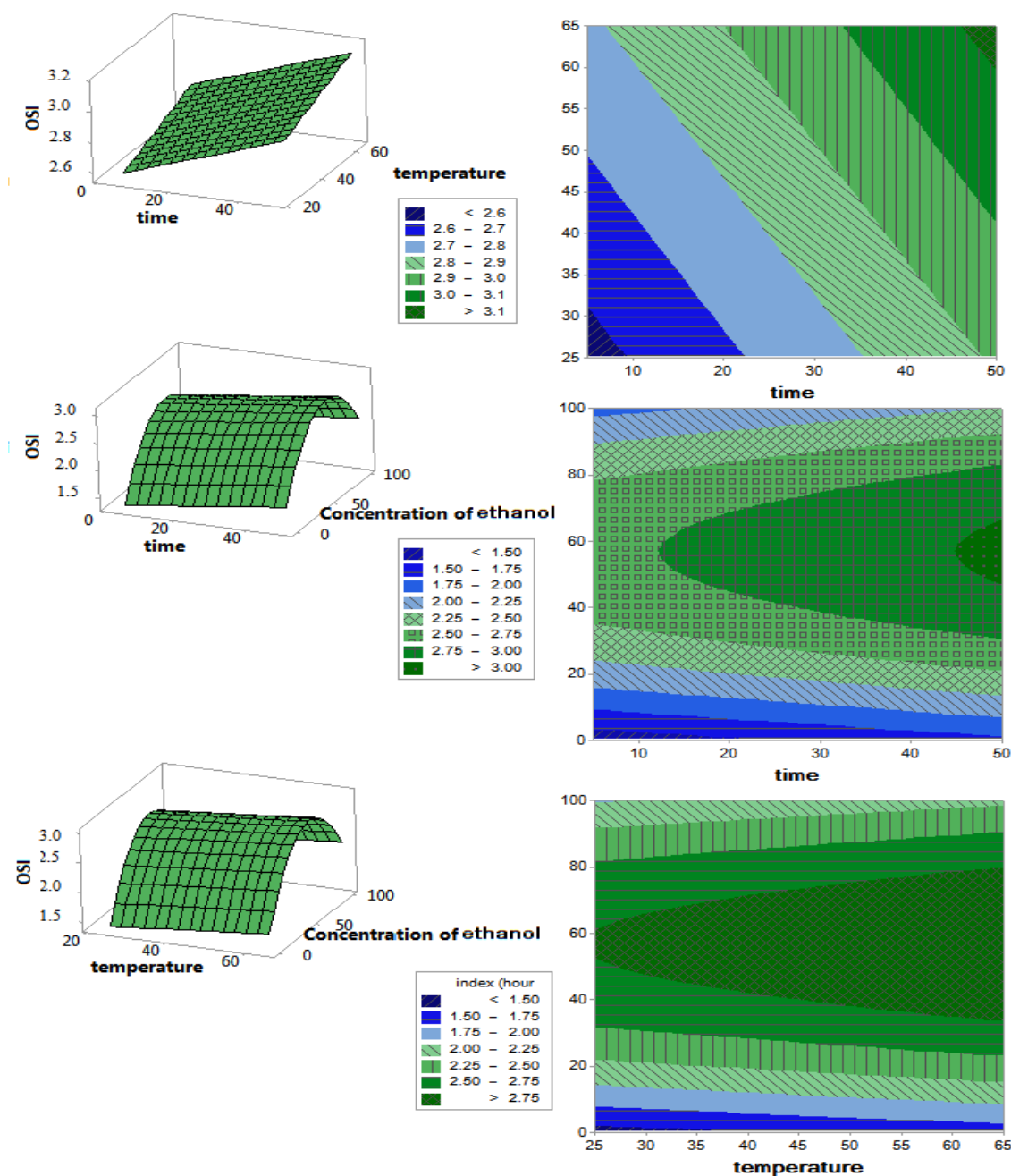


Fig 5 Response surface and contour plot for the effect of different parameters ((Time (min), Temperature (°C) and Concentration of Ethanol (%)) on the amount of Oxidative stability index (OSI, hour

در شکل ۶ و نتایج جدول ۶، بیانگر همبستگی بسیار خوب بین نتایج به دست آمده با روش تجربی و پیشبینی شده با روش آماری بود. همچنین مطابق شکل ۶ ضریب رگرسیونی نمودار استخراج ترکیبات فنولی کل، مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاکنندگی آهن و شاخص پایداری اکسایشی به ترتیب ۹۷.۶۸، ۹۸.۱۱، ۹۸.۷۴ و ۹۸.۳۸ درصد تعیین شد که بیانگر همبستگی بسیار خوب بین نتایج تجربی و پیشبینی شده بود.

۳-۴- اعتبار سنجی آزمایشها

در روش سطح پاسخ مرحله ای به نام اعتبارسنجی وجود دارد، در این مرحله می بایست مقدار استخراج ترکیبات فنولی کل، مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاکنندگی آهن و شاخص پایداری اکسایشی را در مرحله آزمایش با مقدار پیشگویی شده توسط مدل به طریق آماری مقایسه نمود. مقایسه مقادیر مشاهده شده (Y_0) با مقادیر پیشبینی شده (Y)

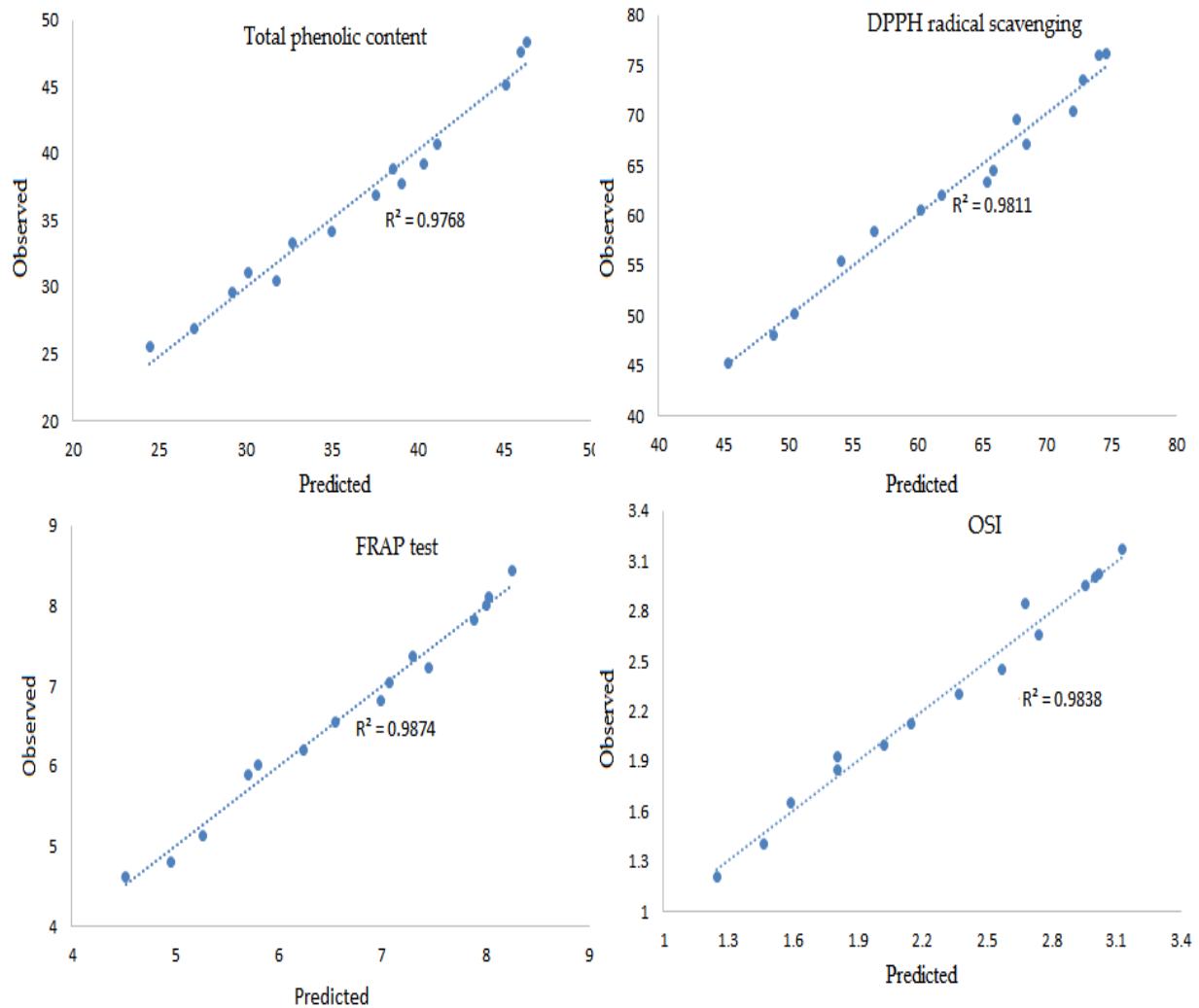


Fig 6 Comparison of the observed and predicted values of total phenolic content, DPPH radical scavenging, FRAP test and Oxidative stability index (OSI)

همه آزمون‌ها مشترک بود، اثر درجه دوم نیز در پارامترهای زمان و غلظت اتانول مشاهده شد. در سایز آزمون‌ها اثر درجه دوم فقط مربوط به غلظت اتانول بود. همچنین مشخص شد که زمان و دمای شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنلی، در آزمون‌های استخراج ترکیبات فنلی، مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و شاخص پایداری اکسایشی به صورت جداگانه و همچنین در نظر گرفتن مجموع آزمایشها با همدیگر (۵۰ دقیقه و زمان ۶۵ درجه سانتیگراد) کاملا یکسان بود. تنها تفاوت ناچیزی که وجود داشت در پارامتر غلظت اتانول در حلال اتانول-آب (۵۶.۶ تا ۵۹.۶ درصد) بود. بنابراین با بررسی مجموع آزمون‌ها مشخص شد که غلظت اتانول موثرترین فاکتور در این آزمون‌ها بود. در پایان، اعتبار سنجی نتایج این تحقیق نشان داد که همستگی خوبی بین نتایج تجربی حاصل و پیشبینی شده وجود داشت.

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش به بررسی بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه کلخونگ به کمک روش سطح پاسخ پرداخته شد. متغیرهای مستقل شامل دما، زمان فرایند فراصوت و نسبت اتانول - آب و پارامترهای وابسته شامل میزان ترکیبات فنلی کل، قدرت احیا کنندگی آهن، قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH، قدرت احیا کنندگی آهن و شاخص پایداری اکسایشی بود. بررسی نتایج نشان داد که پارامترهای مستقل دما، زمان و نسبت اتانول - آب، دارای اثر معنی دار ($P > 0.05$) بر آزمون‌های ذکر شده بود. در بین مدل‌های پیشبینی شده برای سه آزمون ذکر شده، مدل مربوط به استخراج ترکیبات فنلی قوی ترین مدل شناخته شد، چون در این آزمون علاوه بر اثر خطی پارامترهای مستقل که در بین

۵- منابع

- methodology. *Journal of Food Science & Technology*, 14: 237-248.
- [10] Fellows, p., 2000. Food processing technology. 2th ed. CRC press. Boca Raton Boston new York Washington, DC.
- [11] Hashemi, S.M.B., Mousavi Khaneghah, A., Akbarirad, H., 2016. The Effects of Amplitudes ultrasound-assisted solvent extraction and pretreatment time on the yield and quality of *Pistacia khinjuk* hull oil. *Journal of oleo science*, 65: 733-738.
- [12] Tavakoli, J., Khani, J., Shahroozi, 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 & Technology*, 88: 97-107.
- [13] Martins, A.C., Bukman, L., Vargas, A.M., Barizão, É.O., Moraes, J.C., Visentainer, J.V., Almeida, V.C., 2013. The antioxidant activity of teas measured 1 by the FRAP method adapted to the FIA system: Optimising the conditions using the response surface methodology. *Food Chemistry*, 138: 574-580.
- [14] Brito Maia Miamoto, J.D., Aazza, S., Ruas, N.R., Alves de Carvalho, A., Brasil Pereira Pinto, J.E., Resende, L.V., Vilela Bertolucci, S.K., 2020. Optimization of the extraction of polyphenols and antioxidant capacities from two types of *Solanum gilo* Raddi using response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2019.100238>
- [15] Lopez, A., Rico, M., Rivero, A., & Tangil, D. M. S., 2011. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*, 125:1104-1109.
- [16] Estakhr, P., Tavakoli, J., Beigmohammadi, F., Alae, Sh., 2019. Optimization of antioxidant activity of *Ferula persica* by Ultrasound waves using various ratios of ethanol-water solvent at different temperatures whit Response Surface Methodology. *Journal of Food Science & Technology*, 16: 291-303.
- [17] Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F., 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93: 47-56.
- [1] Farhoosh, R., Tavakoli, J., Haddad Khodaparast, M.H., 2008. Chemical composition and oxidative stability of kernel oils from two current subspecies of *Pistacia atlantica* in Iran. *Journal American Oil Chemical Society*, 85:723-729.
- [2] Tavakoli, J., Hamedani, F., Haddad Khodaparast, M.H., 2016. Investigating chemical properties and oxidative stability of kernel Oil from *P.khinjuk* growing wild in Iran. *Journal American Oil Chemical Society*, 93:681-687.
- [3] Tavakoli, J., Haddad Khodaparast, M.H., 2013. Chemical properties of the oil from *P.khinjuk* fruits growing wild in Iran. *Journal of Chemistry of Natural Compounds*, 49: 803-810.
- [4] Tavakoli, J., Brewer, M. S., Zarei Jelyani, A., Estakhr, P., 2017. Oxidative stability of olive oil during the thermal process: Effect of *Pistacia khinjuk* fruit oil. *International Journal of Food Properties*, 20: 3256-3265.
- [5] Tavakoli, J., Estakhr, P., Zarei Jelyani, A., 2017. Effect of unsaponifiable matter extracted from *Pistacia khinjuk* fruit oil on the oxidative stability of olive oil. *Journal of Food Science & Technology*, 54:2980-2988.
- [6] Hatamnia, A. A., Rostamzad, A., Malekzadeh, P., Darvishzadeh, R., Abbaspour, N., Hosseini, M., Nourollahi, K., Mehr, R. S. A., 2016. Antioxidant activity of different parts of *Pistacia khinjuk* Stocks fruit and its correlation to phenolic composition. *Natural Product Research*, 30:1445-1450.
- [7] Azadpour, M., Rezaei, M., Taati, M., Ghasemi Dehnoo, M., Ezatpour, B., 2015. Antioxidant, antibacterial, and wound-healing properties of methanolic extract of *Pistacia khinjuk*. *Comparative Clinical Pathology*, 24: 379-385.
- [8] Wang, L., Weller, C. L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Science & Technology*, 17: 300-312.
- [9] Rajae, A., Mirzaee Moghaddam, H., Baradaran, N., 2017. Optimization of Phenolic Compounds and antioxidant activity of the extract of *Ziziphora clinopodioides* using ultrasound-assisted extraction whit response surface

- grape pomace. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 2111-2117.
- [27] Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X., 2008. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106: 804-810.
- [28] Ya-Qin, M., Jian-Chu, C., 2009. Simultaneous extraction of phenolic compound of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16: 57-62.
- [29] Rahimi-Panah, M., Hamed, M., Mirzapour, M., 2010. Antioxidant activity and phenolic contents of Persian walnut (*Juglans regia* L.) green husk extract. *African Journal of Food Science & Technology*, 1: 105-111.
- [30] Silva, E. M., Roges, H., Larondelle, Y., 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Journal of Separation and Purification Technology*, 55: 381-387.
- [31] Tabaraki, R., Nateghi, A., 2011. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18: 1279-1286.
- [32] Heydari, Majd., M., Rajaei., A., Salar Bashi., D., Mortazavi, S. A., Bolourian, S., 2014. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine *Phlomis chemaparviflorum* leaves using response surface methodology. *Industrial Crops & Products*, 57: 195-202.
- [33] Pérez-Jiménez, J., Torres, J.L., 2011. Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 59: 12713-12724.
- [34] Mobasser, N., Esmailzadeh Kenari, R., Razavi, R. (2020). Investigation of antioxidant properties of free and bounded phenol of kiwi fruit peel extract and its nanocapsules properties. *Iranian Journal of Biosystems Engineering*, 55: 211-222.
- [35] Esmailzadeh Kanari, R., Raftani Amiri, Z., Motamedzadegan, A., Mohammadzadeh Milani, J., Farmani, J., Farahmandfar, R. (2020). Optimization of Iranian Golpar (*Heracleum persicum*) extract encapsulation using sage (*Salvia macrosiphon*) seed gum: Chitosan as a wall material and its antioxidant activity to the shelf life of
- [18] Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J. Y., Jo, I.H., 2009. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds. *Agricultural & Food Chemistry*, 57: 4988-4994.
- [19] Hammi, K. M., Jdey, A., Abdelly, C., Majdoub, H., Ksouri, R., 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from *Tunisian Zizyphus lotus* fruits using response surface methodology. *Food Chemistry*, 184: 80-89.
- [20] Sfahlan, A. J., Mahmoodzadeh, A., Hasanzadeh, A., Heidari, R., Jamei, R., 2009. Antioxidants and antiradicals in almond hull and shell (*Amygdalus communis* L.) as a function of genotype. *Food Chemistry*, 115: 529-533.
- [21] Yim, H. S., Chye, F. Y., Koo, S. M., Matanjun, P., How, S. E., Ho, C. W., 2012. Optimization of extraction time and temperature for antioxidant activity of edible wild mushroom, *Pleurotus porrigens*. *Food & Bioprocess Technology*, 90: 235-242.
- [22] Razali, N., Mat-Junit, S., Abdul-Muthalib, A. F., Subramaniam, S., Abdul-Aziz, A., 2012. Effects of various solvents on the extraction of antioxidant phenolics from the leaves, seeds, veins and skins of *amarindus indica* L. *Food Chemistry*, 131: 441-448.
- [23] Tavakoli, J., Hajpour Soq, K. H., Yousefi, A. R., Estakhr, P., Dalvi, M., Mousavi Khaneghah, A., 2019. Antioxidant activity of *Pistacia atlantica* var *mutica* kernel oil and its unsaponifiable matters. *Journal of Food Science & Technology*, 56: 5336-5345.
- [24] Myers, R. H., Montgomery, D. C., Anderson-Cook, Ch.K., 2016. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Design Experiment s. 4nd Edition. John Wiley & Sons, New York.
- [25] Hossain, M.B., Brunton, N.P., Patras, A., Tiwari, ., O'Donnell, C.P., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C., 2012. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19: 582-590.
- [26] Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sinero, J., Núñez, M. J., 2005. Effect of solvent temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of

- response surface methodology. *International Journal of Food Microbiology*, 85: 87-100.
- [40] Chen, W., Huang, Y., Qi, J., Tang, M., Zheng, Y., Zhao, S., Chen, L., 2014. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Areca Husk. *Food Processing & Preservation*, 38: 90-96.
- [41] Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., 2015. Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Industrial Crops & Products*, 66: 246-254.
- [42] Khoo, H.E., Azlan, A., Ismail, A., Abas, F., 2013. Response surface methodology optimization for extraction of phenolics and antioxidant capacity in *Defatted dabai* parts. *Sains Malaysiana*, 42: 949-954.
- [43] Taghvaei, M., Jafari, S.M., Assadpoor, E., Nowrouzieh, Sh., & Alishah, O., 2012. Optimization of microwave-assisted extraction of cottonseed oil and evaluation of its oxidative stability and physicochemical properties. *Food Chemistry*, 160: 90-97.
- soybean oil during storage conditions in free and encapsulated forms. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14: 2828-2839.
- [36] Ilaiyaraja, N., Likhith, K., Babu, G.S., & 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.
- [37] Morelli, L., Prado, M. A., 2012. Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19: 1144-1149.
- [38] Şahin, S., Şaml, R., 2013. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 595-602.
- [39] Moyo, S., Gashe, B., Collison, E., Mpuchane, S., 2003. Optimising growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using



Optimization of phenol compound extraction and antioxidant activity of *Pistacia khinjuk* fruits by ultrasonic waves based on a Response Surface Methodology

Hosseinalhashemi, M. ¹, Tavakoli, J. ^{2*}, Rafati, A. ^{3*}, Ahmadi, F. ⁴

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Sarvestan Branch, Islamic Azad University, Sarvestan, Fars, Iran.
2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Fars, Iran.
3. Division of Pharmaceutical Chemistry and Food Science, Sarvestan Branch, Islamic Azad University, Sarvestan, Fars, Iran;
4. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Fars, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2021/ 02/ 12
Accepted 2021/ 04/ 03

Keywords:

Independent variables,
Ferric reducing power,
Free radical scavenging,
Rancimat,
Validation.

DOI: 10.29252/fsct.18.06.08

*Corresponding Author E-Mail:
javadtavakoli@jahromu.ac.ir
rafati@iausarv.ac.ir

ABSTRACT

In the present study, the optimization process of phenolic compounds extraction and antioxidant activity (DPPH radical-scavenging assay, FRAP test, and oxidative stability index) of *Pistacia khinjuk* fruits was evaluated using ultrasound waves through response surface methodology (RSM). To optimize the extraction process from the central composite design with three independent variables including time (5, 27.5 and 50 minutes), temperature (25, 45 and 65 ° C) and ethanol ratio in water-ethanol solvent (0, 50 and 100%) was used. Significant effects of independent variables on the extraction of phenol compound, DPPH radical scavenging power, FRAP test and OSI of *P.khinjuk* fruit extract, with the regression coefficients of 97.65, 98.09, 98.62 and 98.38 %, respectively, were noted. Among the independent parameters, ethanol concentration was the most effective parameter because two effects of quadratic and linear were observed in the proposed models of different tests. The interaction effect between different parameters was not observed in the models of this study, too. It was also the strongest model for the phenolic compounds extraction test; because in this test, in addition to the linear effect of independent parameters that were common to all tests, a quadratic effect was also observed in the parameters of time and ethanol concentration. Also, the best antioxidant activity of *P.khinjuk* fruit was obtained by using the ultrasonic wave for 50 minutes at 65 ° C and with 57.7% v/v ethanol/water solution. Finally, it was found that the results of experimental tests were close to the values predicted by the response level method.