

مقاله تحقیقاتی

بهینه سازی استخراج ترکیبات فنل و فلاونوئید از گیاه پرسیاوشان به کمک امواج فراصوت

سعید خدادوست*، فاطمه احمدوندی، فاطمه زراعت پیشه

گروه شیمی دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء (ص) بهبهان، بهبهان، ایران

چکیده	اطلاعات مقاله
<p>مقدمه: آنتی اکسیدان ها مولکول هایی هستند که می توانند رادیکال های آزاد واکنش گر را مهار کنند و از اکسیداسیون مولکول های دیگر جلوگیری نمایند. باتوجه به اثرات نامطلوب آنتی اکسیدان های سنتزی استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی در سال های اخیر اهمیت یافته است. متابولیسم ثانویه گیاهان منبع غنی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی هستند که از مهم ترین آنتی اکسیدان های طبیعی به شمار می آیند. هدف: در این پژوهش آزمایشگاهی بهینه سازی فرایند استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از گیاه پرسیاوشان (<i>Adiantum capillus-veneris</i> L.) به کمک امواج فراصوت از طریق آزمون سطوح پاسخ انجام شد. روش بررسی: در بهینه سازی فرایند استخراج از طرح مرکب مرکزی با چهار متغیر مستقل شامل مقدار پودر گیاه (۰/۹ - ۰/۱ g) و مقدار حلال (۵ - ۱۷ ml)، دما (۲۰ - ۶۰ °C) و زمان (۵ - ۲۵ min) در ۵ سطح شامل ۲۶ آزمون با ۲ تکرار در نقطه مرکزی استفاده شد. اندازه گیری محتوای کل فنل و فلاونوئید به ترتیب با استفاده از روش فولین-سیوکالتو و کلرید آلومینیم انجام شد. نتایج: در شرایط بهینه، مقادیر متغیرها به صورت مقدار گیاه پودر شده (۰/۷ g)، حجم حلال (۱۶ ml)، مدت زمان امواج فراصوت (۲۰ min) دقیق و دمای حمام امواج فراصوت (۴۰ °C) تنظیم شد. نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد که مدل ریاضی درجه دوم با دقت بالایی به منظور پیش بینی مقادیر بهینه پارامترهای مورد مطالعه عمل کرده است. تحت این شرایط میزان بازده استخراج برای ترکیبات فنل کل و فلاونوئید به ترتیب ۹/۴۶ mg/g و ۵/۲۲ mg/g به دست آمد.</p>	<p>گل واژگان: فراصوت طرح مرکب مرکزی فنل فلاونوئید استخراج بهینه سازی گیاه پرسیاوشان</p>

۱. مقدمه

طول سالیان اخیر علاقه ویژه ای به پذیرش درمان های طبیعی

در کشورهای در حال توسعه و پیشرفته ایجاد شده است. برآورده شده است که حدود ۲۵ درصد از ترکیبات داروهای جدید به طور مستقیم و غیرمستقیم از گیاهان و دیگر اجزاء

استفاده از گیاهان دارویی به عنوان دارو قدیمی ترین نوع مراقبت های بهداشتی شناخته شده بشریت است و در تمام فرهنگ ها در طول تاریخ مورد استفاده قرار گرفته است. در

مخفف ها: RSM، روش سطح پاسخ؛ CCD، طرح مربع مرکزی؛ RNS، گونه واکنشگر نیتروژن؛ ROS، گونه واکنشگر فعال

* نویسنده مسؤول: Khodadoust@bkatu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۲۶ آذر ۱۳۹۸؛ تاریخ دریافت اصلاحات: ۳۰ مرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۳۱ مرداد ۱۳۹۹

doi: 10.29252/jmp.19.75.312

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

بوده و از یک مولکول فنل ساده یا ترکیبات پلیمری تغییر می‌کند. در سال‌های گذشته برای استخراج ترکیبات طبیعی از روش‌هایی مانند سوکسله، سیال فوق بحرانی [۶]، روش ماسراسیون (سرد) [۷]، روش پرکولاسیون و روش عصاره گیری گرم استفاده می‌نمودند. این روش‌ها بسیار زمان بر بوده و به مقادیر زیاد حلال برای استخراج نیازمند است و ضمن آنکه تخریب و یا تجزیه حرارتی ترکیبات مؤثره در چنین روش‌های یک عامل کاهش کیفیت فرآیند استخراج بوده است. روش‌های استخراج جدید از جمله استخراج به کمک امواج فراصوت، استخراج به کمک ماکروویو برای استخراج مواد طبیعی از گیاهان بسیار سریع و کارآمد هستند. امواج فراصوت سبب تخریب دیواره‌ی سلولی در یک مدت زمان کوتاه می‌شود، کوتاه‌تر بودن زمان استخراج با کمک امواج فراصوت نسبت به استخراج سنتی با روش سوکسله، بازدهی بالا، ساده‌تر بودن تجهیزات نسبت به استخراج با سیال فوق بحرانی و ماکروویو، ارزان قیمت بودن فرآیند استخراج، کاهش دمای استخراج و به دنبال آن امکان استخراج ترکیبات حساس به حرارت و توانایی استفاده از حلال‌های مختلف برای استخراج طیف وسیعی از ترکیبات طبیعی موجود در گیاهان از مزایای استفاده از امواج فراصوت در فرآیند استخراج به شمار می‌رود [۸]. فاکتورهای مختلفی مانند تعداد مراحل استخراج، دما، نسبت جامد به حلال، اندازه ذرات می‌تواند بر عملکرد و بازیابی ترکیبات طبیعی تأثیر بگذارد، بنابراین بهینه‌سازی شرایط استخراج اهمیت دارد. یکی از روش‌های مهم برای بهینه‌سازی، استفاده از روش سطوح پاسخ (RSM) است که ابتدا توسط Box-Wilson در سال ۱۹۵۱ توصیف شده است و مجموعه‌ای از تکنیک‌های مفید آماری و ریاضی برای توسعه، پیشرفت و بهینه کردن فرآیندها است. در روش سطوح پاسخ (RSM)، پاسخ مورد نظر توسط چند متغیر تحت تأثیر قرار می‌گیرد و هدف بهینه کردن این پاسخ می‌باشد. این روش آزمایشی یک مدل ریاضی را به

شناخته شده آنها که سبب فعالیت بیولوژیکی مخصوصاً فعالیت‌های ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد باکتری و آنتی اکسیدانی می‌شوند، به دست آمده است [۱]. از مهم‌ترین این ترکیبات می‌توان به آلکالوئیدها، تانن‌ها، فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی اشاره کرد [۲]. همچنین گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS) و نیتروژن (RNS) برای تأمین انرژی، سم زدایی، سیگنالینگ شیمیایی و عملکرد ایمنی ضروری هستند. آنها به طور مداوم در بدن انسان تولید می‌شوند و توسط آنزیم (آندروژن سوپراکسید، دیسموتاز، گلوتاتین، پراکسیداز و کاتالاز) کنترل می‌شوند. تولید بیش از حد این گونه‌ها به زیست مولکول‌های با ارزش (DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها) آسیب می‌زند [۳]. یافته‌های اخیر به وضوح نشان می‌دهد که مواد غذایی گیاهی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌توانند برای محافظت از بدن در برابر بیماری‌های مختلف از جمله سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی و عصبی مورد استفاده قرار بگیرد. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی درون بدن کمک می‌کند تا آسیب اکسیداتیو را از بین ببرند و از تشدید استرس اکسیداتیو جلوگیری کنند. در سال‌های اخیر همبستگی بین ترکیبات پلی فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برخی گیاهان مورد تحقیق قرار گرفته است [۴]. فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی به دلیل توانایی آنها در از بین بردن رادیکال‌های آزاد از طریق دادن اتم هیدروژن، الکترون یا کاتیون‌های فلزات است [۵]. ترکیبات فنلی متابولسم‌های ثانویه در گیاهان هستند که از اهمیت فیزیولوژیکی و ریخت شناسی قابل توجهی در گیاهان برخوردارند. این ترکیبات طیف گسترده از خواص فیزیولوژیکی، آنتی‌اکسیدانی، ضد انعقاد، جلوگیری از رشد تومورهای مغزی، جلوگیری از پوکی استخوان، افزایش مقاومت مویرگی، محافظت از شبکه چشم، محافظت از قلب و اثرات انبساط عروق را در بر می‌گیرد. ترکیبات فنلی شامل یک حلقه آروماتیک دارای یک یا چند استخلاف هیدروکسی

شهر اصفهان تهیه شد. بخش‌های هوایی گیاه پرسیاوشان پس از تمیز کردن، خشک کردن در سایه و پودر کردن آنها با آسیاب به منظور محافظت در برابر نور در ظرف مناسب و در دمای اتاق و یک محیط تاریک تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند. لازم به ذکر است که گیاه پرسیاوشان پس از تایید توسط بخش گیاه‌شناسی دانشگاه خاتم‌الانبیاء بهبهان و مطابقت با هرباریوم موجود در دانشگاه مورد بررسی قرار گرفت. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده نیز از شرکت مرک آلمان و سیگما آلد ریج آمریکا تهیه شدند.

۲.۲. انتخاب حلال/استخراج کننده

یکی از بهترین حلال‌ها برای استخراج پلی‌فنل‌ها از ماتریس گیاهی، حلال‌های قطبی هستند و مناسب‌ترین انواع از این حلال‌ها شامل مخلوط‌های آبی حاوی اتانول، متانول، استون و اتیل استات هستند. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایش‌های اولیه از حلال‌های مورد اشاره و همچنین بررسی ترکیب درصد آنها با آب مقطر و براساس درصد استخراج مشخص شد اتانول دارای راندمان استخراج بالاتری است و به همین دلیل در مطالعات بعدی انتخاب شد، ضمن آنکه اتانول برای مصارف انسانی ایمن‌تر است [۱۸]. به همین دلیل پس از آزمایش‌های مقدماتی برای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره گیاه پرسیاوشان از غلظت‌های اتانول آبی به ترتیب اتانول ۳۰ درصد و اتانول ۷۰ درصد انتخاب شد. ۷/۰ گرم از بخش‌های هوایی گیاه پرسیاوشان وزن شده و به ارلن آزمایشگاهی اضافه شد و مقدار ۱۶ میلی لیتر حلال اتانول ۳۰ درصد برای اندازه‌گیری فنل کل و اتانول ۷۰ درصد برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل اضافه شد. سپس مخلوط به دست آمده در معرض امواج دستگاه حمام اولتراسونیک با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، بلافاصله عصاره با کاغذ صافی جهت حذف تفاله و مواد غیر محلول عبور داده شد و در نهایت برای اندازه‌گیری جذب

وجود می‌آورد که امکان توصیف فرآیندهای شیمیایی و بیوشیمی را ایجاد می‌کند و کاربرد مهمی در طراحی، توسعه، فرموله کردن محصولات جدید دارد [۹]. طرح مرکب مرکزی (CCD) به دلیل ساختار ساده و کاربردی آن یکی از محبوب‌ترین روش‌های سطوح پاسخ است [۱۰]. طرح مرکب مرکزی به درک تعاملات میان پارامترهایی که بهینه شده‌اند کمک می‌کند و همچنین در این روش تمام عوامل به طور همزمان بهینه می‌شوند [۱۱]. در این پژوهش بهینه‌سازی عوامل استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجود در گیاه دارویی پرسیاوشان (*Adiantum capillus-veneris* L.) که اثرات آنتی‌اکسیدانی آن به اثبات رسیده است [۱۲]، مورد بررسی قرار گرفته است. گیاه پرسیاوشان دارای شاخه‌های سیاه، سخت و باریک است و به صورت پیوسته و چند شاخه روی زمین می‌خزد و طول شاخه‌های آن به ۲۰ تا ۷۰ سانتی متر می‌رسد. این گیاه گل و میوه ندارد و دارای شاخه‌های ظریف، برگ‌های تیره، پهن به صورت بریده و بریده است و متعلق به راسته سرخس‌ها (Polypodiales) و تیره (Polypodiaceae) است و بیشتر در نواحی گرم، مرطوب و به طور گسترده رشد می‌کند و بیشتر در مناطق جنوب اروپا، ساحل اقیانوس اطلس تا ایرلند، آمریکای مرکزی و آمریکای جنوبی، استرالیا و ایران توزیع شده است [۱۳]. در طب سنتی پرسیاوشان به عنوان تونیک، مدر، درمان ناراحتی‌های تنفسی، تومور طحال، کبد و اندام داخلی توصیه شده است. همچنین استفاده از این گیاه در مواردی مانند ضدسنگ کلیه، ضدالتهاب، ضد عفونی، ضداسپاسم، ضد دیابت، ضدباکتری و درمان زخم در شرایط آزمایشگاهی به اثبات رسیده است [۱۴-۱۷].

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. آماده‌سازی مواد اولیه

به دلیل عدم رویش گیاه پرسیاوشان در شهر بهبهان، این گیاه به صورت تازه توسط یک فروشگاه گیاهان دارویی از

محتوای ترکیبات فنل و فلاونوئیدکل مورد استفاده قرار گرفت.

۳.۲. اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فنلی کل

میزان کل ترکیبات فنلی با روش فولین-سیوالتو اندازه‌گیری شد [۱۸] و نتایج برحسب mg GAE/g پودر خشک گیاه بیان شد. ابتدا استانداردها برحسب گالیک اسید به غلظت های متفاوت (۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰) تهیه شد سپس به هریک از لوله‌های آزمایش، ۱/۲۵ ml عصاره، ۱/۲۵ ml معرف فولین - سیوالتو (۱:۱۰) رقیق شده با آب) و ۱ ml کربنات سدیم ۱ مولار اضافه شد. محلول به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در نهایت جذب آن در ۷۶۵ نانومتر در مقابل محلول شاهد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. منحنی استاندارد نیز بر اساس محلول‌های استاندارد و جذب‌های نوری به دست آمده در EXCEL رسم شد و معادله به دست آمده نیز برای تعیین میزان فنل عصاره‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفت.

۴.۲. اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل

میزان فلاونوئید کل به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد [۱۲] و نتایج برحسب mg QUE/g پودر خشک گیاه بیان شد. ابتدا استانداردها برحسب کوئرستین با غلظت‌های متفاوت (۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰) تهیه شد، سپس ۰/۵ ml از محلول عصاره با ۱/۵ ml اتانول ۷۰ درصد، ۰/۱ ml آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد، ۰/۱ ml استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ ml آب مقطر مخلوط شد. بعد

از نگهداری نمونه در جای تاریک در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه جذب محلول در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل شاهد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. منحنی استاندارد نیز بر اساس محلول‌های استاندارد و جذب‌های نوری به دست آمده در EXCEL رسم شد و معادله به دست آمده نیز برای تعیین میزان فلاونوئید عصاره‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفت.

۵.۲. طراحی آزمایش

روش‌های طراحی آزمایش برای رسیدن به مقادیر بهینه و شرایط مطلوب در آزمایش‌های مختلف استفاده می‌شود. به عبارتی در روش سطح پاسخ، مجموعه‌ای از روش‌های آماری و ریاضی برای مدلسازی و آنالیز مسائلی استفاده می‌شود که پاسخ مطلوب آن تحت تأثیر چند متغیر است و هدف ما بهینه‌سازی آن پاسخ می‌باشد. به منظور بررسی اثر متغیرهای آزمایشی (مقدار پودر گیاه، حجم حلال، زمان و دما) بر فرآیند استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئید گیاه پرسیاوشان از طرح مرکب مرکزی (CCD) استفاده شد در نرم‌افزار Statistica ۰/۷ استفاده شد. در طرح مرکب مرکزی برای کسب حداکثر اطلاعات از ۴ متغیر در ۵ سطح و یک بلوک با ۲۶ آزمون تصادفی جهت آنالیز روند میزان استخراج و تعیین شرایط بهینه استفاده شد. در این طرح از 2^f نقطه به عنوان نقاط فاکتوری، 2^f نقطه به عنوان نقاط ستاره‌ای (جهت بررسی اورتوگونال و چرخشی بودن طرح آزمایشی) و همچنین ۲ نقطه مرکزی برای بررسی خطای طرح استفاده شد و مقادیر آنها در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. مقادیر واقعی و کددار متغیرهای مورد بررسی

متغیرها	سطوح			نقاط ستاره‌ای $\alpha = 2$	
	پایین (-۱)	مرکزی (۰)	بالا (+۱)	- α	+ α
(X_1) مقدارپودر گیاه	۰/۳	۰/۵	۰/۷	۰/۱	۰/۹
(X_2) مقدار حلال	۸	۱۱	۱۴	۵	۱۷
(X_3) زمان استخراج	۱۰	۱۵	۲۰	۵	۲۵
(X_4) دمای استخراج	۳۰	۴۰	۵۰	۲۰	۶۰

۳. نتایج

فرآیند استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی گیاه پرسیاوشان

مقادیر واقعی و کددار متغیرهای مستقل در طرح مرکب مرکزی تجربی و همچنین نتایج تجربی به دست آمده در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است. آنالیز آماری داده‌های به دست آمده برای ساخت مدل ریاضی در جدول ۳ و ۴ قابل مشاهده است.

جدول ۲. طرح مرکب مرکزی و نتایج تجربی به دست آمده برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی

اجرا	(X_1)	(X_2)	(X_3)	(X_4)	نتایج فنل	نتایج فلاونوئید
۱	-۱	+۱	-۱	-۱	۰/۶۴۱۳	۰/۲۹۶۵
۲	-۱	+۱	-۱	+۱	۰/۷۱۸۰	۰/۳۳۵۱
۳	-۱	+۱	+۱	-۱	۰/۵۶۴۲	۰/۳۱۴۷
۴	-۱	+۱	+۱	+۱	۰/۷۱۸۹	۰/۳۹۳۳
۵	-۱	-۱	-۱	-۱	۰/۶۵۶۶	۰/۴۹۱۰
۶	-۱	-۱	-۱	+۱	۰/۹۳۹۰	۰/۵۶۹۹
۷	-۱	-۱	+۱	-۱	۰/۷۷۲۴	۰/۵۱۸۸
۸	-۱	-۱	+۱	+۱	۰/۹۸۵۹	۰/۶۴۳۸
۹	+۱	+۱	-۱	-۱	۰/۷۷۹۰	۰/۵۹۴۱
۱۰	+۱	+۱	-۱	+۱	۰/۰۱۴۰	۰/۸۲۷۲
۱۱	+۱	+۱	+۱	-۱	۰/۷۲۹۶	۰/۶۴۷۳
۱۲	+۱	+۱	+۱	+۱	۰/۰۲۵۹	۰/۵۵۳۲
۱۳	+۱	-۱	-۱	-۱	۰/۹۷۱۰	۰/۰۸۸۵
۱۴	+۱	-۱	-۱	+۱	۱/۱۱۵۵	۱/۱۳۵۶
۱۵	+۱	-۱	+۱	-۱	۰/۷۹۷۸	۱/۳۲۰۳
۱۶	+۱	-۱	+۱	+۱	۰/۰۸۲۰	۱/۶۶۳۹
۱۷	-۲	۰	۰	۰	۰/۲۸۷۶	۰/۱۶۸۴
۱۸	+۲	۰	۰	۰	۰/۷۰۳۵	۱/۴۹۴۹
۱۹	۰	-۲	۰	۰	۰/۰۴۴۷	۰/۹۸۶۱
۲۰	۰	+۲	۰	۰	۰/۷۰۹۱	۰/۴۶۷۱
۲۱	۰	۰	-۲	۰	۰/۷۸۳۵	۰/۶۷۵۱
۲۲	۰	۰	+۲	۰	۰/۷۷۲۵	۰/۶۵۴۸
۲۳	۰	۰	۰	-۲	۰/۷۶۱۶	۰/۵۳۳۶
۲۴	۰	۰	۰	+۲	۰/۷۷۰۰	۰/۷۰۸۴
۲۵ (C)	۰	۰	۰	۰	۰/۷۸۵۲	۰/۶۳۴۷
۲۶ (C)	۰	۰	۰	۰	۰/۸۴۵۴	۰/۶۳۲۱

۴. بحث

۱.۴. بهینه سازی استخراج ترکیبات فنل کل

از نظر آماری مدلی که بتواند پاسخ مورد نظر را پیش بینی کند مدلی است که آزمون ضعف برازش آن معنی‌دار نبوده و دارای بالاترین ضریب همبستگی R^2 و R^2_{adj} را داشته باشد. مقدار p -value کمتر از ۰/۰۵ در جدول آنالیز واریانس نشان دهنده معنادار بودن متغیرها در سطح اطمینان ۹۵ درصد است. مطابق با جدول ۳ مقدار p -value مربوط به عدم برازش در این مدل برای بهینه سازی استخراج ترکیبات فنلی به ترتیب ۰/۱۳۴ است که بیانگر آن است که عدم برازش مدل معنادار نیست و مدل از انحنای کافی و توان دوم برخوردار است. R^2_{adj} ، R^2 برای ترکیبات فنلی به ترتیب برابر مقدار ۰/۹۹۰ و ۰/۹۷۷ است، که کاملاً به یک نزدیک بوده و نشان دهنده تطبیق بالای نتایج مدل با نتایج تجربی است. در جدول آنالیز

واریانس جملات خطی مربوط به پارامترهای مقدار پودر گیاه، حجم حلال، دما، زمان، جملات برهمکنش بین X_1X_2 ، X_1X_3 ، X_2X_3 و در مورد جملات درجه دوم عبارات X_1^2 ، X_2^2 ، X_3^2 ، مقادیر p -value آنها کمتر از ۰/۰۵ است و به عبارت دیگر این پارامترهای بر پاسخ استخراج تأثیر معناداری می‌گذارد. مقادیر p -value سایر جملات بزرگتر از ۰/۰۵ است بنابراین اثر معناداری بر مدل ندارند و می‌تواند از مدل حذف شوند. با توجه به ضرایب رگرسیون پارامترهایی که اثر معناداری بر پاسخ داشته‌اند می‌توان مدل آماری زیر را که فنل کل را به عنوان تابعی از متغیرهای وابسته در محدوده مورد مطالعه، ارائه داد:

$$Y = 0.908 + 0.099X_1 + 0.104X_2 + 0.057X_3 + 0.056X_4 - 0.073X_1^2 - 0.021X_2^2 + 0.017X_1X_2 - 0.018X_1X_3 - 0.034X_2X_3 \quad [1]$$

جدول ۳. آنالیز واریانس (ANOVA) طرح مرکب مرکزی برای استخراج ترکیبات فنل کل

منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجات آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار P
X_1	۰/۲۳۸۴۰۳	۱	۰/۲۳۸۴۰۳	۹۷۳۰/۷۲	۰/۰۰۶۴۵۳
X_2	۰/۲۶۰۴۱۷	۱	۰/۲۶۰۴۱۷	۱۰۶۲/۲۵	۰/۰۰۶۱۵۷
X_3	۰/۰۷۸۴۳۳	۱	۰/۰۷۸۴۳۳	۳۲۰/۳۳	۰/۰۱۱۲۵۰
X_4	۰/۰۷۶۶۱۴	۱	۰/۰۷۶۶۱۴	۳۱۲۷/۱۰	۰/۰۱۱۳۸۳
X_1^2	۰/۰۹۳۸۱۳	۱	۰/۰۹۳۸۱۳	۳۸۲۹/۱۲	۰/۰۱۰۲۸۷
X_2^2	۰/۰۰۰۲۵۴	۱	۰/۰۰۰۲۵۴	۱۰/۳۶	۰/۱۹۱۸۱۰
X_3^2	۰/۰۰۷۵۶۱	۱	۰/۰۰۷۵۶۱	۳۰۸/۶۰	۰/۰۳۶۲۰۱
X_4^2	۰/۰۰۰۲۸۸	۱	۰/۰۰۰۲۸۸	۱۱/۷۶	۰/۱۸۰۶۴۹
X_1X_2	۰/۰۰۴۹۰۰	۱	۰/۰۰۴۹۰۰	۲۰۰/۰۰	۰/۰۴۴۹۴۱
X_1X_3	۰/۰۰۵۱۸۴	۱	۰/۰۰۵۱۸۴	۲۱۱/۵۹	۰/۰۴۳۶۹۷
X_1X_4	۰/۰۰۰۰۰۶	۱	۰/۰۰۰۰۰۶	۰۰/۲۶	۰/۷۰۲۲۵۳
X_2X_3	۰/۰۰۲۳۰۴	۱	۰/۰۰۲۳۰۴	۹۴/۰۴	۰/۰۶۵۴۱۷
X_2X_4	۰/۰۱۸۳۶۰	۱	۰/۰۱۸۳۶۰	۴۰/۷۴۹	۰/۰۲۳۲۴۵
X_3X_4	۰/۰۰۰۱۳۲	۱	۰/۰۰۰۱۳۲	۵/۴۰	۰/۲۵۸۷۵۲
نقض در برازش	۰/۰۰۸۱۶۶	۱۰	۰/۰۰۰۸۱۷	۳۳/۳۳	۰/۰۱۳۴۰۶۲
خطای خالص	۰/۰۰۰۰۲۴	۱	۰/۰۰۰۰۲۴		
کل مجموع مربعات	۰/۸۲۵۵۷	۲۵			

جدول ۴. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) طرح مرکب مرکزی استخراج ترکیبات فلاونوئید کل

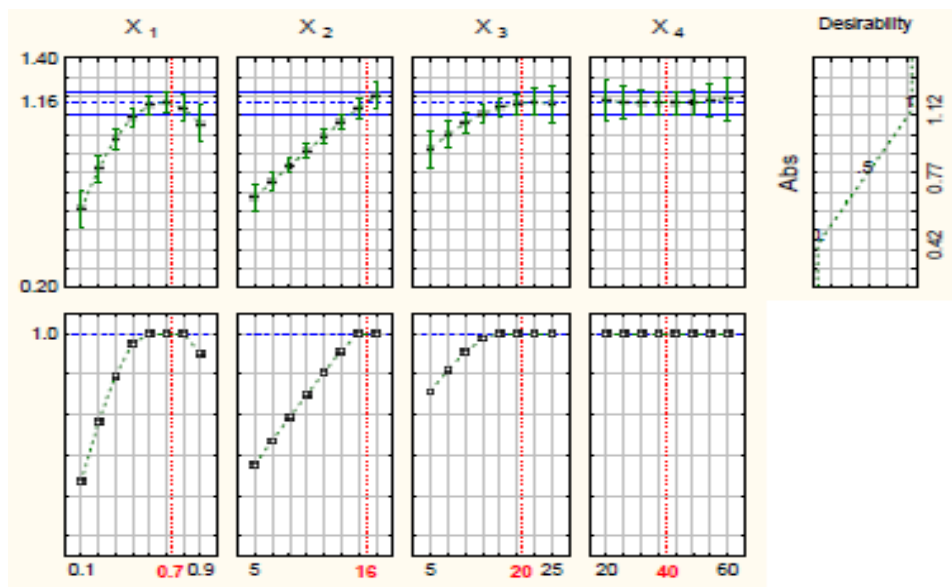
منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجات آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار P
X_1	۰/۹۷۲۴۴۰	۱	۰/۹۷۲۴۴۰	۵۴۰۲۴/۴۵	۰/۰۰۲۵۷۳
X_2	۰/۵۸۱۲۵۹	۱	۰/۵۸۱۲۵۹	۳۲۲۹۲/۱۹	۰/۰۰۳۵۴۳
X_3	۰/۰۳۲۰۴۷	۱	۰/۰۳۲۰۴۷	۱۷۸۰/۳۹	۰/۰۱۵۰۸۵
X_4	۰/۱۰۶۵۳۳	۱	۰/۱۰۶۵۳۳	۵۹۱۸/۵۲	۰/۰۰۸۲۷۵
X_1^2	۰/۰۱۱۴۸۹	۱	۰/۰۱۱۴۸۹	۶۳۸/۳۰	۰/۰۲۵۱۸۵
X_2^2	۰/۰۱۱۴۸۹	۱	۰/۰۱۱۴۸۹	۴۸۳۲/۴۶	۰/۰۰۹۱۵۷
X_3^2	۰/۰۰۳۳۴۵	۱	۰/۰۰۳۳۴۵	۱۸۵/۸۴	۰/۰۴۶۶۱۶
X_4^2	۰/۰۰۰۰۱۴	۱	۰/۰۰۰۰۱۴	۰/۸۰	۰/۵۳۱۵۴
$X_1 X_2$	۰/۱۶۸۳۰۵	۱	۰/۱۶۸۳۰۵	۹۳۵۰/۲۸	۰/۰۰۶۵۸۳
$X_1 X_3$	۰/۰۰۰۰۳۳	۱	۰/۰۰۰۰۳۳	۱/۸۴	۰/۴۰۴۶۸۶
$X_1 X_4$	۰/۰۰۹۷۵۲	۱	۰/۰۰۹۷۵۲	۵۴۱/۷۵	۰/۰۲۷۳۳۵
$X_2 X_3$	۰/۰۰۹۳۶۱	۱	۰/۰۰۹۳۶۱	۵۲۰/۰۳	۰/۰۲۷۸۹۹
$X_2 X_4$	۰/۰۰۴۳۲۳	۱	۰/۰۰۴۳۲۳	۲۴۰/۱۷	۰/۰۴۱۰۲۲
$X_3 X_4$	۰/۰۰۰۷۴۳	۱	۰/۰۰۰۷۴۳	۴۱/۲۵	۰/۰۹۸۳۲۸
نقض در برازش	۰/۰۰۳۱۴۱۵	۱۰	۰/۰۰۳۱۴۱	۱۴۷/۵۳	۰/۰۵۸۸۴۵
خطای خالص	۰/۰۰۰۰۱۸	۱	۰/۰۰۰۰۱۸		
کل مجموع مربعات	۲/۰۸۲۳۱۰	۲۵			

با حل مناسب این معادله برای متغیرهای وارد شده در آن می‌توان شرایط استخراج ترکیبات فنلی را بهینه کرد که این کار با استفاده از تابع مطلوبیت انجام شد.

۲.۴. بهینه‌سازی با استفاده از تابع مطلوبیت برای استخراج ترکیبات فنلی

پرو فایل مطلوبیت پاسخ‌ها شامل تعیین تابع مطلوبیت برای هر متغیر بهینه در مقیاس ۰/۰ (نامطلوب) تا یک (بسیار مطلوب) می‌باشد. نتایج ماتریس طرح مرکب مرکزی در جدول ۲ در شکل ۱ نشان می‌دهد که حداکثر درصد فنل ۱/۱۲ و حداقل آن ۰/۴۲ است. باتوجه به این نتایج، تابع مطلوبیت برای هر متغیر تنظیم می‌شود. سمت راست شکل ۱

برای فنل کل گیاه پرسیاوشان که در آن مطلوبیت یک برای بیشترین مقدار فنل کل ۱/۱۲، مقدار صفر برای کمترین فنل کل ۰/۴۲ و برای میانگین ۰/۷۷ نتایج تنظیم شده است. در قسمت پایین شکل ۱ مطلوبیت برای هر کدام از متغیرها نشان داده شده است. بر اساس این شکل مقدار گیاه در ۰/۷ g، حجم حلال در ۱۷ ml، مدت زمان امواج فراصوت در ۲۵ دقیقه و دما در ۴۰°C به مطلوبیت رسیده است. محتوای فنل کل برحسب مقادیر بهینه‌سازی شده پارامترهای متغیر با استفاده از معادله خط منحنی استاندارد گالیک اسید ($Y=0.0055X+0.0255$) محاسبه و مقدار ۹/۴۶ mg GAE/g پودر خشک گیاه به دست آمد.

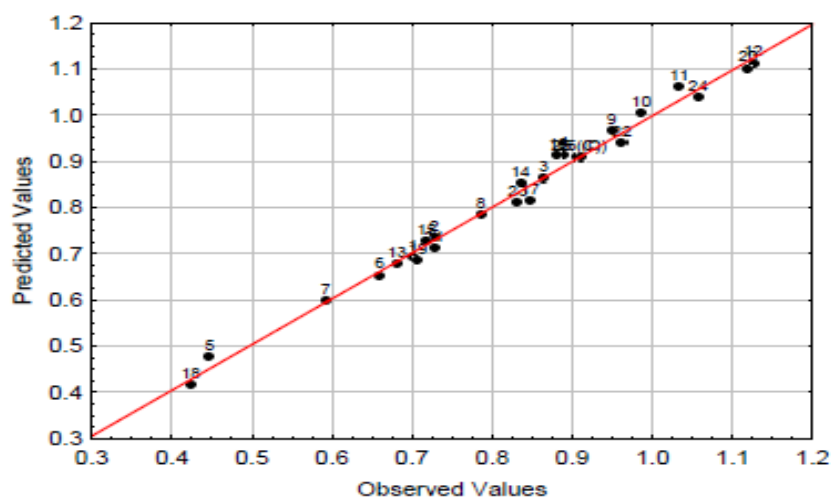


شکل ۱. پروفایل مقادیر پیش‌بینی شده بر اساس تابع مطلوبیت برای استخراج ترکیبات فنلی

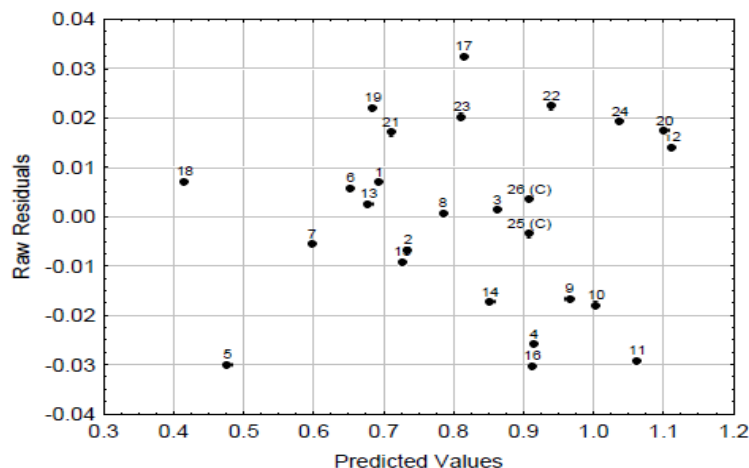
۳.۴. اعتبار سنجی مدل استخراج ترکیبات فنل کل

خوبی داده‌های تجربی را برازش می‌کند. در شکل ۳ چنانکه مشاهده می‌شود الگویی مشخصی در پراکندگی داده‌ها وجود ندارد و خطای سیستماتیک در داده‌ها دیده نمی‌شود. در این شکل پراکندگی داده‌ها در بالا و پایین محور تقریباً یکسان است.

در شکل ۲ مقادیر داده‌های تجربی را برحسب مقادیر پیش‌بینی شده را بوسیله مدل نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود نقاط بر روی یک خط راست قرار دارند و بیانگر این حقیقت است که خطا به صورت نرمال توزیع شده و مدل به



شکل ۲. نمودار داده‌های تجربی بر حسب مقادیر پیش‌بینی شده به وسیله مدل در استخراج ترکیبات فنلی



شکل ۳. نمودار باقی مانده‌ها بر حسب مقادیر پیش‌بینی شده در مورد پاسخ ترکیبات فنلی

۴.۴. نمودارهای تأثیر متغیرها بر پاسخ استخراج ترکیبات فنلی

با توجه به معنی‌دار بودن اثر برهمکنش بین دو پارامتر مقدار پودر گیاه و حجم حلال می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش مقدار گیاه و حجم حلال استخراج ترکیبات فنلی تا سطح حدود $0/7$ گرم بهبود یافته و سپس کاهش می‌یابد و منطقی است که در مقادیر کم حلال، حلال نمی‌تواند به داخل سلول و بافت گیاهی نفوذ کند و سبب حل شدن ترکیبات فنلی در خود شود، همچنین با اشباع شدن حلال از ترکیبات فنلی، حلال کارای خود را از دست می‌دهد (شکل ۴-ا). با افزایش مقدار پودر گیاه تا سطح $0/7$ گرم و افزایش زمان استخراج، بازده ترکیبات فنلی یک روند صعودی را طی کرده است و سپس کاهش یافته است. در واقع با افزایش زمان تماس حلال در مقدار ثابت حجم حلال، امواج فراصوت زمان کافی برای حباب‌زایی و تخریب دیواره سلولی و ایجاد پدیده حفره‌زایی را خواهد داشت، بنابراین استخراج افزایش یافته است. اما با افزایش بیش از حد زمان استخراج، امواج فراصوت سبب اکسیداسیون و تخریب ترکیبات فنلی خواهد شد و به همین دلیل کارایی استخراج کاهش یافته است. همچنین یکی از دلایل کاهش استخراج می‌تواند به ثابت بودن حجم حلال در افزایش مقدار پودر گیاه باشد که سبب کاهش انحلال‌پذیری

ترکیبات فنلی می‌شود (شکل ۴-ب). در برهمکنش بین مقدار پودر گیاه و دما با افزایش دما در مقادیر ثابت دیگر متغیرها سبب استخراج ترکیبات فنلی با یک روند خطی مثبت بهبود یافته است و علت آن می‌تواند این باشد که با افزایش دما ویسکوزیته حلال و کشش سطحی آن کاهش یافته و موجب افزایش حلالیت ترکیبات فنلی در حلال می‌شود و انتقال جرم از سلول گیاهی بهبود می‌یابد (شکل ۴-ج). با افزایش حلال در مقادیر ثابت دیگر پارامترها استخراج ترکیبات فنلی افزایش یافته است و منطقی است که با افزایش حلال نسبت به مقدار ثابت پودر گیاه، حلال می‌تواند به راحتی به داخل سلول‌های گیاهی بیشتری نفوذ کرده و سبب حلالیت و بهبود انتقال جرم ترکیبات فنلی بیشتری در خود شود که این روند به صورت افزایش خطی مثبت تا سطح حجم 18 میلی‌لیتر در نمودار دیده می‌شود. همچنین با افزایش زمان با ثابت بودن سایر پارامترهای متغیر عملکرد تا سطح زمان 20 دقیقه راندمان استخراج افزایش خطی مثبت یافته است. علت این پدیده می‌تواند مربوط به امواج فراصوت باشد که زمان بیشتری برای سطح تماس با سلول‌های گیاهی وجود داشته است و می‌تواند با اعمال پدیده حفره‌زایی دیواره سلولی گیاهی آنها را تخریب کند و انتقال جرم را با دسترسی آسانتر حلال به ترکیبات بهبود دهد (شکل ۴-د).

حجم حلال، دما، زمان، جملات برهمکنش بین X_1X_2 ، X_1X_3 ، X_1X_4 ، X_2X_3 ، X_2X_4 و در مورد جملات درجه دوم عبارات X_1^2 ، X_2^2 ، X_3^2 ، مقدار p-value آنها کمتر از ۰/۰۵ است و به عبارت دیگر این پارامترهای برپاسخ استخراج تأثیر معناداری می‌گذارد. با توجه به ضرایب رگرسیون پارامترهای که اثر معناداری برپاسخ مدل بهینه‌سازی دارند و همچنین با استفاده از داده‌های تجربی، مدل چند جمله‌ای زیر برای میزان استخراج ترکیبات فلاونوئید به دست آمد:

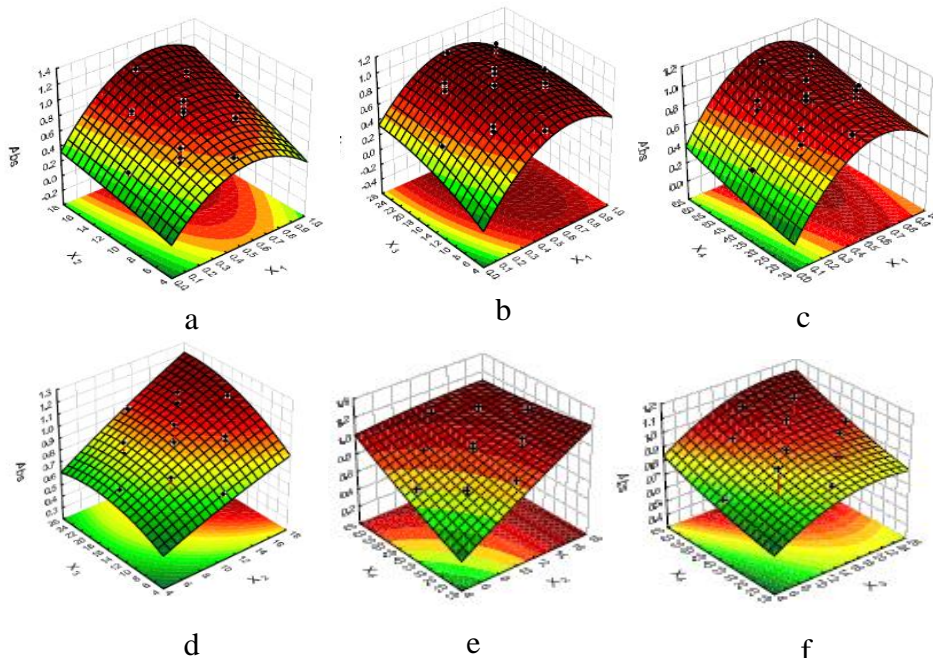
$$\begin{aligned} \text{درصد استخراج فلاونوئید کل} = & 0.155 + 0.201X_1 + 0.655X_2 + 0.036X_3 + 0.067X_4 - 0.026X_1^2 + 0.071X_2^2 \\ & + 0.14X_3^2 + 0.102X_1X_2 - 0.024X_1X_3 - 0.024X_1X_4 - 0.016X_2X_3 \end{aligned} \quad [2]$$

با حل کردن این معادله برای متغیرهای وارد شده در آن می‌توان شرایط استخراج ترکیبات فلاونوئیدی را بهینه کرد که این کار با استفاده از تابع مطلوبیت انجام شد.

با افزایش حلال و دما استخراج ترکیبات فنلی بهبود یافته است، علت این افزایش را می‌توان به دلیل کاهش ویسکوزیته و کشش سطحی حلال در درجه حرارت‌های بالا دانست که موجب افزایش حلالیت و بهبود انتقال جرم می‌شود (شکل ۴- e). برهمکنش دوعامل دما و زمان در میزان فنل کل با در نظر گرفتن عبارت p-value آن بی‌معنی گزارش شده است و اثری بر روی مدل ندارد و می‌تواند از مدل حذف شود (شکل ۴- f).

۵.۴. ارزیابی پارامتر پاسخ بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فلاونوئیدی

مطابق با جدول ۴ مقدار p-value مربوط به عدم برازش در این مدل برای بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فلاونوئیدی ۰/۰۵۸ به دست آمده است که نشان دهنده آن است که عدم برازش معنادار نیست و مدل از انحنای کافی و توان دوم برخوردار است. R^2 ، R^2_{adj} برای ترکیبات فلاونوئیدی به ترتیب برابر مقدار ۰/۹۸۵ و ۰/۹۶۶ به دست آمد. در این حالت جملات خطی مربوط به پارامترهای مقدار پودر گیاه،



شکل ۴. نمودار سطح پاسخ برای اثر متغیرهای مستقل بر عملکرد استخراج فنل کل

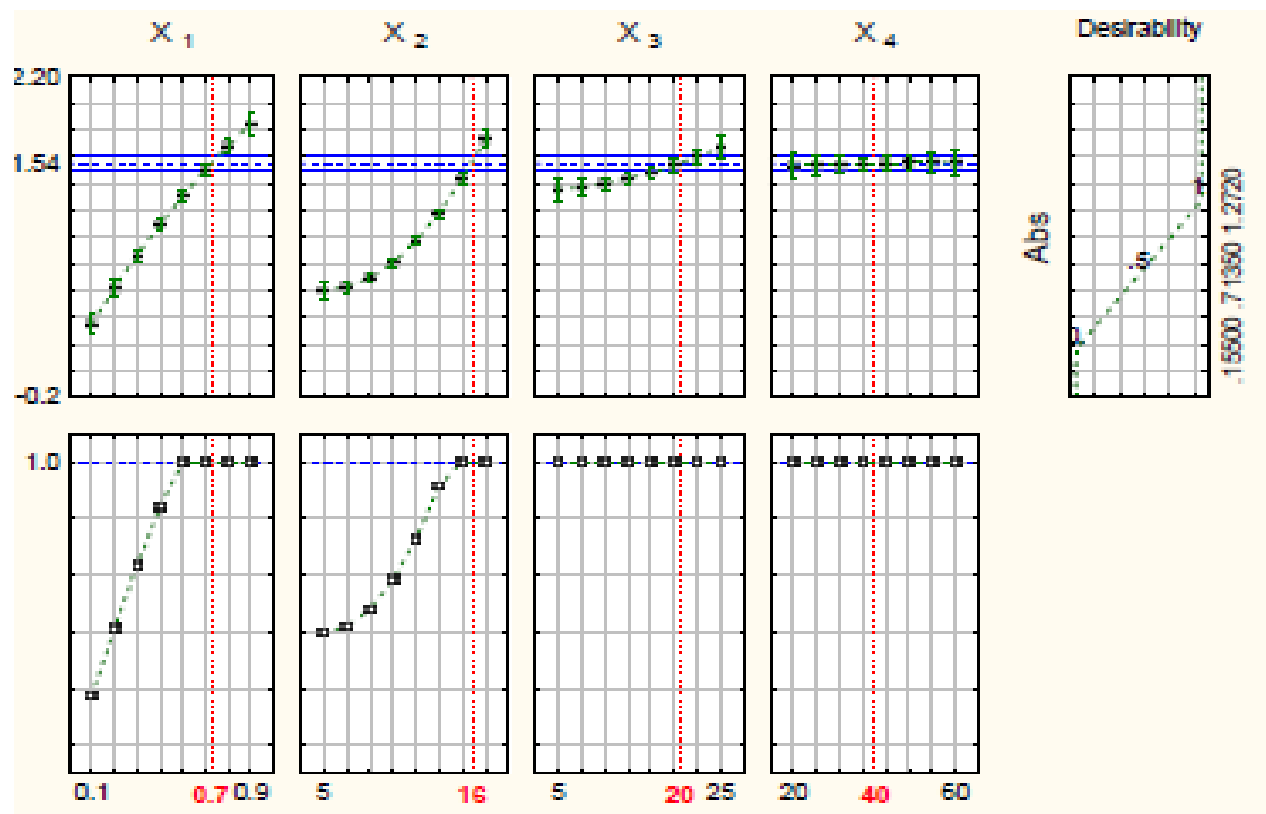
های متغیر با استفاده از معادله خط منحنی استاندارد کوثرستین
 $(Y = 0.0109X - 0.0056X)$ محاسبه و مقدار
 ۵/۲۲ mg QUR/g پودر خشک گیاه به دست آمد.

۷.۴. اعتبار سنجی مدل استخراج ترکیبات فلاونوئید

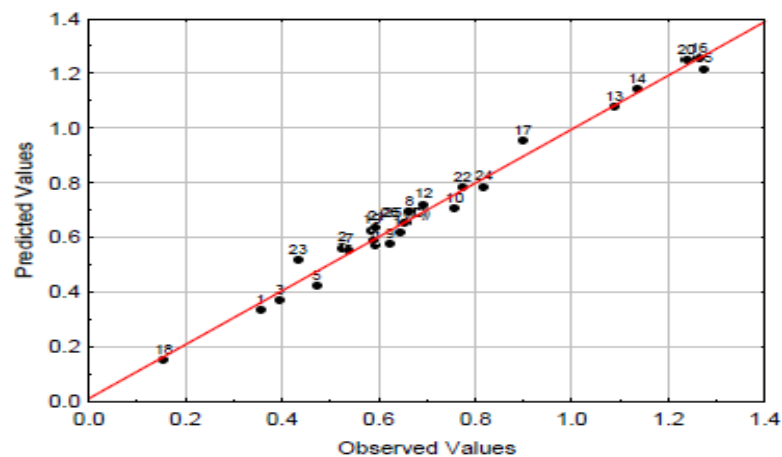
در شکل ۶ مقادیر داده‌های تجربی را برحسب مقادیر پیش
 بینی شده به وسیله مدل نشان می‌دهد که نقاط بر روی یک
 خط راست قرار دارند و بیانگر این حقیقت است که خطا به
 صورت نرمال توزیع شده و مدل به خوبی داده‌های تجربی را
 برازش کرده است. در شکل ۷ مشاهده می‌شود الگویی
 مشخصی در پراکندگی داده‌ها وجود ندارد و خطای
 سیستماتیک در داده‌ها دیده نمی‌شود در این شکل پراکندگی
 داده‌ها در بالا و پایین محور تقریباً یکسان است.

۶.۴. بهینه‌سازی با استفاده از تابع مطلوبیت در فرآیند
 استخراج ترکیبات فلاونوئیدی

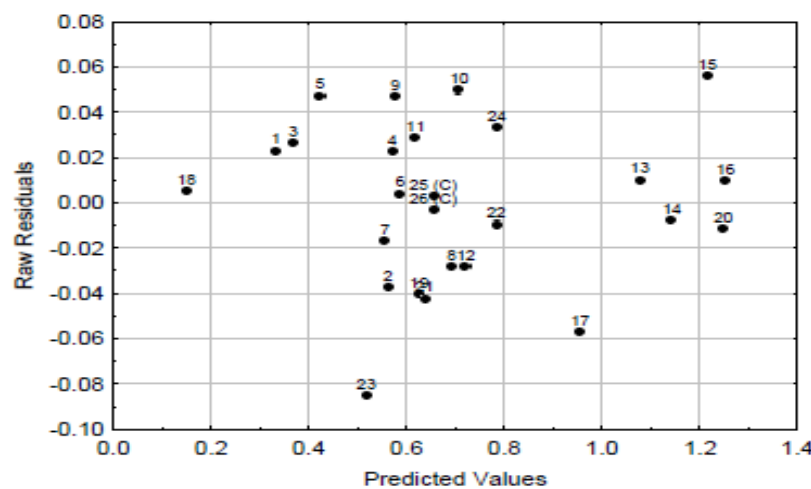
نتایج ماتریس طرح مرکب مرکزی در جدول ۲ در شکل ۵
 نشان می‌دهد که حداکثر درصد فلاونوئید ۱/۲۷ و حداقل آن
 ۰/۱۵ می‌باشد. در قسمت پایین شکل ۵ مطلوبیت برای هر کدام
 از متغیرها را نشان می‌دهد (مقدار مطلوبیت یک به عنوان مقدار
 هدف). پاسخ چنین منحنی‌هایی با سطوح مشاهده شده برای هر
 متغیرها در قسمت بالای این شکل نشان داده شده است. بر
 اساس این شکل مقدار گیاه در ۰/۷ گرم، حجم حلال در ۱۶ میلی
 لیتر، مدت زمان امواج فراصوت در ۲۰ دقیقه و دما در ۴۰ °C به
 مطلوبیت رسیده است. در نتیجه چنین محاسباتی و معیار
 مطلوبیت یک مقدار فلاونوئید ۱/۵۴ پیش بینی شده است.
 محتوای فلاونوئید کل برحسب مقادیر بهینه‌سازی شده پارامتر



شکل ۵. پروفایل مقادیر پیش‌بینی شده و تابع مطلوبیت برای استخراج ترکیبات فلاونوئیدی



شکل ۶. نمودار داده‌های تجربی بر حسب مقادیر پیش‌بینی شده بوسیله مدل در استخراج ترکیبات فلاونوئید



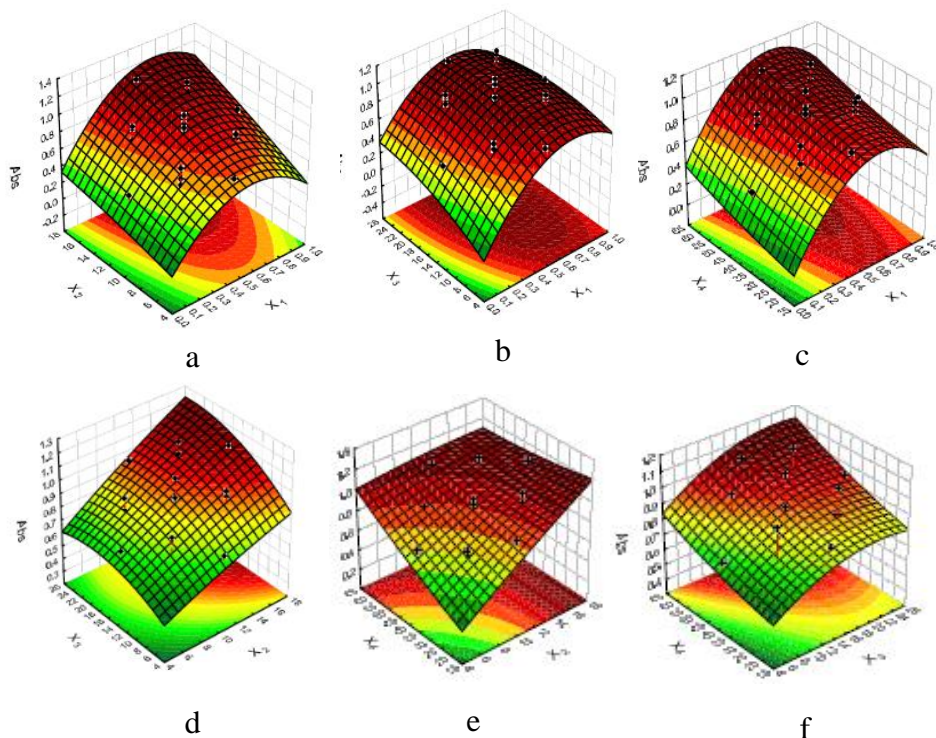
شکل ۷. نمودار باقیمانده‌ها نسبت به مقادیر پیش‌بینی شده در استخراج ترکیبات فلاونوئید

می‌دهد (شکل ۸-ا). با افزایش مقدار پودر گیاه در دما، زمان و حجم ثابت حلال، حلال توانسته است مواد مؤثره گیاه را تحت پدیده حفره‌زایی امواج فراصوت به خوبی در خود حل کند و سبب بهبود انتقال جرم و افزایش استخراج شود. افزایش زمان در مقادیر ثابت دیگر پارامترها تأثیر چشمگیری در استخراج نداشته است و تنها مقدار کمی سبب بهبود انتقال جرم شده است که می‌تواند ناشی از این باشد که با افزایش زمان، حلال و امواج فراصوت فرصت کافی خواهند یافت که با اعمال مکانیسم خود بر روی سلول‌های گیاهی بیشتر، راندمان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی را افزایش دهند (شکل

۸.۴). نمودارهای تأثیر متغیرها بر استخراج ترکیبات فلاونوئید کل با توجه به معنی‌دار بودن p -value برهمکنش بین دو پارامتر مقدار پودر گیاه و حجم حلال، با افزایش مقدار گیاه و حجم حلال استخراج ترکیبات فلاونوئید کل به طور کلی بهبود یافته است. اما این مقدار بعد از سطح 0.07 گرم تغییر محسوسی نیافته است که می‌تواند منطقی باشد که با افزایش نسبت مقدار گیاه به حلال، حلال در مقادیر کم نمی‌تواند به داخل سلول و بافت گیاه بیشتری نفوذ کند و سبب حل شدن ترکیبات فلاونوئیدی در خود شود، همچنین با اشباع شدن حلال از ترکیبات فلاونوئیدی، حلال کارایی خود را از دست

که می‌تواند سبب افزایش بازده استخراج شود (شکل ۸-د). با کاهش دما و کاهش حجم حلال میزان بازده استخراج ترکیبات فلاونوئیدی کاهش می‌یابد که می‌تواند به این دلیل باشد که با کاهش حجم حلال، حلال توانایی کمتری برای نفوذ در سلول گیاهی دارد. بنابراین دسترسی به ترکیبات فلاونوئیدی کاهش می‌یابد و با اشباع شدن حلال از ترکیبات موثره گیاه انحلال‌پذیری کاهش می‌یابد. علاوه بر این با کاهش دما ویسکوزیته و کشش سطحی حلال کاهش یافته که می‌تواند سرعت انتشار حلال به سلول گیاهی را کاهش دهد و حلال در زمان ثابت فرصت کافی برای استخراج را نداشته باشد و بنابراین استخراج ترکیبات فلاونوئیدی را کاهش می‌دهد (شکل ۸-ه). این برهمکنش با توجه بی‌معنی بودن عبارت p -value برهمکنش دما و زمان اثرمعداری بر روی مدل نداشته است و می‌تواند حذف شود (شکل ۸-ف).

۸-ب). با توجه معنی‌دار بودن p -value برای این برهمکنش می‌توان مشاهده کرد که با افزایش مقدار پودر گیاه و افزایش مقدار دما ترکیبات فلاونوئیدی بیشتری استخراج شده است که می‌توان به دلیل این باشد که با افزایش دما سرعت انتشار حلال به درون سلول به دلیل کاهش ویسکوزیته و کاهش کشش سطحی حلال را افزایش می‌یابد. همچنین با افزایش انحلال‌پذیری، حلال توانایی بیشتری در حل کردن ترکیبات فلاونوئیدی در خود خواهد داشت (شکل ۸-ج). افزایش زمان از دو طریق بر بهبود استخراج اثر بخش است، اول اینکه افزایش زمان به امواج فراصوت این توانایی را خواهد داد که در تماس با تعداد سلول‌های گیاهی بیشتری با انفجار حباب بر سطح ذرات گیاهی سبب تخریب دیواره سلولی شود که می‌تواند نفوذ حلال به داخل بافت گیاهی را تسهیل کند و از طرفی دیگر با افزایش زمان، حلال فرصت کافی برای نفوذ در غشای سلولی گیاهی و انحلال‌پذیری آنها خواهد داشت



شکل ۸. نمودار سطح پاسخ برای اثر متغیرها بر عملکرد استخراج فلاونوئیدکل

۵. نتیجه‌گیری

گیاهان حاوی ترکیبات متعددی هستند که ساختارهای متفاوتی دارند. استخراج این ترکیبات به عوامل متعددی بستگی دارد که مهم‌ترین آنها حلال و روش استخراج می‌باشند. انتخاب حلال و روش استخراج بستگی به قسمت‌های مختلف یک گیاه و نیز مواد متشکله آن دارد. در آزمایش‌های ابتدایی مشخص شد که ترکیب حلال‌های اتانول و آب بهترین گزینه برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی به طور همزمان از بخش‌های هوایی گیاه پرسیاوشان است. در این مقاله بررسی آماری و بهینه‌سازی شرایط استخراج عصاره گیاه پرسیاوشان با روش فراصوت و بهینه‌سازی آن با استفاده از طرح مرکب مرکزی برای اولین بار انجام شده است. در این ارتباط پارامترهای مقدار پودر گیاه، حجم حلال، زمان استخراج و دمای حمام فراصوت انتخاب شدند. نتایج نشان می‌دهد که مدل ریاضی درجه دوم با دقت بالایی به منظور پیش‌بینی مقادیر بهینه پارامترهای مورد مطالعه عمل کرده است. همچنین نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که نتایج پیش‌بینی شده مدل‌های ساخته شده با نتایج تجربی همخوانی مناسبی دارد. شرایط بهینه در استخراج ترکیبات فنل و

فلاونوئید عصاره گیاه پرسیاوشان مقادیر متغیر به صورت مقدار پودر شده گیاه (۰/۷ g)، حجم حلال (۱۶ ml)، دمای حمام فراصوت (۴۰ °C) و زمان امواج فراصوت (۲۰ min) تنظیم شد. تحت این شرایط میزان بازده استخراج برای ترکیبات تام فنلی و فلاونوئیدی به ترتیب ۹/۴۶ mg/g و ۵/۲۲ mg/g به دست آمد.

مشارکت نویسندگان

این مقاله مستخرج از پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد رشته شیمی آلی با نام فاطمه احمد وندی با استاد راهنمایی دکتر سعید خدادوست و استاد مشاوره خانم دکتر فاطمه زراعت پیشه بوده است.

تضاد منافع

در این تحقیق هیچ گونه تضاد منافی وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

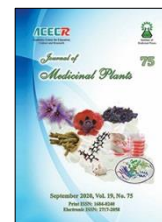
نویسندگان این مقاله از همکاری دانشگاه صنعتی خاتم الانبیا بهبهان کمال تشکر و قدرانی را دارند.

منابع

1. Kunle OF, Eghareba HO and Ahmadu PO. Standardization of herbal medicines-a review. *Int J Biodivers Conserv*. 2012; 4(3): 101-112.
2. Jabernia H, Piri KH and Nazai J. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. *Food Chem*. 2013; 136: 237-244.
3. Fernando W, Rupasinghe HPV and Hoskin DW. Dietary phytochemicals with anti-oxidant and pro-oxidant activities: A double-edged sword in relation to adjuvant chemotherapy and radiotherapy? *Cancer Lett*. 2019; 452: 168-177.
4. Dira AI, Alsaadi DHM, Wada, Mohamed MA, Watanabe and Devkota HP. Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. *S. Afr. J. Bot*. 2019; 120: 261-267.
5. Sen S, De B, Naykant D and Chakraborty R. Total phenolic, total flavonoid content and antioxidant capacity of leave of meyna spinose Roxb. *J. Nat. Med*. 2013; 11(2): 0144-0157.

6. Elkins AC, Deseo MA, Rochfort S, Ezernieks V and Spangenberg G. Development of a validated method for the qualitative and quantitative analysis of cannabinoids in plant biomass and medicinal cannabis resin extracts obtained by super-critical fluid extraction. *J. Chromatogr. B*. 2019; 1109: 76-83.
7. Fourie E, Aleixandre-Tudo JL, Mihnea M and Toit W. Partial least squares calibrations and batch statistical process control to monitor phenolic extraction in red wine fermentations under different maceration conditions. *Food Control*, 2020; 115: 107303.
8. Wang L and Waler CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.*, 2006; 17: 300-312.
9. Liu G, Zhuang L, Song D and Lu C. Isolation, purification, and identification of the main phenolic compounds from leaves of celery (*Apium graveolens* L. var. *dulce* Mill./Pers.). *J. Sep. Sci.* 2017; 40(2): 472-479.
10. Izadian P and Hemmateenejad B. Multi-response optimization of factors affecting ultrasonic assisted extraction from Iranian basil using central composite design, *Food Chem.* 2016; 190: 864-870.
11. Nasirizadeh N, Dehghanizadeh H, Yazdanshenas E and Rohanimoghadam M. optimization of wool dyeing with rutin as natural by central composite design method. *Ind. Crops Prod.* 2012; 40: 367-366.
12. Pourmorad F, Hosseinimehr SJ and Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.* 2006; 5(11): 1142-1145.
13. Dehdari S and Hajimehdipoor H. Medicinal properties of *Adiantum capillus-veneris* Linn. in traditional medicine and modern phytotherapy A Review Article. *Iran J. Public Health*. 2018; 47(2): 188-197.
14. Yaan Q, Zhang X, Liu Z, Song S, Xue P, Wang J and Raan J. Ethanol extract of *Adiantum capillus-veneris* L. suppresses the production of inflammatory mediators by inhibiting NF-KB activation. *J. Ethnopharmacol.* 2013; 147(3): 603-611.
15. Rawat P, Singh PK and Kumar V. Evidence based traditional anti-diarrheal medicinal plants and their phytochemicals, *Biomed. Pharmacother.* 2017; 96: 1453-1464.
16. Verma N. Effect of *Adiantum capillus veneris* against irradiation-induced oxidative stress in adult rats. *Toxicol. Lett.* 2017; 280, S96.
17. Kasabri V, Al-Hallaq EK, Bustanji YK, Abdul-Razzak KK, Abaza IF, and Afifi FU. Antiobesity and antihyperglycaemic effects of *Adiantum capillus-veneris* extracts: in vitro and in vivo evaluations. *Pharm. Biol.* 2017; 55: 164-172.
18. McDonald S, Prenzler PD, Autolovich M and Robards K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chem.* 2001; 73: 73-84.

How to cite this article: Khodadoust S, Ahmadvandi F, Zeraatpisheh F. Optimization of phenol and flavonoid extraction compound of *Adiantum capillus-verass* L using ultrasound assisted extraction. *Journal of Medicinal Plants* 2020; 19(75): 312-326. doi: 10.29252/jmp.19.75.312



Research Article

Optimization of phenol and flavonoid extraction compound of *Adiantum capillus-veneris* L. using ultrasound assisted extraction

Saeid Khodadoust*, Fatemeh Ahmadvandi, Fatemeh Zeraatpisheh

Department of Chemistry, Faculty of sciences, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Keywords:</p> <p>Ultrasound Central composite design Phenol Flavonoid Extraction Optimization <i>Adiantum capillus-veneris</i> L.</p>	<p>Background: Antioxidants are molecules which able to control free radicals and prevent the oxidants of other molecules considering undesirable effects of synthetic anti oxidant. In recent years using of natural anti oxidant gets the great importance. The secondary metabolisms of plants are rich sources of phenol and flavonoids considered as the most important natural antioxidant. Objective: In this research, the optimization process of phenolic and flavonoids from <i>Adiantum capillus-veneris</i> L. carried out by ultrasound-assisted extraction (UAE) and central composite design (CCD). Methods: Optimization process were performed with four indepent variables including, plant powder (0.1 - 0.9 g), volume of solvent (5 - 17 ml), sonication time (5 - 25 min) and temperature of ultrasonic bath (20 - 60 °C) on five levels including 26 test with 2 repetition on central point. The total phenolic content and total flavonoid content, respectively, were accounted by using foline-ciocalteu and aluminum chloride colorimetric method. Results: At optimum conditions values of variables set at 0.7 g of plant powder, 16 ml of extraction solvent, 20 min for ultrasound waves and 40 °C for ultrasonic bath. Conclusion: The results show that the quadratic mathematical model has acted with high accuracy to predict the optimal values of the studied parameters. Under these conditions, the extraction efficiencies for total phenol and flavonoid compounds were 9.46 mg/g and 5.22 mg/g, respectively.</p>

Abbreviations: RSM ,Response Surface Method; CCD, Central Composite Design; RNS, Reactive nitrogen species; ROS, Reactive oxygen speices

* Corresponding author: Khodadoust@bkatu.ac.ir

doi: [10.29252/jmp.19.75.312](https://doi.org/10.29252/jmp.19.75.312)

Received 17 December 2019; Received in revised form 20 August 2020; Accepted 21 August 2020

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)