

استفاده از روش سطح پاسخ به منظور بهینه‌سازی استخراج عصاره بخش هوایی کرفس (*Apium graveolens* L.) و ترکیب‌های فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن به کمک امواج فراصوت

فاطمه سلیمی^{۱*}، محمد فتاحی^۲ و جواد حمزه‌ئی^۳

*- نویسنده مسئول، دانش‌آموخته دکترای تخصصی، گروه باغبانی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

پست الکترونیک: fatemesalimi18@yahoo.com

۲- استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- دانشیار، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۷

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۸

چکیده

در این تحقیق، اثر زمان (۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه) و دمای امواج فراصوت (۳۵، ۴۵، ۵۵، ۶۵ و ۷۵ درجه سانتی‌گراد)، نسبت اتانول به آب (۲۰، ۳۵، ۵۰، ۶۵ و ۸۰ درصد) و نسبت ماده خشک به حلال (۵:۱، ۱۰:۱، ۱۵:۱، ۲۰:۱ و ۲۵:۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر ویژگی‌های فنول و فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی حاصل از گیاه کرفس (*Apium graveolens* L.) بررسی شد. استخراج عصاره از بخش هوایی کرفس، با روش عصاره‌گیری هیدروالکلی به کمک امواج فراصوت با بهره‌گیری از روش سطح پاسخ انجام گردید و صفات فنول کل، فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش DPPH و FRAP اندازه‌گیری و ارزیابی گردید. براساس نتایج، اعمال زمان ۱۰ دقیقه امواج فراصوت، ۵۵ درجه سانتی‌گراد دمای امواج فراصوت، نسبت اتانول به آب ۸۰٪ و نسبت ماده خشک به حلال ۵:۱ بهترین تیمار بود. در شرایط بهینه، مقدار فنول و فلاونوئید کل به ترتیب ۴۷۱/۱۲ میلی‌گرم گالیک اسید در یک گرم ماده خشک و ۱۸۷/۷۰ میلی‌گرم کوئرستین در یک گرم ماده خشک و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره به روش DPPH و FRAP به ترتیب ۶۸/۴۸٪ و ۴۲۱۰/۴ میکرومولار Fe⁺² در ۵۰ میکرولیتر عصاره بدست آمد. در کل، R²-Adjusted R² و P-value بالا در برازش مدل‌ها، بیانگر ایده‌آل بودن مدل‌های سطح پاسخ (RSM) ترسیم شده است. به عبارت دیگر، بالا بودن این پارامترها نشانگر وجود همبستگی بالای بین مقادیر مشاهده شده و مقادیر پیش‌بینی شده می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: امواج فراصوت، روش RSM، عصاره، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئید، فنول، گیاه دارویی.

مقدمه

یافته‌های جدید در علم پزشکی و گیاه‌شناسی، اهمیت و خواص گیاهان را در درمان بیماری‌ها آشکار کرد. همچنین، عوارض نامطلوب داروهای شیمیایی به پیشرفت علم گیاه درمانی سرعت بیشتری بخشید. به طوری که تقریباً یک

چهارم داروهای تولید شده حاوی عصاره گیاهی یا ترکیب‌هایی هستند که از مواد گیاهی بدست آمده‌اند و یا براساس ترکیب‌های گیاهی مدل‌سازی شده‌اند (Yaniv, 2005). گیاه کرفس با نام علمی *Apium graveolens* متعلق به تیره چتریان است. این گیاه حداقل هشت ترکیب

از روش‌های مرسوم است (Chen *et al.*, 2012). کارایی اصلی این روش در استخراج جامد-مایع، بالا بردن عملکرد و سرعت بخشیدن به فرایند استخراج می‌باشد. امواج صوتی می‌توانند با کاهش دمای فرایند، اجازه استخراج ترکیب‌های ناپایدار به حرارت را امکان‌پذیر سازند (Shotipruk *et al.*, 2001). عواملی مانند میزان رطوبت، اندازه ذرات در گیاه مورد نظر و نوع حلال مورد استفاده در استخراج کارآمد و مهم هستند. علاوه بر این، فاکتورهای مربوط به ویژگی‌های دستگاه تولیدکننده امواج مانند فرکانس، فشار، دما و زمان در کارکرد امواج صوتی مؤثر هستند (Wang & Weller, 2006). از سویی، امروزه بهینه‌سازی روش استخراج عصاره از گیاهان دارویی حائز اهمیت بالایی است. بهینه‌سازی، به افزایش کارایی سیستم، یک فرایند یا فرآورده به منظور دستیابی به حداکثر منفعت از آن گفته می‌شود و اغلب در آزمایش‌های تحلیلی برای حصول شرایط ایده‌آل بوجود آورنده بهترین پاسخ استفاده می‌شود (Araujo & Brereton, 1996). امروزه، بکارگیری روش سطح پاسخ در بهینه‌سازی کارهای آماری به‌طور وسیع مورد استفاده قرار گرفته است و علت این امر مزایای این روش نسبت به روش‌های قدیمی مانند دستیابی به انبوهی از اطلاعات از تعداد کم آزمایش‌ها و ارزیابی اثر متقابل میان متغیر مستقل و وابسته است (Bezerra *et al.*, 2008). از این رو، هدف این تحقیق، استفاده از روش سطح پاسخ به منظور بهینه‌سازی استخراج عصاره بخش هوایی کرفس و پارامترهای آنتی‌اکسیدان فنولیک آن به کمک امواج فراصوت بود.

مواد و روش‌ها

استخراج عصاره از بخش هوایی سایه خشک کرفس به روش عصاره‌گیری الکلی و هیدروالکلی به کمک امواج فراصوت با بهره‌گیری از روش سطح پاسخ انجام شد. در این تحقیق اثر متغیرهای مستقل شامل X_1 (زمان امواج فراصوت بر حسب دقیقه)، X_2 (دمای امواج فراصوت بر حسب درجه سانتی‌گراد)، X_3 (نسبت اتانول به آب بر حسب درصد) و X_4

ضدسرطانی را در خود جای داده است و از رشد تومورهای سرطانی پیشگیری می‌کند و می‌تواند تخریب ناشی از رادیکال‌های آزاد را به حداقل برساند (Kooti & Daraei, 2017). عصاره کرفس از شاخص‌های تغذیه‌ای بالایی مانند خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد انعقاد پلاکت‌های خون نیز برخوردار است (Sowbhagya, 2014).

در بعضی موارد روش عصاره‌گیری از گیاهان دارویی نادرست بوده و سبب شده است که اثر آن تا حدودی و یا کاملاً از بین برود. به همین دلیل، گاهی اثر گیاهان دارویی کم اهمیت تلقی می‌شود (Tavakoli Saberi & Sedaghat, 2005). پیشرفت سریع در فرایند عصاره‌گیری، منجر به جداسازی اختصاصی بسیاری از متابولیت‌های گیاهی مهم در حوزه درمان گردید. خیس کردن، پرکولاسیون و دم کردن روش‌های متداول برای عصاره‌گیری از گیاهان دارویی هستند و بیشتر برای تهیه داروهای گیاهی استفاده می‌شوند. تنها هدف این روش‌های پایه‌ای استخراج، بدست آوردن قسمت مطلوب دارویی و حذف مواد بیهوده از طریق تیمار با حلال انتخابی است. روش‌های عصاره‌گیری تحت تأثیر فاکتورهای گوناگونی مانند سرعت انتقال حلال به ماده، سرعت حل شدن اجزاء محلول در حلال و سرعت انتقال بخش محلول به خارج از بخش نامحلول ماده قرار می‌گیرند. استخراج بهینه، بیشتر به افزایش سطح ماده‌ای که استخراج می‌شود و کاهش فواصل شعاعی پیموده شده بین مواد جامد مربوط است (Swami *et al.*, 2008). از این رو استفاده از روش‌های جدید استخراج عصاره ضروریست.

در حال حاضر، استخراج به کمک اولتراسوند یکی از روش‌های نوین استخراج است که با ایجاد انبساط و انقباض‌های پی‌درپی در مولکول‌های ماده گیاهی، حفره‌هایی به وجود می‌آورد. این حفره‌ها، موجب خروج سریع محتویات داخل سلول‌ها به خارج از آن می‌شوند. از سویی، امواج فراصوت با تخریب دیواره‌های سلولی ماده گیاهی، نشر ترکیب‌ها را به خارج از سلول‌ها افزایش می‌دهد (Wang *et al.*, 2008). ثابت شده است که استخراج به کمک اولتراسوند، ارزان، ساده و بسیار مؤثرتر

ساخت کشور آلمان استفاده گردید. زمان و دمای امواج فراصوت به ترتیب ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه و ۳۵، ۴۵، ۵۵، ۶۵ و ۷۵ درجه سانتی‌گراد بود.

در مدل چند متغیره

$$(Y_n = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^4 b_{ij} X_i X_j)$$

Y: پاسخ پیش‌بینی شده، b_0 : ضریب ثابت، b_i : اثرهای خطی، b_{ii} : اثر مربعات و b_{ij} : اثر متقابل می‌باشد. ضرایب پیش‌بینی مدل‌ها برای هر یک از پاسخ‌ها (FRAP, DPPH, فلاونوئید و فنول) نیز از روابط زیر بدست آمد.

(نسبت ماده خشک به حلال بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر مقدار فلاونوئید، فنول و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با دو روش DPPH در ۳۰ دقیقه و FRAP مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). مقادیر DPPH و FRAP با جایگذاری فرمول مربوطه و فنول و فلاونوئید کل نیز از طریق اندازه‌گیری و جایگذاری در فرمول بدست‌آمده از نمودار استاندارد محاسبه گردید. در روش امواج فراصوت، ۰/۴ گرم قسمت هوایی آسیاب شده کرفس به‌وسیله ترازو با دقت ۰/۰۰۱ توزین شد و با توجه به تیمار با نسبت اتانول به آب و نسبت ماده خشک به حلال تنظیم گردید. به‌منظور ایجاد امواج فراصوت از دستگاه مولد فراصوت Elma مدل E120H با توان دمایی ۶۰۰ وات، فرکانس ۳۷ کیلوهرتز و

$$DPPH_{30min}(\%) = 40.44161 + 3.72346 X_1 + 0.22912X_2 - 0.95241X_3 - 3.56776X_4 - 4.51606X_{12} + 5.61770X_{22} + 1.26632X_{32} + 6.90114X_{42} + 11.27150X_{1X2} - 2.16852X_{1X3} + 2.13774X_{1X4} - 5.08094X_{2X3} + 1.06927X_{2X4} - 6.61598X_{3X4}$$

$$FRAP (\mu MFe^{+2}/50\mu l EO) = 1809.988 - 286.551 X_1 + 0.774 X_2 + 31.451X_3 + 773.007X_4 - 243.212X_{12} + 224.773X_{22} - 115.134X_{32} + 126.182X_{42} - 541.961X_{1X2} - 845.452X_{1X3} - 554.230X_{1X4} + 506.258X_{2X3} - 518.961X_{2X4} - 260.208X_{3X4}$$

$$Total\ flavonoid\ (mg\ quercetin\ g^{-1}DW) = 164.0833 - 0.6875 X_1 - 10.5208X_2 + 36.9375X_3 - 32.6458X_4 - 41.2240X_{12} + 12.0260X_{22} - 35.9115X_{32} - 30.7865X_{42} + 23.0313X_{1X2} - 14.2188X_{1X3} + 30.9063X_{1X4} - 32.8438X_{2X3} - 4.3438X_{2X4} - 39.4688X_{3X4}$$

$$Total\ phenol\ (mg\ GAE\ g^{-1}DW) = 410.208 - 1.719 X_1 - 26.302X_2 + 92.344X_3 - 82.365X_4 - 103.248X_{12} + 29.877X_{22} - 89.966X_{32} - 76.0281X_{42} + 57.578X_{1X2} - 35.547X_{1X3} + 77.266X_{1X4} - 82.109X_{2X3} - 10.859X_{2X4} - 98.672X_{3X4}$$

جدول ۱- متغیرهای مستقل و مقادیر آنها

سطوح متغیر					نماد ریاضی	متغیر مستقل
-۲	-۱	۰	+۱	+۲		
۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	X_1	زمان امواج فراصوت (دقیقه)
۳۵	۴۵	۵۵	۶۵	۷۵	X_2	دمای امواج فراصوت (درجه سانتی‌گراد)
۲۰	۳۵	۵۰	۶۵	۸۰	X_3	نسبت اتانول به آب (%)
۱:۲۵	۱:۲۰	۱:۱۵	۱:۱۰	۱:۵	X_4	نسبت ماده خشک به حلال (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

اندازه‌گیری فلاونوئید و فنول

فلاونوئید کل به روش رنگ‌سنجی اندازه‌گیری شد (Shin *et al.*, 2007). بدین صورت که ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده را با ۱۵۰ میکرولیتر نیتريت سدیم ۵٪ مخلوط کرده و پس از ۵ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪ اضافه کرده و پس از ۵ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر سود ۱ مولار اضافه کرده و سرانجام حجم نهایی ترکیب مورد نظر با استفاده از آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۸۰ نانومتر قرائت گردید. مقدار جذب (Y) در رابطه زیر جایگذاری شد و مقدار فلاونوئید کل (X) بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در یک گرم ماده خشک بدست آمد. از ترکیب فلاونوئیدی کوئرستین به‌عنوان استاندارد برای بدست آوردن رابطه $(Y = 0.002X + 0.011)$ استفاده شد.

برای اندازه‌گیری فنول کل، به ۶۰ میکرولیتر عصاره تهیه شده، ۱۸۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۲۰۰ میکرولیتر Folin-Ciocalteu ۱۰٪ اضافه کرده و پس از گذشت ۱۰-۵ دقیقه، به این مخلوط ۹۶۰ میکرولیتر کربنات سدیم افزوده شد و به مدت ۲-۱/۵ ساعت در جای تاریک نگهداری گردید و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد (Slinkard & Singleton, 1977). مقدار کل ترکیب‌های فنولی عصاره‌ها با استفاده از رسم منحنی استاندارد گالیک اسید بدست آمد. برای تهیه نمودار کالیبراسیون به غلظت ۰/۵ گرم در لیتر، ابتدا به مقدار ۰/۰۱ گرم از اسید گالیک ۲ میلی‌لیتر اتانول اضافه گردید و بعد با آب مقطر به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. مقادیر ۰، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی‌لیتر (که به ترتیب ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر می‌باشند) تهیه شد و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. با جایگذاری مقدار جذب نمونه‌ها (Y) در فرمول $(Y = 0.034X - 0.04)$ و محاسبه فنول کل (X) از روی نمودار، نتایج بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در یک گرم ماده خشک بیان گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH و

FRAP

ابتدا به ۵۰ میکرولیتر اسانس و یا ۵۰ میکرولیتر عصاره، ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۰۴٪ DPPH در متانول اضافه شد و پس از ۱۵ و ۳۰ ثانیه، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید و بعد از فرمول مربوطه $(I\% = (A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}) \times 100)$ برای محاسبه DPPH استفاده شد (Kirby & Schmidt, 1997). در این رابطه، A_{blank} : جذب نوری کنترل منفی، فاقد اسانس یا عصاره و A_{sample} : جذب نوری غلظت‌های مختلف اسانس یا عصاره است.

در روش فرپ، ۲/۸۵ میلی‌لیتر محلول FRAP به‌علاوه ۱۵۰ میکرولیتر عصاره و ۵۰ میکرولیتر اسانس برای هر نمونه تهیه شد و پس از ۱۰ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۳ نانومتر قرائت گردید (Benzie & Strain, 1996). برای تهیه محلول فرپ، ۳/۱ گرم استات سدیم و ۱۶ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال در ۱ لیتر آب مقطر حل شد و pH محلول در ۳/۶ تنظیم گردید. سپس ۳۱ میلی‌گرم معرف TPTZ در ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۴۰ میلی‌مولار حل و به‌منظور تهیه محلول ۲۰ میلی‌مولار کلرید آهن، ۵/۴۱ گرم کلرید آهن Fe^{+3} در ۱ لیتر آب مقطر حل شد. برای تهیه محلول استاندارد از سولفات آهن استفاده شد. ۰/۲۷۸ گرم سولفات آهن در ۱ لیتر آب مقطر حل شد و محلول‌های استاندارد ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار تهیه گردید. مقدار جذب (Y) در فرمول مربوطه $(Y = 0.001X + 0.0575)$ جایگذاری شد و مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی (X) بر حسب میکرومولار Fe^{+2} در ۵۰ میکرولیتر اسانس و یا میکرومولار Fe^{+2} در ۵۰ میکرولیتر عصاره بدست آمد.

نتایج

دستیابی به R^2 -Adjusted R^2 و P-value بالا در برازش مدل‌ها، بیانگر ایده‌آل بودن مدل‌های RSM ترسیم شده

از ضرایب پاسخها (متغیرهای وابسته) نشان داد که بیشتر ضرایب خطی، درجه دوم و ضرایب اثرهای متقابل در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ معنی‌دار بودند.

می‌باشد. به عبارت دیگر، بالا بودن این پارامترها نشانگر وجود همبستگی بالا بین مقادیر مشاهده شده و مقادیر پیش‌بینی شده است (Zou *et al.*, 2011). F-value حاصل

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر متغیرهای مستقل بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی DPPH و FRAP، مقدار فنول و فلاونوئید کل

میانگین مربعات				درجه	مدل
فلاونوئید کل	فنول کل	FRAP	DPPH	آزادی	
-	-	-	-	۴	خطی
۲/۸۴ ns	۱۷/۷۲ ns	۴۹۲۶۶۹**	۸۳/۱۹**	۱	X1
۶۶۴/۱۳ ns	۴۱۵۰/۸۰ ns	۴ ns	۰/۳۲ ns	۱	X2
۸۱۸۶/۲۷**	۵۱۱۶۴/۲۱**	۵۹۳۵ ns	۵/۴۴ ns	۱	X3
۶۳۹۴/۵۰**	۴۰۷۰۴/۳۷**	۳۵۸۵۲۴۲**	۷۶/۳۷**	۱	X4
-	-	-	-	۴	نمای دوم
۱۱۶۵۳/۱۳**	۷۳۰۹۷/۶۱**	۴۰۵۶۱۳**	۱۳۹/۸۵**	۱	X12
۹۹۱/۷۲**	۶۱۲۱/۰۹*	۳۴۶۴۴۲**	۲۱۶/۴۰**	۱	X22
۸۸۴۳/۲۰**	۵۵۵۰۱/۳۴**	۹۰۸۹۷ ns	۱۰/۹۹ ns	۱	X32
۶۴۹۹/۲۴**	۳۹۶۳۵/۶۳**	۱۰۹۱۷۹ ns	۳۲۶/۵۸**	۱	X42
-	-	-	-	۶	برهم‌کنش
۲۱۲۱/۷۵**	۱۳۲۶۰/۹۶**	۱۱۷۴۸۸۷**	۵۰۸/۱۹**	۱	X1X2
۸۰۸/۶۹ ns	۵۰۵۴/۳۲ ns	۲۸۵۹۱۵۳**	۱۸/۸۱۹ ns	۱	X1X3
۳۸۲۰/۷۹**	۲۳۸۷۹/۹۱**	۱۲۲۸۶۸۲**	۲۸/۱۸ns	۱	X1X4
۴۳۱۴/۸۵**	۲۶۹۶۷/۸۰**	۱۰۲۵۱۸۸**	۱۰۳/۲۶**	۱	X2X3
۷۵/۴۷ ns	۴۷۱/۷۰ ns	۱۰۷۷۲۸۲**	۴/۵۷ ns	۱	X2X4
۶۲۳۱/۱۳**	۳۸۹۴۴/۵۶**	۲۷۰۸۳۲**	۱۷۵/۰۹**	۱	X3X4
۱۹۴/۰۰	۱۲۴۲/۴۸	۲۸۴۱۳	۶/۰۸	۱۵	خطا
۰/۹۵۲۲-۰/۹۰۷۵	۰/۹۵۱۱-۰/۹۰۵۴	۰/۹۶۷۹-۰/۹۳۷۸	۰/۹۵۰۰-۰/۹۰۳۴		R2-Adjusted R2

ns و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

بر پارامتر مربوطه می‌باشد. DPPH با افزایش زمان امواج فراصوت افزایش یافت. در حالی که بیشترین مقدار DPPH در پایین‌ترین سطوح دمایی (تقریباً ۳۵ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد) حاصل شد و با افزایش دمای امواج فراصوت، کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده گردید (شکل ۱-۱). بررسی اثر دو عامل مستقل اول و سوم بر DPPH نشان داد که با افزایش هر دو فاکتور میزان این صفت نیز روند صعودی داشت (شکل ۱-۲). بررسی توأم دو عامل زمان امواج فراصوت و نسبت حلال به ماده حل‌شونده نشان داد که زمان امواج فراصوت تقریباً ۱۵ تا ۲۷ دقیقه و نسبت حلال به ماده حل‌شونده ۱:۵ بیشترین DPPH را ظاهر کرد (شکل ۱-۳). با افزایش نسبت اتانول به آب، افزایش یافت و افزایش دمای امواج فراصوت از ۴۵ درجه سانتی‌گراد به بالاتر منجر به کاهش این صفت گردید (شکل ۱-۴). بیشترین DPPH در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و نسبت حلال به ماده حل‌شونده ۱:۵ مشاهده شد (شکل ۱-۵). در همین نسبت حلال به ماده حل‌شونده ۱:۵ با افزایش نسبت اتانول به آب درصد DPPH افزایش یافت (شکل ۱-۶). فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP نیز با افزایش زمان امواج فراصوت افزایش یافت. در حالی که بیشترین مقدار این پارامتر تقریباً در ۳۵ درجه سانتی‌گراد حاصل شد و با افزایش دمای امواج فراصوت، کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد (شکل ۲-۱). بررسی اثر دو عامل مستقل اول و سوم بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP نشان داد که با افزایش هر دو فاکتور میزان این صفت نیز روند صعودی داشت (شکل ۲-۲). بررسی توأم زمان امواج فراصوت و نسبت حلال به ماده حل‌شونده نشان داد که زمان امواج فراصوت تقریباً ۱۸ تا ۳۰ دقیقه و نسبت حلال به ماده حل‌شونده ۱:۲۵ بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به روش FRAP ظاهر کرد (شکل ۲-۳). بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP در نسبت اتانول به آب کمتر از ۳۵ و دمای امواج فراصوت کمتر از ۴۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل ۲-۴). بیشترین

اثرهای متقابل متغیرهای مستقل بر FRAP, DPPH فنول و فلاونوئید کل

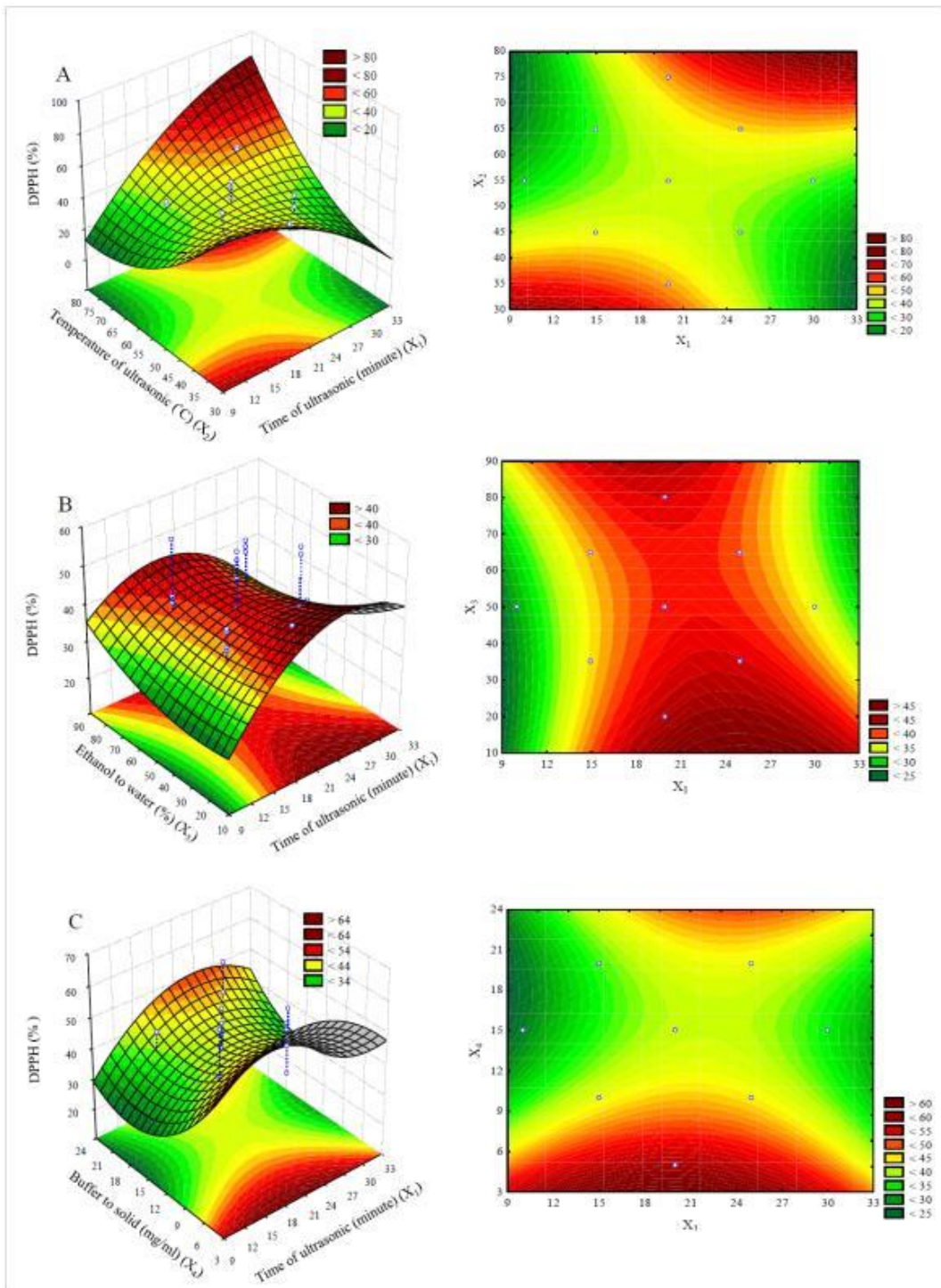
نتایج حاصل از تجزیه واریانس بیانگر تأثیر معنی‌دار زمان امواج فراصوت و نسبت حلال به ماده حل‌شونده در سطح احتمال ۱٪ بر DPPH بود. همچنین، اثرهای درجه دوم فاکتورهای X_1 , X_2 و X_4 در سطح احتمال ۱٪ بر DPPH معنی‌دار شد. از میان برهم‌کنش فاکتورهای مورد بررسی نیز اثرهای متقابل X_1X_2 , X_2X_3 و X_3X_4 در سطح احتمال ۱٪ بر DPPH معنی‌دار بود (جدول ۲). در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده به روش FRAP نیز مشخص گردید که اثر زمان امواج فراصوت، نسبت حلال به ماده حل‌شونده و اثرهای درجه دوم فاکتورهای X_1 و X_2 در سطح احتمال ۱٪ بر این ویژگی معنی‌دار بود. همچنین، برهم‌کنش تمام فاکتورهای مورد بررسی (X_1X_2 , X_1X_3 , X_1X_4 , X_2X_3 , X_2X_4 و X_3X_4) در سطح احتمال ۱٪ بر ظرفیت فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP معنی‌دار مشاهده گردید (جدول ۲). اثر نسبت اتانول به آب، نسبت حلال به ماده حل‌شونده و اثرهای درجه دوم فاکتورهای X_1 , X_3 و X_4 در سطح احتمال ۱٪ بر محتوای فنول کل معنی‌دار بود. همچنین برهم‌کنش فاکتورهای X_1X_2 , X_1X_4 و X_2X_3 نیز در سطح احتمال ۱٪ بر محتوای فنول کل معنی‌دار بود (جدول ۲). در مورد فلاونوئید کل نیز نتایج حاصل از تجزیه واریانس، بیانگر تأثیر معنی‌دار نسبت اتانول به آب، نسبت حلال به ماده حل‌شونده و اثرهای درجه دوم تمام فاکتورهای X_1 تا X_4 در سطح احتمال ۱٪ بر فلاونوئید کل بود. همچنین برهم‌کنش فاکتورهای X_1X_2 , X_1X_4 و X_2X_3 نیز در سطح احتمال ۱٪ بر محتوای فلاونوئید کل معنی‌دار بود (جدول ۲).

نمودار سه بعدی درصد DPPH در شکل ۱ نشان داده شده است. در هر شکل، اثر متقابل دو فاکتور مستقل بر روی DPPH مشخص شده است. بیشترین مقدار هر نمودار در ارتباط با بهینه اثرهای متقابل دو فاکتور مستقل

را داشت (شکل ۳-E). با افزایش نسبت اتانول به آب بالاتر از ۶۵ و نسبت حلال به ماده حل‌شونده ۱:۱۰ و ۱:۱۵ محتوای فنول کل افزایش یافت (شکل ۳-F). با افزایش زمان امواج فراصوت از ۱۰ تا ۲۵ دقیقه، فلاونوئید کل افزایش یافت و بیشترین مقدار این پارامتر در محدوده دمایی ۳۵ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد حاصل شد و با افزایش زمان و دمای امواج فراصوت کاهش یافت (شکل ۴-A). بررسی اثر دو عامل مستقل اول و سوم در ۱۸ تا ۲۴ دقیقه زمان امواج فراصوت و نسبت اتانول به آب ۵۵ تا ۷۰ بیشترین محتوای فلاونوئید کل را نشان داد (شکل ۴-B). بررسی توأم زمان امواج فراصوت و نسبت حلال به ماده حل‌شونده نشان داد که زمان امواج فراصوت تقریباً ۱۵ تا ۲۱ دقیقه و نسبت حلال به ماده حل‌شونده ۱:۱۰ و ۱:۱۵ بیشترین محتوای فلاونوئید کل را داشت (شکل ۴-C). بیشترین محتوای فلاونوئید کل در نسبت اتانول به آب بالاتر از ۵۰ و دمای امواج فراصوت کمتر از ۴۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل ۴-D). همچنین دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و نسبت حلال به ماده حل‌شونده ۱:۱۰ و ۱:۱۵ بیشترین محتوای فلاونوئید کل را داشت (شکل ۴-E). به طوری که با افزایش نسبت اتانول به آب بالاتر از ۵۰ و نسبت حلال به ماده حل‌شونده ۱:۱۰ و ۱:۱۵ محتوای فلاونوئید کل افزایش یافت (شکل ۴-F).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و نسبت حلال به ماده حل‌شونده ۱:۲۵ مشاهده شد (شکل ۲-E). به طوری که با افزایش نسبت حلال به ماده حل‌شونده ۱:۲۵ و نسبت اتانول به آب فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP افزایش یافت (شکل ۲-F).

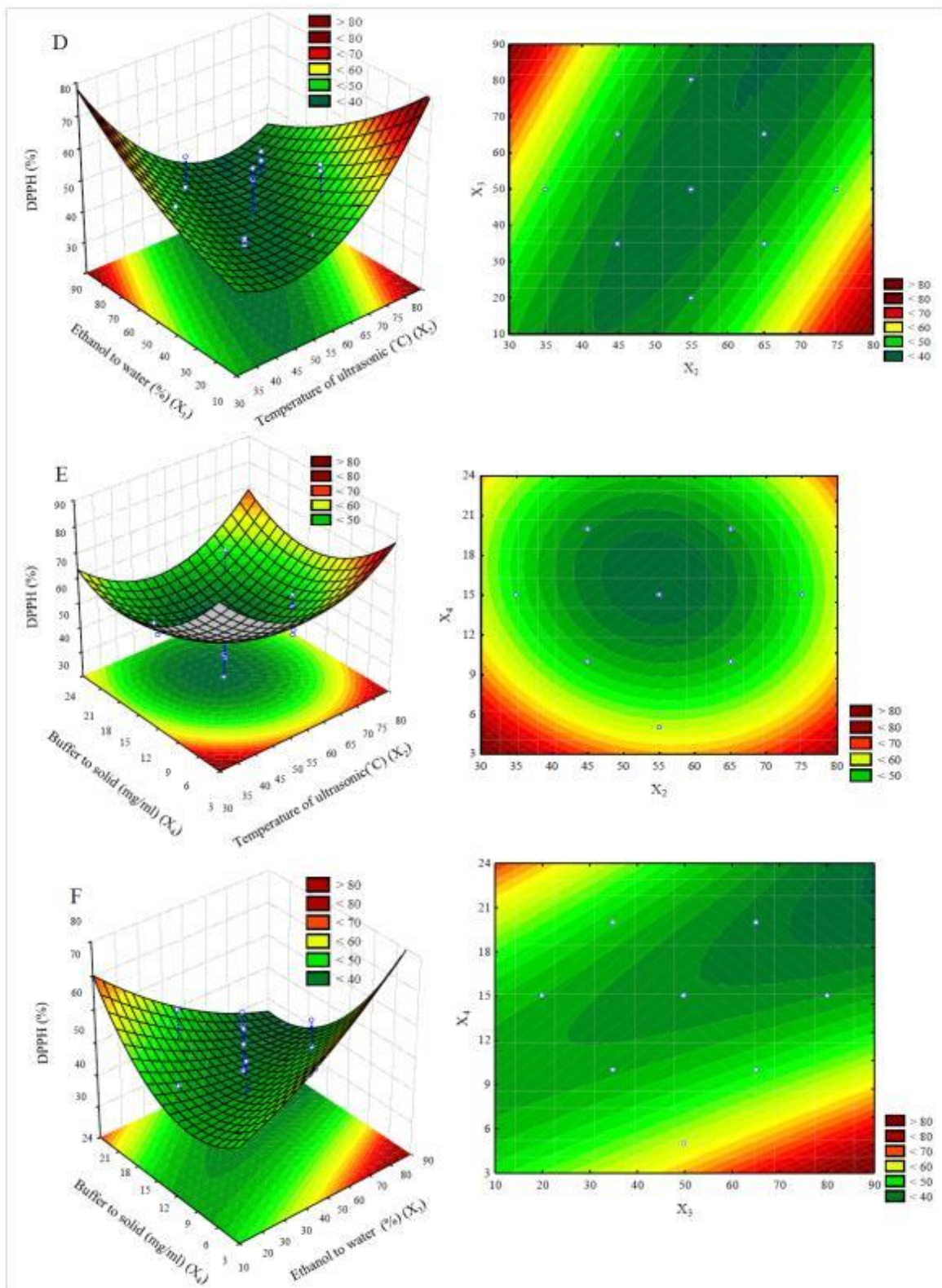
محتوای فنول کل با افزایش زمان اولتراسونیک از ۱۱ تا ۲۲ دقیقه، افزایش یافت و بیشترین مقدار این پارامتر در محدوده دمایی ۳۵ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد حاصل شد و با افزایش زمان و دمای اولتراسونیک، کاهش محتوای فنول کل مشاهده شد (شکل ۳-A). بررسی اثر دو عامل مستقل اول و سوم در ۱۶ تا ۲۳ دقیقه زمان اولتراسونیک و نسبت اتانول به آب ۵۰ تا ۷۰ بیشترین محتوای فنول کل را نشان داد (شکل ۳-B). بررسی توأم زمان اولتراسونیک و نسبت حلال به ماده حل‌شونده نیز نشان داد که زمان اولتراسونیک تقریباً ۱۷ تا ۲۰ دقیقه و نسبت حلال به ماده حل‌شونده ۱:۱۰ و ۱:۱۵ بیشترین محتوای فنول کل را ظاهر کرد (شکل ۳-C). بیشترین محتوای فنول کل در نسبت اتانول به آب بالاتر از ۵۰ و دمای اولتراسونیک کمتر از ۴۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل ۳-D). همچنین، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و نسبت حلال به ماده حل‌شونده ۱:۱۰ و ۱:۱۵ بیشترین محتوای فنول کل



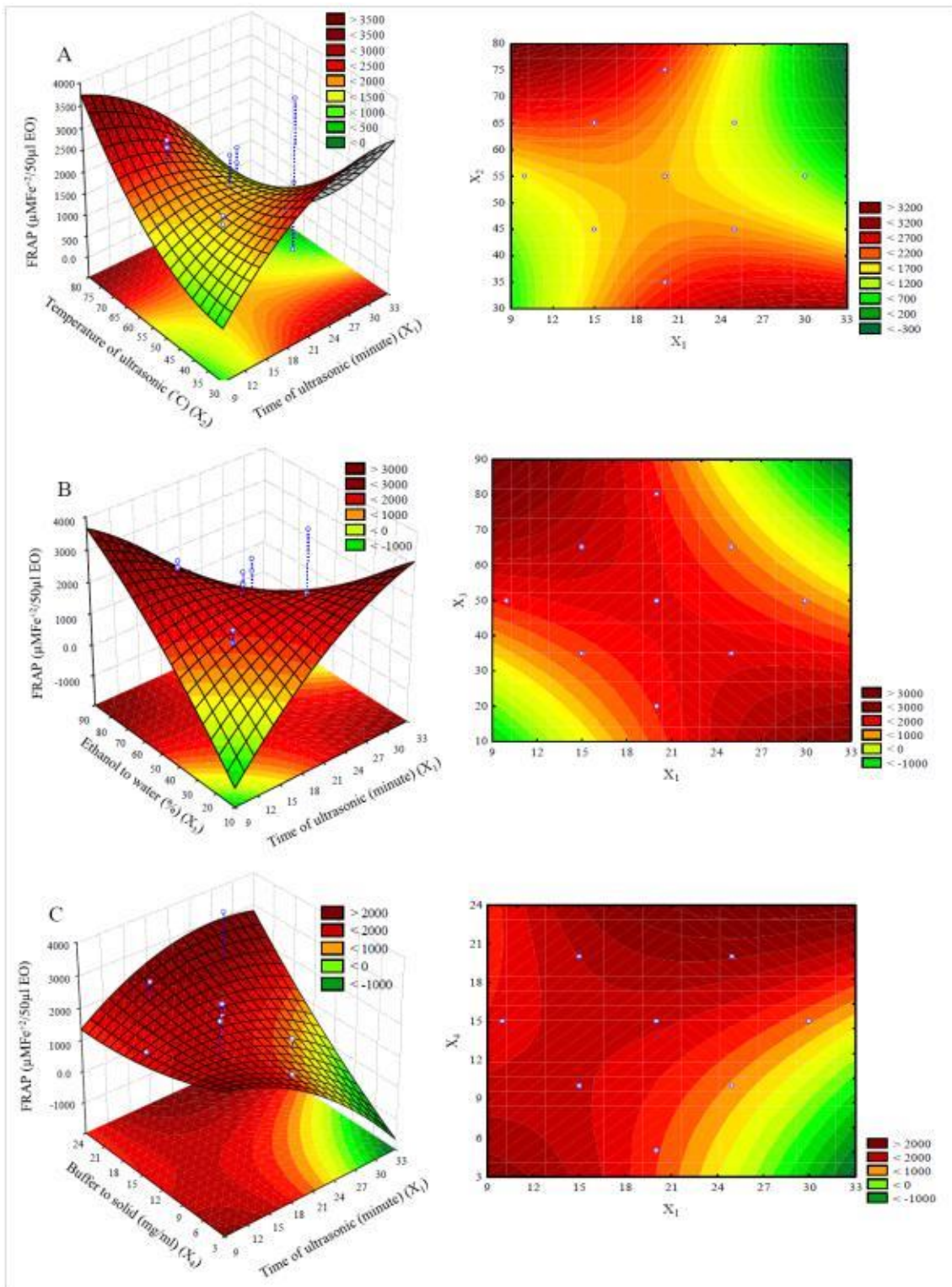
شکل ۱- اثر متقابل متغیرهای مستقل X_1 (زمان اولتراسونیک؛ دقیقه)، X_2 (دمای اولتراسونیک؛ درجه سانتی گراد)،

X_3 (نسبت اتانول به آب؛ درصد) و X_4 (نسبت ماده خشک به حلال؛ میلی گرم بر میلی لیتر) بر فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اندام هوایی

کرفس به روش DPPH



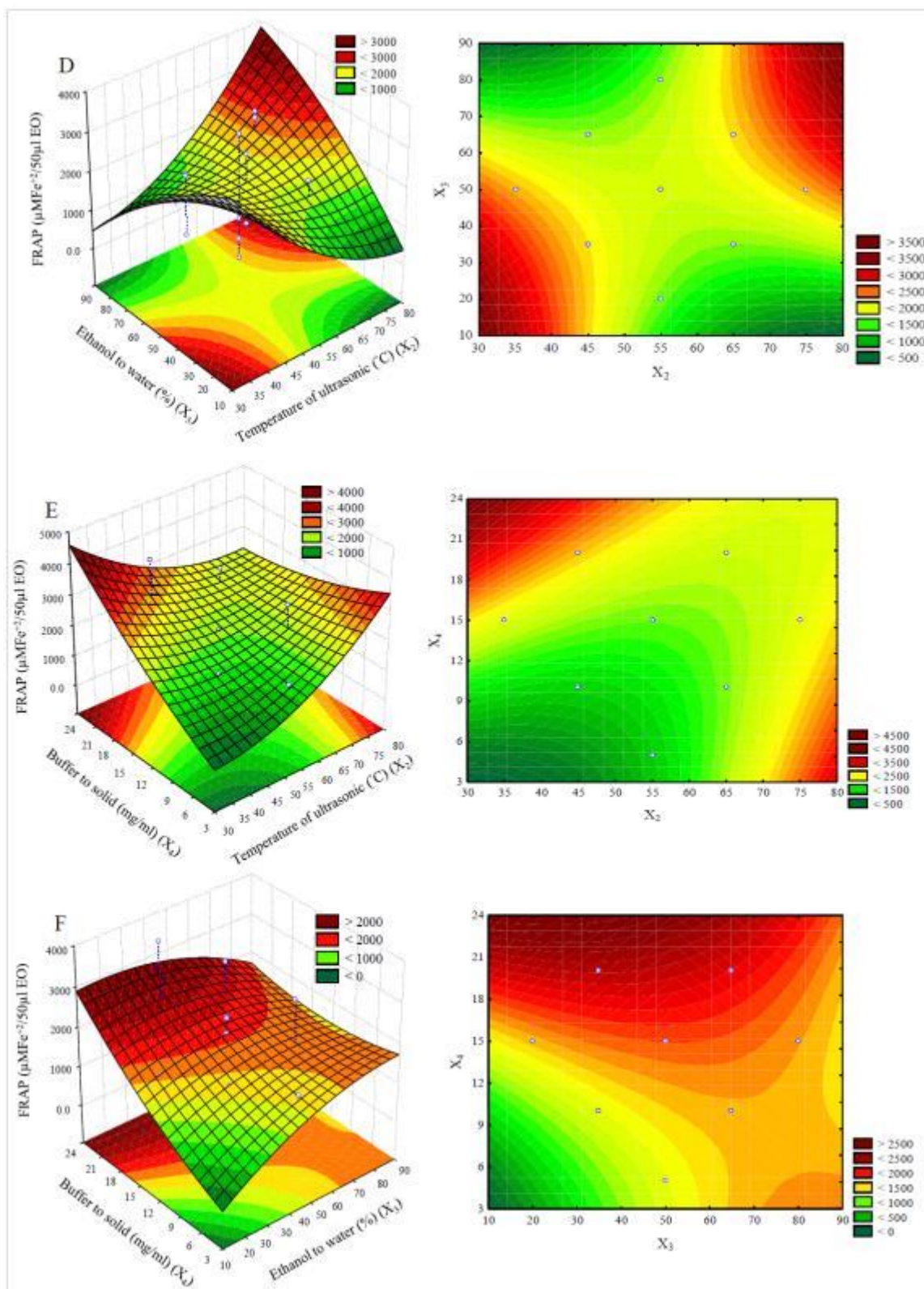
ادامه شکل ۱ - ...



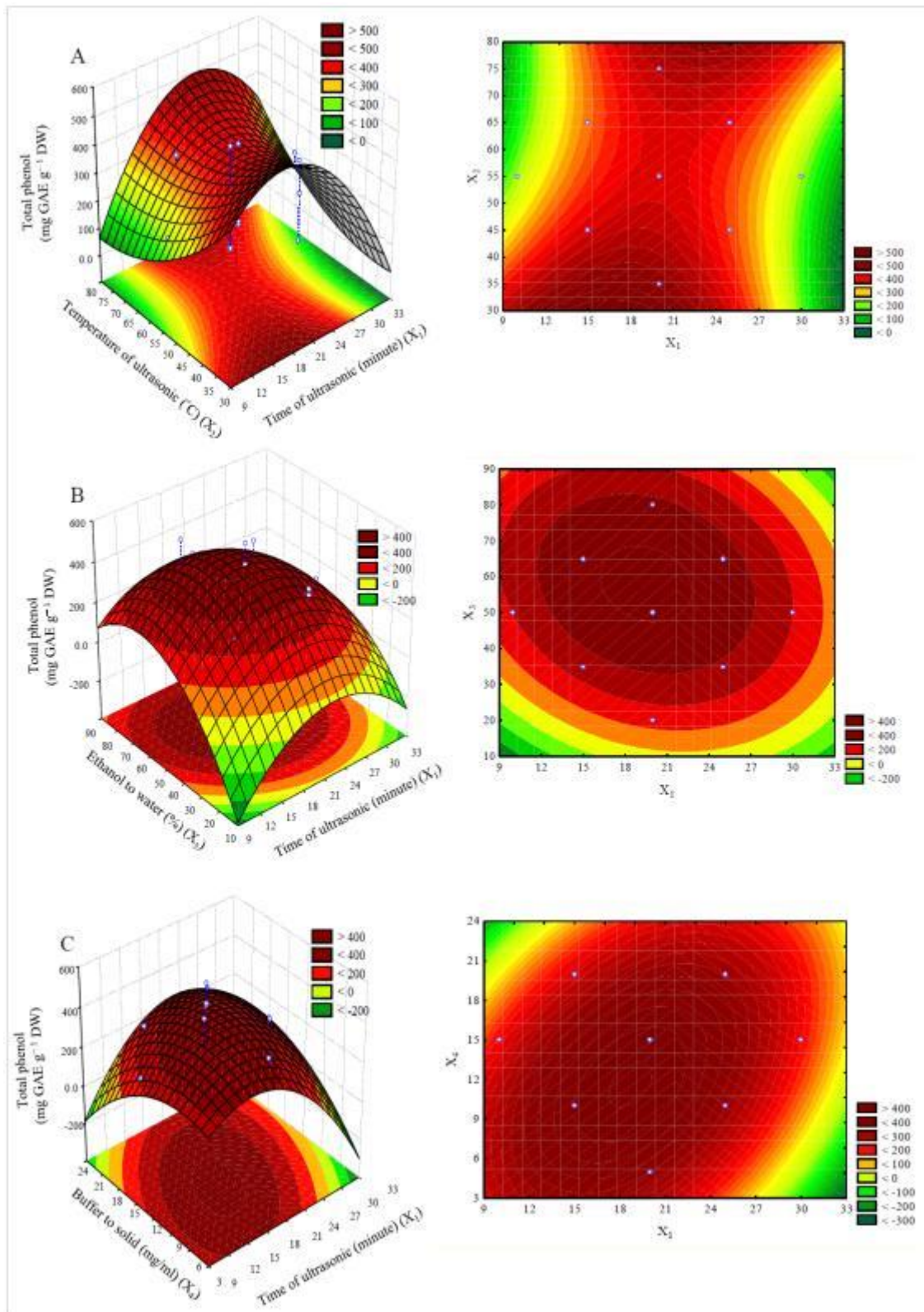
شکل ۲- اثر متقابل متغیرهای مستقل X_1 (زمان اولتراسونیک؛ دقیقه)، X_2 (دمای اولتراسونیک؛ درجه سانتی گراد)،

X_3 (نسبت اتانول به آب؛ درصد) و X_4 (نسبت ماده خشک به حلال؛ میلی گرم بر میلی لیتر) بر فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اندام هوایی

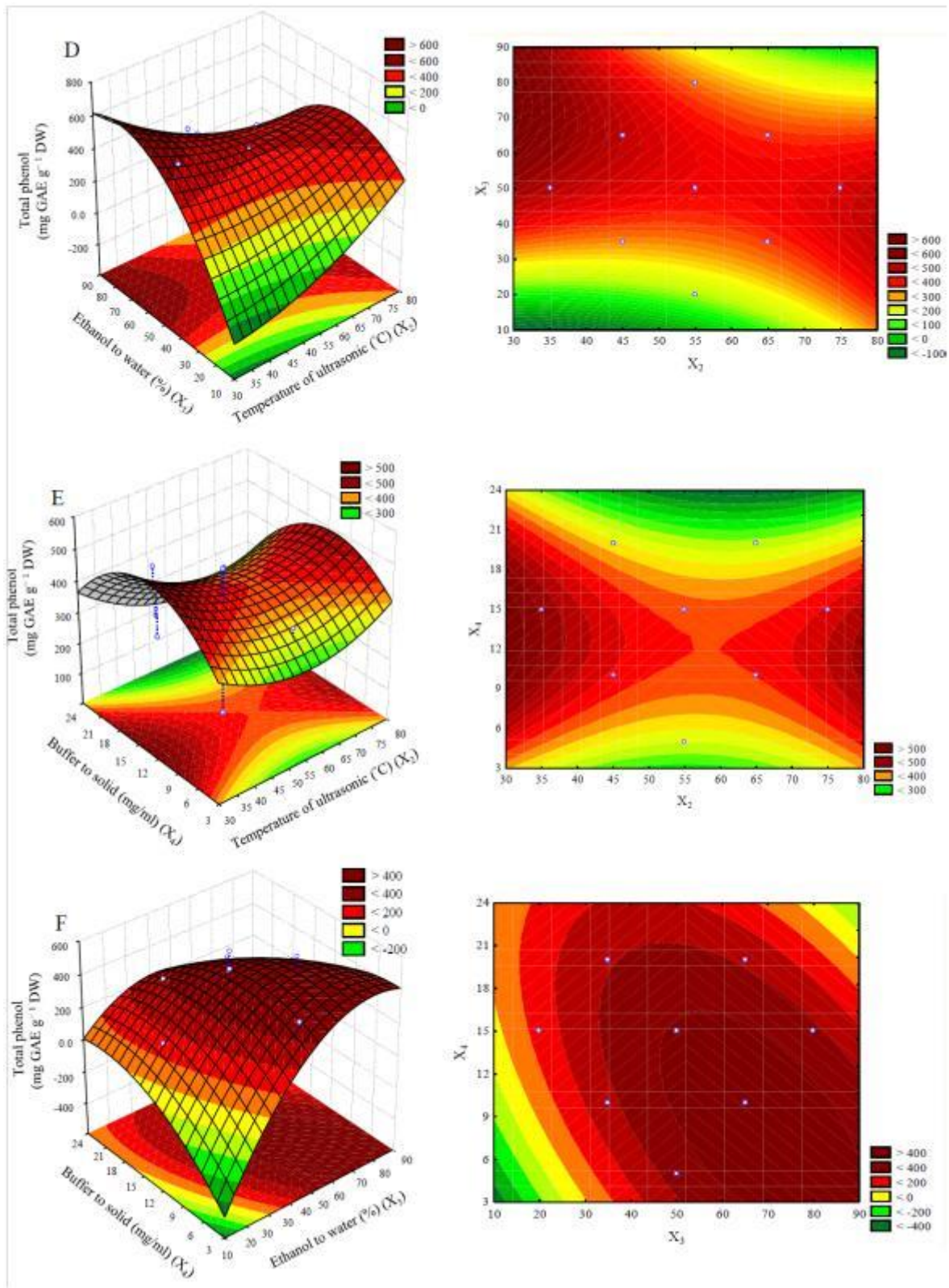
کرفس به روش FRAP



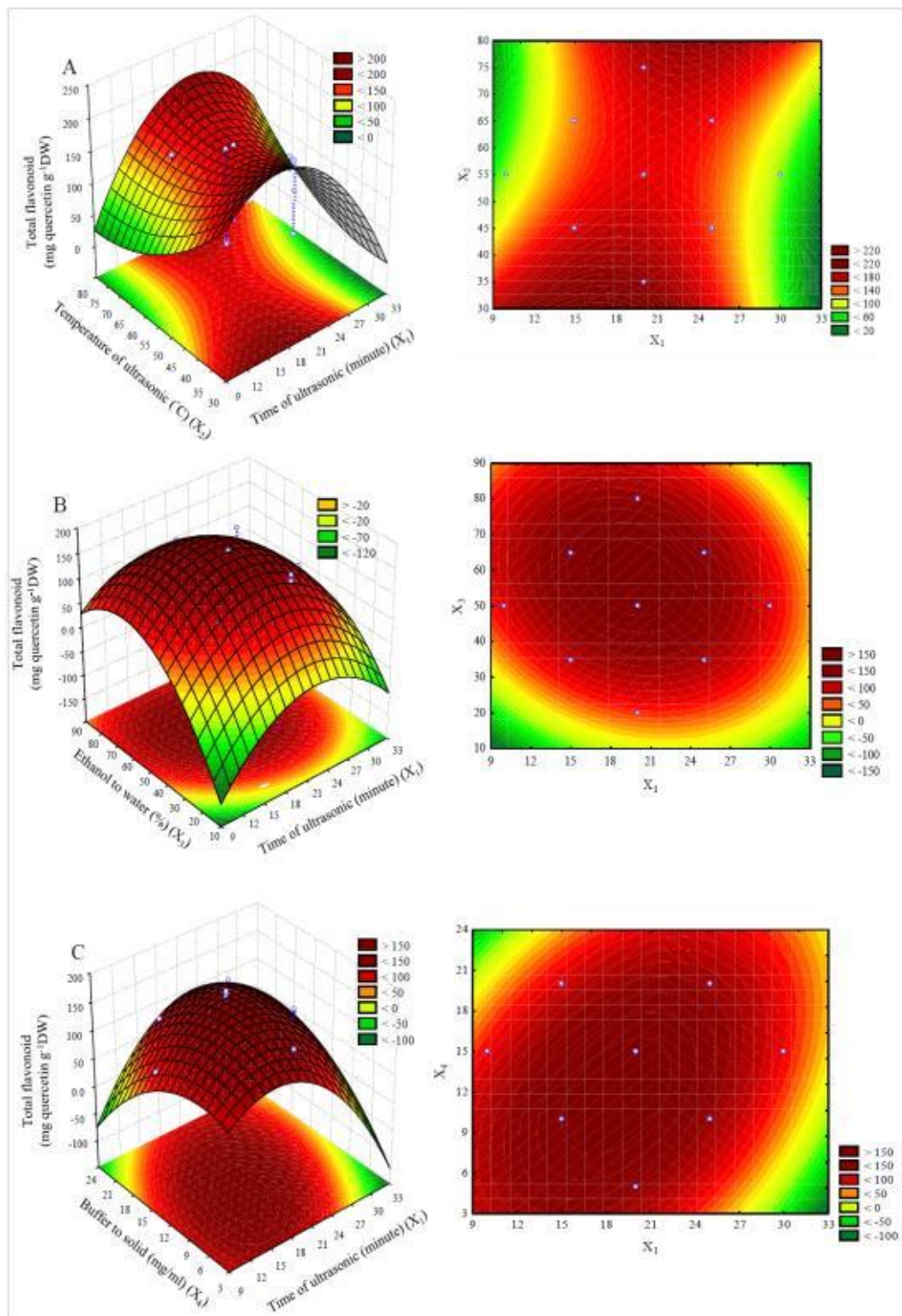
ادامه شکل ۲- ...



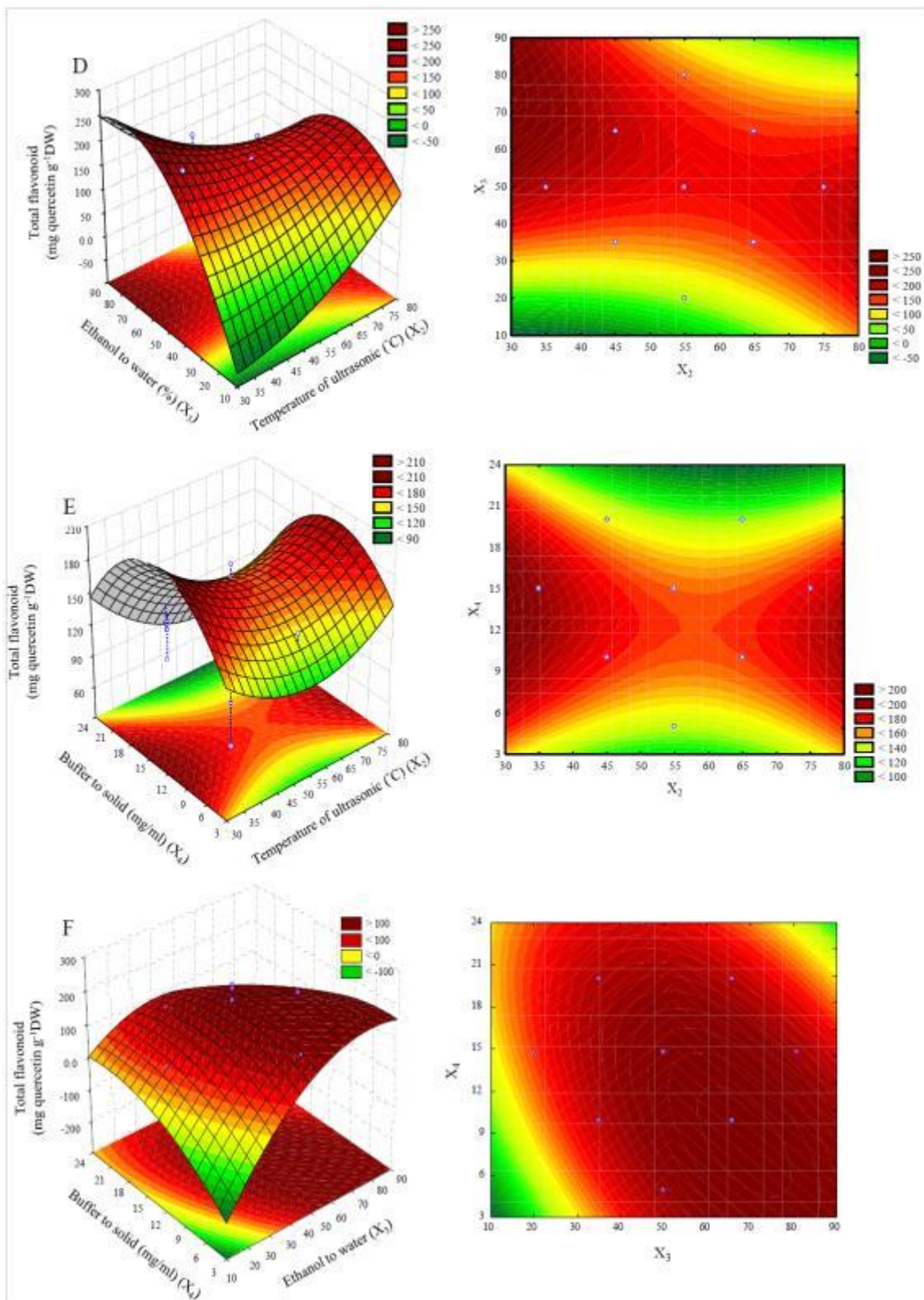
شکل ۳- اثر متقابل متغیرهای مستقل X_1 (زمان اولتراسونیک؛ دقیقه)، X_2 (دمای اولتراسونیک؛ درجه سانتی گراد)، X_3 (نسبت اتانول به آب؛ درصد) و X_4 (نسبت ماده خشک به حلال؛ میلی گرم بر میلی لیتر) بر مقدار فنول کل عصاره اندام هوایی کرفس



ادامه شکل ۳- ...



شکل ۴- اثر متقابل متغیرهای مستقل X_1 (زمان اولتراسونیک؛ دقیقه)، X_2 (دمای اولتراسونیک؛ درجه سانتی گراد)، X_3 (نسبت اتانول به آب؛ درصد) و X_4 (نسبت ماده خشک به حلال؛ میلی گرم بر میلی لیتر) بر مقدار فلاونوئید کل عصاره اندام هوایی کرفس

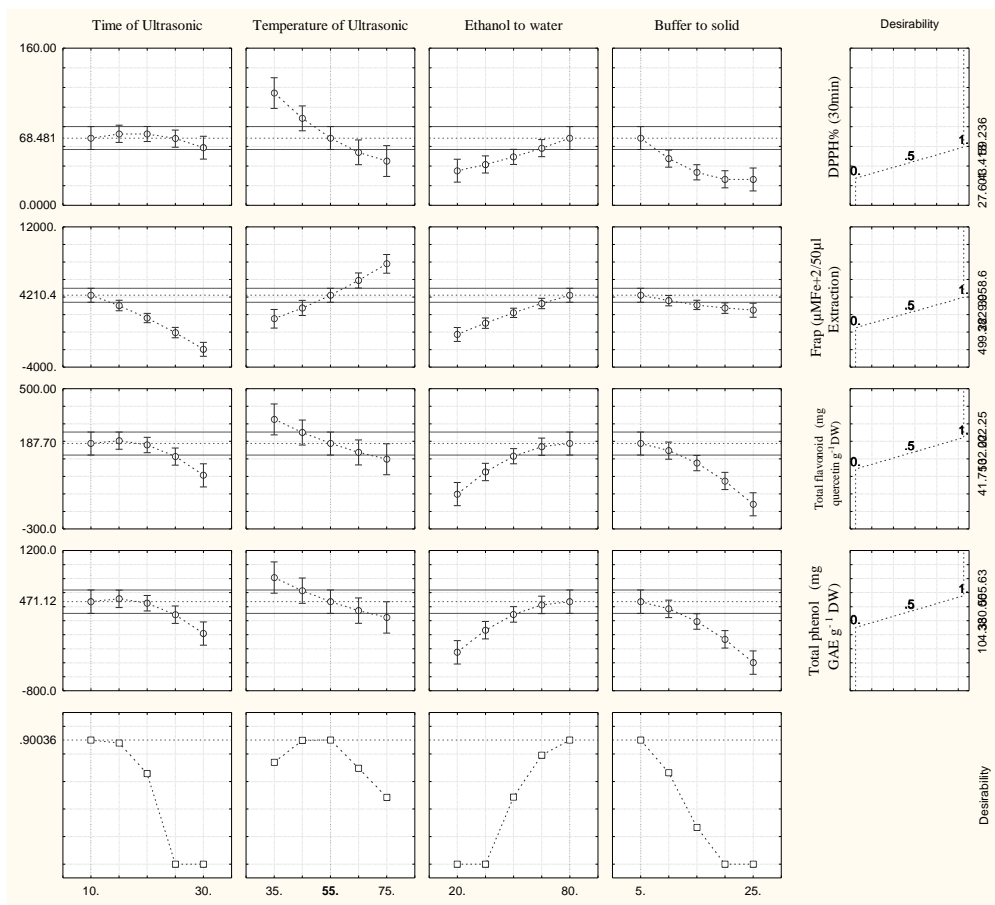


ادامه شکل ۴- ...

یک گرم ماده خشک و ۱۸۷/۷۰ میلی‌گرم کوئرستین در ۱ گرم ماده خشک و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره به روش DPPH و FRAP به ترتیب ۶۸/۴۸٪ و ۴۲۱۰/۴ میکرومولار Fe^{+2} در ۵۰ میکرولیتر عصاره بدست آمد (شکل ۵). مقادیر بالای R2 برابر با ۰/۹۵، ۰/۹۶۸، ۰/۹۵۲ و ۰/۹۵۱ برای مدل‌های سطح پاسخ (جدول ۲) نشان داد که مدل‌ها توانسته‌اند پیش‌بینی مناسبی از پاسخ‌ها داشته باشند.

بهینه‌سازی همزمان با ارزش مطلوبیت در عصاره بخش هوایی کرفس

روش سطح پاسخ نشان داد که بهترین نسبت تیمارها مربوط به اعمال امواج فراصوت ۱۰ دقیقه و دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، نسبت اتانول به آب ۸۰ و نسبت حلال به ماده حل‌شونده ۱:۵ بود. همچنین در شرایط بهینه، مقدار فنول کل و فلاونوئید کل به ترتیب ۴۷۱/۱۲ میلی‌گرم گالیک اسید در



شکل ۵- بهینه‌سازی همزمان با ارزش مطلوبیت در عصاره قسمت هوایی کرفس

زمان استخراج برای صرفه اقتصادی لازم است. در این تحقیق مقدار فنول و فلاونوئید کل با افزایش زمان امواج فراصوت تا دامنه‌ای به حداکثر مقدار رسید، ولی پس از آن کاهش یافت. از این رو به نظر می‌رسد با افزایش زمان اولتراسوند، پلی‌فنول‌ها دچار تخریب ساختمانی و تجزیه شدند، بنابراین مقدار آنها

بحث

زمان تأثیر به‌سزایی در فرایند استخراج دارد. افزایش زمان باعث برهم‌کنش بیشتر ماده حل‌شونده و حلال و در نتیجه افزایش نفوذ ترکیب‌های رنگی به داخل حلال می‌شود (Hossain et al., 2012). ولی در مقیاس‌های صنعتی کاهش

کاهش یافت (Carrera *et al.*, 2012). در مطالعات دیگر نیز بالاترین میزان استخراج ترکیب‌های فلاونوئیدی پس از گذشت ۴۵ تا ۹۰ دقیقه اعمال امواج فراصوت بدست آمده و افزایش بیش از حد زمان، منجر به کاهش بازده استخراج و تجزیه و تخریب ترکیب‌های مهم رنگی گردیده است (Huang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008). دما نیز به‌طور قابل توجهی فرایند استخراج را تحت تأثیر قرار می‌دهد و انرژی فعال‌سازی را افزایش می‌دهد (Farizadeh *et al.*, 2009). در این مطالعه، افزایش دمای امواج فراصوت به بالاتر از ۴۵ درجه سانتی‌گراد نیز منجر به کاهش استخراج فنول‌ها و فلاونوئیدها گردید. نتایج برخی مطالعات نشان داده است که افزایش دما ممکن است باعث کاهش استخراج و نامحلول شدن ترکیب‌های رنگی در حلال و همچنین تخریب و تجزیه ترکیب‌های رنگی گردد (Oancea *et al.*, 2012). درصد استخراج ترکیب‌های رنگی مانند فلاونوئیدها و تانن‌ها تنها به دما وابسته نیست و میزان حل شدن آنها به عوامل دیگری جز دما نیز بستگی دارد (Yang *et al.*, 2013). از جمله عوامل تأثیرگذار دیگر بر فرایند استخراج با امواج فراصوت، قطبیت حلال و دیگری حجم حلال مصرفی است. تأثیرگذاری این عوامل به اندازه انتخاب روش مناسب برای استخراج، مهم است (Gupta *et al.*, 2012). در این تحقیق نسبت اتانول به آب بالاتر از ۵۰ منجر به افزایش میزان استخراج فنول و فلاونوئید کل شد. به طوری که در آخرین سطح نسبت اتانول به آب (۸۰) بیشترین پلی‌فنول‌ها دیده شد. استفاده از اتانول با توجه به وجود ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی در عصاره کرفس و نوع قطبیت‌شان، حلال مناسبی برای استخراج مواد رنگی مؤثر در آن است. گاهی ترکیب حلال‌ها اثرهای بهتری بر روی استخراج ترکیب‌های فعال موجود در گیاهان دارد. آب یکی از حلال‌های مناسب برای این منظور است (Gupta *et al.*, 2012). آب ماده‌ای غیرقابل اشتعال، غیرسمی، در دسترس، ارزان و سازگار با محیط‌زیست است و در ترکیب با هر حلال دیگری در فرایندهای استخراج کاربرد دارد (Do *et al.*, 2014). گزارش شده است که ترکیبات فلاونوئیدی در حلال آب و اتانول بهتر استخراج می‌شوند (Amyrgialaki *et al.*, 2014). از سویی، آب به‌عنوان متورم‌کننده بافت گیاهی عمل کرده، در حالی که اتانول شکننده پیوند مواد محلول و ماتریکس گیاهیست (Sahin & Şamlı, 2013). علاوه بر این، آب دارای ثابت الکتریک بالایی است که با غلظت‌های مختلف اتانول منجر به قطبیت متفاوت می‌گردد (Spigno & de Faveri, 2009). بنابراین، ممکن است این امر مرتبط به قطبیت حلال و حل شدن پلی‌فنول‌های کرفس باشد که نتایج این آزمایش با نتایج استخراج ترکیب‌های فنولیک از گیاه گرده لیو (*Epimedium brevicornum*) به کمک اولتراسوند با بکارگیری روش سطح پاسخ، همخوانی داشت (Zhao *et al.*, 2014). به‌طور کلی با افزایش میزان ماده حل‌شونده، حلال وارد مقدار زیادتری از بافت‌های گیاهی شده و ترکیب‌های بیشتری را در داخل خود کشانده، در نتیجه حجم بالاتری از مقدار ترکیب‌ها خارج می‌شود (Maran *et al.*, 2013). در نسبت حلال به ماده حل‌شونده ۱:۱۰ و ۱:۱۵ بیشترین مقادیر فنول و فلاونوئید کل مشاهده گردید. این رخداد ممکن است به دلیل اصل انتقال جرم و توزیع چگالی انرژی فراصوت در مواد حل شده عصاره باشد. در نسبت‌های پایین حلال به ماده حل‌شونده، شیب غلظت بالاتر است که منجر به انتشار و استخراج بیشتر ترکیب‌ها می‌گردد (Zeng & Ge, 2013). فنول‌ها و پلی‌فنول‌های طبیعی در گیاهان یافت می‌شوند. پلی‌فنول‌ها شامل فنولیک اسیدها و فلاونوئیدها هستند. فنولیک اسیدها و فلاونوئیدها، گروه‌های اصلی فیتوشیمیایی گیاهی بوده و فعالیت پاکسازی رادیکال‌های سوپراکسید را بر عهده دارند، بنابراین ضدسرطان هستند (Ilghami *et al.*, 2015; Ghasemzadeh *et al.*, 2012). برگ‌ها و ساقه کرفس حاوی ترکیب‌های فنولیک هستند (Kooti *et al.*, 2014). اثرهای آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی عصاره‌های گیاهی، به‌طور مستقیم با ترکیب‌های فیتوشیمیایی و متابولیت‌های ثانویه عصاره مرتبط هستند (Shabbir *et al.*, 2013). در این تحقیق بیشترین مقادیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده توسط دو روش DPPH و FRAP مربوط به نمونه‌های آزمایشی با محتوای فنول و فلاونوئید کل بیشتر بود.

کاهش یافت (Carrera *et al.*, 2012). در مطالعات دیگر نیز بالاترین میزان استخراج ترکیب‌های فلاونوئیدی پس از گذشت ۴۵ تا ۹۰ دقیقه اعمال امواج فراصوت بدست آمده و افزایش بیش از حد زمان، منجر به کاهش بازده استخراج و تجزیه و تخریب ترکیب‌های مهم رنگی گردیده است (Huang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008). دما نیز به‌طور قابل توجهی فرایند استخراج را تحت تأثیر قرار می‌دهد و انرژی فعال‌سازی را افزایش می‌دهد (Farizadeh *et al.*, 2009). در این مطالعه، افزایش دمای امواج فراصوت به بالاتر از ۴۵ درجه سانتی‌گراد نیز منجر به کاهش استخراج فنول‌ها و فلاونوئیدها گردید. نتایج برخی مطالعات نشان داده است که افزایش دما ممکن است باعث کاهش استخراج و نامحلول شدن ترکیب‌های رنگی در حلال و همچنین تخریب و تجزیه ترکیب‌های رنگی گردد (Oancea *et al.*, 2012). درصد استخراج ترکیب‌های رنگی مانند فلاونوئیدها و تانن‌ها تنها به دما وابسته نیست و میزان حل شدن آنها به عوامل دیگری جز دما نیز بستگی دارد (Yang *et al.*, 2013). از جمله عوامل تأثیرگذار دیگر بر فرایند استخراج با امواج فراصوت، قطبیت حلال و دیگری حجم حلال مصرفی است. تأثیرگذاری این عوامل به اندازه انتخاب روش مناسب برای استخراج، مهم است (Gupta *et al.*, 2012). در این تحقیق نسبت اتانول به آب بالاتر از ۵۰ منجر به افزایش میزان استخراج فنول و فلاونوئید کل شد. به طوری که در آخرین سطح نسبت اتانول به آب (۸۰) بیشترین پلی‌فنول‌ها دیده شد. استفاده از اتانول با توجه به وجود ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی در عصاره کرفس و نوع قطبیت‌شان، حلال مناسبی برای استخراج مواد رنگی مؤثر در آن است. گاهی ترکیب حلال‌ها اثرهای بهتری بر روی استخراج ترکیب‌های فعال موجود در گیاهان دارد. آب یکی از حلال‌های مناسب برای این منظور است (Gupta *et al.*, 2012). آب ماده‌ای غیرقابل اشتعال، غیرسمی، در دسترس، ارزان و سازگار با محیط‌زیست است و در ترکیب با هر حلال دیگری در فرایندهای استخراج کاربرد دارد (Do *et al.*, 2014). گزارش شده است که ترکیبات فلاونوئیدی در حلال آب و اتانول بهتر استخراج می‌شوند (Amyrgialaki *et al.*, 2014).

یافته‌های عصاره تهیه شده از زردچوبه هندی (*Murraya koenigii* L.) به کمک اولتراسوند و بهینه‌سازی ترکیب‌های فلاونوئیدی و فعالیت دارویی آن از طریق روش سطح پاسخ، هماهنگ با این تحقیق بود (Ghasemzadeh et al., 2014). بازده بالاتر استخراج امواج فراصوت نسبت به روش‌های متداول می‌تواند به دلیل ایجاد حفره و حباب‌های کوچک در محلول توسط امواج فراصوت و افزایش موضعی و لحظه‌ای حرارت و فشار باشد که نقش مهمی را در فرایند استخراج ایفاء می‌کنند، به طوری که نفوذ حلال به داخل بافت‌های گیاهی را آسان‌تر کرده و خروج ترکیب‌ها از گیاه را به داخل محلول سرعت بخشیده و زمان استخراج را کاهش می‌دهد (Chavan & Singhal, 2013). در بهینه‌سازی استخراج روغن از دانه انار، بیشترین درصد روغن (۲۵/۱۱٪) با بکارگیری اتر نفت در شرایط بهینه با توان فراصوت، دما و زمان استخراج و نسبت حلال به وزن بذر به ترتیب ۱۴۰ وات، ۴۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۶ دقیقه و ۱۰ میلی‌لیتر در گرم بدست آمد (Tian et al., 2013). در پژوهشی، روی عصاره بدست‌آمده به کمک اولتراسوند از برگ‌های ریحان (*Ocimum tenuiflorum*) برای استخراج ترکیب‌های فنولیک و فلاونوئیدی آن با بکارگیری روش سطح پاسخ، بهینه‌سازی انجام شد. براساس نتایج، بهترین نسبت تیمارها مربوط به اتانول ۵۵/۳۴٪، زمان سونیکیشن ۱۱/۷۱ دقیقه و چگالی انرژی اولتراسوند $0/26W/cm^3$ بود. در شرایط بهینه، مقادیر همبستگی برای محتوای فنول کل ۹/۴۱ میلی‌گرم برابر گالیک اسید و محتوای فلاونوئید کل ۶/۶۹ میلی‌گرم برابر کوئرستین گزارش شد. عصاره‌های تهیه شده به کمک اولتراسوند نتایج بهتری از فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در شرایط *in vitro* و پایداری اکسیداتیو حرارتی نسبت به روش مرسوم تهیه عصاره‌ها با حلال نشان دادند (Upadhyay et al., 2015). انجام بهینه‌سازی عصاره بدست‌آمده به کمک اولتراسوند از برگ‌های *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz و ظرفیت پاکسازی رادیکال‌های آزاد فنول‌ها و فلاونوئیدها نشان داد که بهترین نسبت تیمارها برای دستیابی به بیشترین مقدار

فنول (۱۶/۸ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم) در شرایط بهینه عبارت است از: ۶۷/۷٪ اتانول، ۸۲/۹۴ دقیقه زمان امواج فراصوت و ۶۳ درجه سانتی‌گراد دمای امواج فراصوت. همچنین، بهترین نسبت تیمارها برای دستیابی به بیشترین مقدار فلاونوئید (۴۹/۳ میلی‌گرم روتین در وزن خشک) در شرایط بهینه، ۴۸/۸٪ اتانول، ۸۵/۱ دقیقه زمان امواج فراصوت و ۶۳/۹ درجه سانتی‌گراد دمای امواج فراصوت گزارش شده است. برای دستیابی به بیشترین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۸۶/۸٪) در شرایط بهینه نیز کاربرد ۵۰/۶٪ اتانول، ۸۱/۳ دقیقه زمان امواج فراصوت و ۶۳/۴ درجه سانتی‌گراد دمای امواج فراصوت بهترین نسبت تیمارها بودند. این تحقیق، شرایط استخراج بهینه ترکیب‌های فنولیک از *C. cyrtophyllum* را به عنوان منبع بالقوه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ارائه می‌دهد (Zhou et al., 2013). در بهینه‌سازی عصاره بدست‌آمده به کمک اولتراسوند از برگ‌های استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni*)، حداکثر بازده گلیکوزیدها، ترکیب‌های فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استویا حاصل شد. همچنین، بهینه‌سازی استخراج ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره از گیاه مرزنجوش بستانی (*Origanum majorana* L.) به کمک امواج فراصوت با بکارگیری روش سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت و بهترین ترکیب تیماری برای دستیابی به حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش TP و بالاترین مقادیر رزمارینیک اسید، لوتولین-۷-۰-گلوکزید، آپیجین-۷-۰-گلوکزید، کافئیک اسید و کارنوسول، میدان نوسان سونیکیشن در $61\mu m$ ، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۵ دقیقه بود. مقادیر پیش‌بینی شده از رابطه چند جمله‌ای با مقادیر بدست‌آمده از این آزمایش، همخوانی داشت. عملکرد عصاره‌های بهینه حاصل از بکارگیری امواج فراصوت به طور قابل توجه بیشتر از روش عصاره‌های مایع/جامد (solid/liquid extracts) بود. مدل‌های پیش‌بینی شده برای تمام صفات مناسب و دارای ضرایب رگرسیونی بالا بودند (Hossain et al., 2012).

منابع مورد استفاده

- assisted extraction of flavonoid compounds and their pharmaceutical activity from curry leaf (*Murraya koenigii* L.) using response surface methodology. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1): 1-10.
- Gupta, A., Naranawal, M. and Kothari, V., 2012. Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International Journal of Applied and Natural Science*, 1: 8-26.
 - Hossain, M.B., Brunton, N.P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C.P., Martin-Diana, A.B. and 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.
 - Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z. and Wang, J., 2009. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro. *Food Chemistry*, 114(3): 1147-1154.
 - Ilghami, A., Ghanbarzadeh, S. and Hamishehkar, H., 2015. Optimization of the ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, ferric reducing activity and antioxidant activity of the *Beta vulgaris* using response surface methodology. *Pharmaceutical Sciences*, 21(1): 46-50.
 - Kirby, A.J. and Schmidt, R.J., 1997. The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs. *Journal of Ethnopharmacology*, 56(2): 103-108.
 - Kooti, W. and Daraei, N., 2017. A review of the antioxidant activity of celery (*Apium graveolens* L.). *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 22(4): 1029-1034.
 - Kooti, W., Ali-Akbari, S., Asadi-Samani, M., Ghadery, H. and Ashtary-Larky, D., 2014. A review on medicinal plant of *Apium graveolens*. *Advanced Herbal Medicine*, 1(1): 48-59.
 - Maran, J.P. Manikandan, S. and Mekala, V., 2013. Modeling and optimization of betalain extraction from *Opuntia ficus-indica* using Box-Behnken design with desirability function. *Industrial Crops and Products*, 49: 304-311.
 - Oancea, S., Stoia, M. and Coman, D., 2012. Effect of extraction conditions on bioactive anthocyanin content of *Vaccinium corymbosum* in the perspective of food applications. *Procedia Engineering*, 42: 489-495.
 - Şahin, S. and Şaml, R., 2013. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1): 595-602.
 - Amyrgialaki, E., Makris, D.P., Mauromoustakos, A. and Kefalas, P., 2014. Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 59: 216-222.
 - Araujo, P.W. and Brereton, R.G., 1996. Experimental design I. Screening. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 15(1): 26-31.
 - Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 15: 239(1): 70-76.
 - Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S. and Escalera, L.A., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5): 965-977.
 - Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M. and Barroso, C.G., 2012. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732: 100-104.
 - Chavan, Y. and Singhal, R.S., 2013. Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu* L.) and optimization study using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17: 106-113.
 - Chen, W., Wang, W.P., Zhang, H.S. and Huang, Q., 2012. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 87(1): 614-619.
 - Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadi, S. and Ju, Y.H., 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3): 296-302.
 - Farizadeh, K., Montazer, M., Yazdanshenas, M.E., Rashidi, A. and Malek, R.M.A., 2009. Extraction, identification and sorption studies of dyes from madder on wool. *Journal of Applied Polymer Science*, 113(6): 3799-3808.
 - Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z. and Karimi, E., 2012. Involvement of salicylic acid on antioxidant and anticancer properties, anthocyanin production and chalcone synthase activity in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) varieties. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11): 14828-14844.
 - Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z., Karimi, E. and Rahmat, A., 2014. Optimization of ultrasound-

- and phenolic compounds from *Ocimum tenuiflorum* leaves. Food Science and Biotechnology, 24(6): 1951-1958.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y. and Li, X., 2008. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. Food Chemistry, 106: 804-810.
 - Wang, L. and Weller, C.L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science and Technology, 17(6): 300-312.
 - Yang, Y.C., Wei, M.C., Huang, T.C., Lee, S.Z. and Lin, S.S., 2013. Comparison of modified ultrasound-assisted and traditional extraction methods for the extraction of baicalin and baicalein from Radix Scutellariae. Industrial Crops and Products, 45: 182-190.
 - Yaniv, Z., 2005. Handbook of Medicinal Plant. New York, London & Oxford: Food Product, Haworth Medical & Imprints of the Haworth Press, 365p.
 - Zeng, Z.L., Xi, G.X. and Ge, X.H., 2013. Study on comparison of two extraction methods of polysaccharide from *Momordica charantia* L. vines. Science and Technology of Food Industry, 34: 285-308.
 - Zhao, Y., Hou, Y., Tang, G., Cai, E., Liu, S., Yang, H. and Wang, S., 2014. Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Epimedium brevicornum* maxim using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activities in vitro. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2014: 7p.
 - Zhou, J., Zheng, X., Yang, Q., Liang, Z., Li, D., Yang, X. and Xu, J., 2013. Optimization of ultrasonic-assisted extraction and radical-scavenging capacity of phenols and flavonoids from *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz leaves. PLOS One, 8(7): 1-8.
 - Zou, T.B., Wang, M., Gan, R.Y. and Ling, W.H., 2011. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from mulberry, using response surface methodology. International Journal of Molecular Sciences, 12: 3006-3017.
 - Shabbir, M., Khan, M.R. and Saeed, N., 2013. Assessment of phytochemicals, antioxidant, anti-lipid peroxidation and anti-hemolytic activity of extract and various fractions of *Maytenus royleanus* leave. BMC Complementary and Alternative Medicine, 13(143): 13p.
 - Shin, Y., Liu, R.H., Nock, J.F., Holliday, D. and Watkins, C.B., 2007. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. Postharvest Biology and Technology, 45(3): 349-357.
 - Shotipruk, A., Kaufman, B. and Wang, Y., 2001. Feasibility study of repeated harvesting of menthol from biologically viable menthe x piperata using ultrasonic extraction. Biotechnology Progress, 17(5): 924-928.
 - Slinkard, K. and Singleton, V.L., 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28(1): 49-55.
 - Sowbhagya, H.B., 2014. Chemistry, technology, and nutraceutical functions of Celery (*Apium graveolens* L.): An overview. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 54: 389-398.
 - Spigno, G. and De Faveri, D.M., 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. Journal of Food Engineering, 93(2): 210-217.
 - Swami, H.S., Singh, K.S.P., Gennaro, L. and Dev Dutt, R., 2008. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre for Science and High Technology Press, 260p.
 - Tavakoli Saberi, M.R. and Sedaghat, M.R., 2005. Medicinal Plants. (Translation). Golshan Publishing House, Tehran, 264p.
 - Tian, Y., Xu, Z., Zheng, B. and Lo, Y.M., 2013. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. Ultrasonics Sonochemistry, 20(1): 202-208.
 - Upadhyay, R., Nachiappan, G. and Mishra, H.N., 2015. Ultrasound-assisted extraction of flavonoids

Application of response surface methodology to optimize celery (*Apium graveolens* L.) aerial part extraction and its phenolic compounds and antioxidant activity using ultrasound-assisted

F. Salimi^{1*}, M. Fattahi² and J. Hamzei³

1*- Corresponding author, Horticulture Department, Urmia University, Urmia, Iran, E-mail: fatemesalimi18@yahoo.com

2- Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

3- Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Received: December 2018

Revised: April 2019

Accepted: June 2019

Abstract

In this research, the effect of time (10, 15, 20, 25 and 30 min) and temperature (35, 45, 55, 65 and 75 °C) of ultrasonic waves, ethanol to water ratio (20, 35, 50, 65 and 80%) of extracting solvent and dry matter to solvent ratio (1:5, 1:10, 1:15, 1:20 and 1:25 mg/ml) was investigated on total phenol and flavonoids and antioxidant capacity (in two methods of DPPH and FRAP) of hydroalcoholic extract of celery (*Apium graveolens* L.) aerial parts by using the response surface method. Based on the results, ultrasound for 10 min at 55 °C, ethanol to water ratio of 80%, and dry matter to solvent ratio of 1:5 were considered as the best treatment. The highest amount of total phenol (471.1 mg GAE/g DW) and flavonoid (187.7 mg quercetin/g DW) content, and antioxidant activity of the extract was obtained under optimized conditions using DPPH (68.5%) and FRAP (4210.4 μM Fe⁺²/50 μl extract). In general, the high values of adjusted R² and *P*-value in fitting models indicated that the drawn models of response surface were ideal. In other words, the high amounts of these parameters indicate the existence of a correlation between the observed values and the predicted ones.

Keywords: Ultrasound, response surface methodology, extract, antioxidant activity, flavonoid, phenol, medicinal plants.