

## بهینه‌سازی فرآیند استخراج ترکیبات زیست فعال از عصاره میوه ولیک سیاه (*Crataegus elbursensis*) با روش سطح پاسخ

اکرم شریفی<sup>۱\*</sup>، علیرضا بصیری<sup>۲</sup>، محمدرضا شریفی<sup>۳</sup> و ریحانه احمدزاده قوبدل<sup>۴</sup>

۱- استادیار گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی صنایع و مکانیک، واحد قزوین، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین، ایران

۲- استادیار گروه صنایع غذایی و تبدیلی، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

۳ و ۴- به ترتیب: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد؛ و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۹

### چکیده

میوه ولیک سیاه منبع سرشاری از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌ویژه فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌هاست که اثرهای سلامت‌بخش به‌ویژه در پیشگیری از بیماری‌های قلبی - عروقی دارد. در این تحقیق، اثر دما و زمان استخراج با فرآیند فراصوت بر راندمان استخراج، قدرت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و میزان کل ترکیبات فنولی و آنتوسیانینی عصاره میوه ولیک سیاه بررسی شده است. عصاره در دماهای متفاوت (۴۵، ۵۵ و ۶۵ درجه سلسیوس) و زمان‌های مختلف (۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه) با کمک فراصوت در نسبت ثابت نمونه به حلال (۱ به ۸) و شدت ثابت امواج فراصوت (۳۵ کیلوهرتز) استخراج شد. میزان کل ترکیبات فنولی و آنتوسیانینی عصاره به روش اسپکتروفتومتری و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از دو روش بر مبنای درصد مهار رادیکال‌های آزاد (۲ و ۲ دی‌فنیل - ۱- پیکریل هیدرازیل DPPH) بر حسب EC<sub>50</sub> و قدرت احیاکنندگی یون‌های آهن سه ظرفیتی تعیین گردید. شرایط بهینه با هدف بیشینه‌سازی راندمان استخراج و مقدار کل ترکیبات فنولی و آنتوسیانینی، قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و احیاکنندگی آهن عصاره تعیین شد. نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که در شرایط بهینه (مدت ۲۹/۸۴ دقیقه و دمای ۶۴/۵۸ درجه سلسیوس)، راندمان استخراج با ۱۴/۲۶ درصد، مقدار کل ترکیبات فنولی و آنتوسیانینی به ترتیب ۱/۳۸ و ۷/۳۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، EC<sub>50</sub>=۰/۰۹۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و قدرت احیاکنندگی آهن ۲۴۷/۳۱ میکرومول بر لیتر است. با توجه به مقدار بالای ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصاره ولیک سیاه می‌توان به عصاره این میوه به‌عنوان یک افزودنی طبیعی و عملگر برای کاربرد در مواد غذایی توجه کرد.

### واژه‌های کلیدی

آنتوسیانین، ترکیبات فنولی، فراصوت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی

### مقدمه

که به‌صورت خودرو در برخی نواحی ایران می‌روید. میوه‌های آن گرد تا بیضی‌شکل و رنگ آنها زرد، قرمز، ارغوانی و سیاه است (Sabeti, 1997).

ولیک سیاه (*Crataegus elbursensis*) درختچه‌ای است خاردار با ارتفاع حداکثر ۷/۵ متر

استخراج ترکیبات طبیعی به کمک فراصوت به دلیل مزایایی مانند راندمان بالا، مصرف انرژی پایین، نیاز کمتر به حلال، سرعت بالا، سادگی فرآیند و هزینه‌های پایین در مقایسه با روش‌های رایج عصاره‌گیری، در سالیان اخیر در بخش‌های مختلف صنعت از جمله بخش غذایی و دارویی مورد توجه قرار گرفته است. مکانیسم اصلی استخراج با امواج فراصوت به پدیدهٔ حباب‌زایی<sup>۶</sup> مربوط می‌شود. عبور امواج فراصوت باعث جابه‌جایی طولی ذرات و به‌دنبال آن ایجاد توالی انقباض و انبساط در محیط می‌شود. با افزایش انرژی جنبشی و عبور فاصلهٔ مولکولی از حد بحرانی، پدیدهٔ حباب‌زایی در مایع شکل می‌گیرد که قادر به رشد در مراحل انبساط و کاهش اندازه در سیکل‌های انقباض هستند. هنگامی که اندازهٔ این حباب‌ها به نقطهٔ بحرانی می‌رسد، آنها در چرخهٔ انقباض متلاشی می‌شوند و فشار و حرارت بالای آزاد شده باعث ایجاد میکروجت‌ها می‌شود. اصابت این میکروجت‌ها به سطح باعث سایش، شکستگی و تخریب دیواره‌های سلولی غشای گیاهی و آزادسازی محتوای آنها در محیط می‌شود. عواملی مانند میزان رطوبت اولیه، اندازهٔ ذرات، نوع حلال، فرکانس، فشار، دما و زمان فرآیند استخراج با امواج فراصوت را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Fernandes et al., 2008).

تأثیر امواج فراصوت در استخراج ترکیبات طبیعی در تحقیقات متعددی بررسی شده است. چن و همکاران (Chen et al., 2006) استخراج رنگ‌دانهٔ آنتوسیانین از تمشک قرمز با فراصوت را بررسی و با راندمان ۳۴/۵ میلی‌گرم آنتوسیانین بر ۱۰۰ گرم میوهٔ تازه بر پایهٔ سیانیدین-۳-گلایکوزید نشان دادند که این روش استخراج در مقایسه با روش‌های دیگر به‌دلیل تخریب سریع بافت میوه، راندمان بالاتری

ساقه‌های جوان و سبز آن دارای گلیکوزید، میوه تازه حاوی اسیدهای سیتریک و تارتاریک، کراتاگوس<sup>۱</sup>، پکتین، روغن‌های چرب و گلوکز و فروکتوز است و در هستهٔ آن ماده آمیگدالین<sup>۲</sup> و در گل‌های آن تری‌متیل‌آمین، کوئرستین<sup>۳</sup> و کوئرستین<sup>۴</sup> یافت می‌شود (Fatemi, 2004). ولیک سیاه جایگاه ویژه‌ای در صنایع دارویی دارد که دلیل آن برخورداری از ترکیبات فنولی به‌ویژه فلاوونوئیدها و آنتوسیانین‌ها و به‌دنبال آن، اثرهای مفید درمانی مانند حفاظت در برابر بیماری‌های قلبی-عروقی، کاستن از فشار خون و کلسترول، اثر آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد، ضدویروسی، ضدالتهابی، رفع ناراحتی‌های گوارشی، سوءهاضمه و اسهال است.

اثرهای جانبی نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی کاربرد آنان را با محدودیت‌های روزافزونی روبه‌رو ساخته است. از سوی دیگر، افزایش درخواست مصرف‌کنندگان برای فرآورده‌های غذایی فاقد افزودنی‌های شیمیایی، نیاز به ترکیبات طبیعی با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش داده است. بسیاری از گیاهان ترکیبات پلی‌فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی دارند و می‌توانند علاوه بر جایگزینی با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، اثرهای سلامت‌بخشی نیز در مادهٔ غذایی داشته باشند (Sharif et al., 2009). ترکیبات فنولی نقش مهمی بر ویژگی‌های کیفی و حسی مواد غذایی دارند و افزون بر آن، دارای فعالیت‌های فیزیولوژیکی همانند اثرهای آنتی‌اکسیدانی، ضد جهش یا ضد میکروبی هستند. برخی از محققان، ترکیبات شیمیایی عصارهٔ ولیک سیاه را بررسی کرده‌اند و وجود ترکیبات کوئرستین، روتین<sup>۵</sup> و پروآنتوسیانین‌ها در عصاره و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن را نشان داده‌اند (Askari et al., 2003).

شمال کشور (نوشهر) و پاکسازی و جداسازی ناخالصی‌ها، در پوشش‌های پلاستیکی و در دمای ۱۸- درجه سلسیوس و تا موقع آزمایش در فریزر نگهداری شد (Abotalebian et al., 2006). ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در آزمایش‌ها همگی درجه خلوص بالا داشتند و از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند.

### عصاره‌گیری

نمونه‌ها پس از بیرون آوردن از فریزر، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار داده شدند و گوشت میوه + هسته در هاون چینی کوبیده شد. در مرحله بعد، نمونه‌های کوبیده شده با مخلوط اتانول ۹۶ درصد- اسید کلریدریک ۲۴ درصد (۸۵ : ۱۵) به نسبت ۱ به ۸ (نمونه به حلال) مخلوط و درون حمام اولتراسونیک (Bandelin، مدل DT 510H، آلمان) در دماها و زمان‌های تحت بررسی به ترتیب (۱۰، ۲۰ و ۳۰ درجه سلسیوس) و (۴۵، ۵۵ و ۶۵ دقیقه) در معرض امواج فراصوت در فرکانس ثابت ۳۵ کیلوهرتز و با توان ۱۰۰ وات بر متر مربع قرار داده شدند. عصاره‌های استخراج شده با استفاده از قیف بوختر و کاغذ صافی واتمن شماره ۵ از مواد جامد گیاهی جدا گردید. به منظور جداسازی حلال، عصاره‌های حاصل در دستگاه تبخیرکننده چرخشی تحت خلأ (Heidolph، مدل Laborota 4002، آلمان) در دمای ۴۵ درجه سلسیوس قرار داده شد و پس از آن در آن تحت خلأ (Binder مدل VD23، آلمان) در دمای ۴۵ درجه سلسیوس خشک شدند. نمونه‌های خشک شده سپس در پلیت‌های در بسته، در فریزر و در دمای ۱۸- درجه سلسیوس تا هنگام آزمایش‌ها نگهداری گردیدند (Pedramnia et al., 2010).

دارد. پدramنیا و همکاران (Pedramnia et al., 2010) فرآیند استخراج آنتوسیانین زرشک با امواج فراصوت را بررسی و غلظت آنتوسیانین‌های عصاره و تفاله زرشک را به روش pH افتراقی و بر حسب آنتوسیانین غالب زرشک (سیانیدین-۳-گلایکوزید) محاسبه کردند. نتایج به دست آمده نشان داد بیشترین مقدار آنتوسیانین، به میزان ۱۷۱/۲۶۰ میلی گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر محلول، در عصاره و تفاله‌ای است که با استفاده از امواج فراصوت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان ۲۰ دقیقه استخراج شده بود؛ و نیز اینکه با کاربرد امواج فراصوت برای استخراج آنتوسیانین‌ها، زمان فرآیند کاهش و سرعت آن افزایش یافت.

گسترده‌ی رویش ولیک سیاه در مناطق جنگلی شمال ایران و دارا بودن ترکیبات عملگرا، تحقیق در خصوص روش‌های نوین استخراج عصاره میوه آن، به منظور افزایش راندمان استخراج به همراه حفظ ویژگی‌های مثبت را الزامی می‌سازد. هدف از این تحقیق، بررسی اثر دما و مدت (زمان) فرآیند استخراج با کمک فراصوت بر راندمان استخراج، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و مقدار کل ترکیبات فنولی و آنتوسیانینی عصاره میوه ولیک سیاه و تعیین شرایط بهینه با هدف بیشینه‌سازی راندمان استخراج و مقدار کل ترکیبات فنولی و آنتوسیانینی، قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد و احیاکنندگی آهن عصاره است.

### مواد و روش‌ها

میوه ولیک سیاه، *Crataegus elbursensis* در اوایل مهرماه از منطقه کجور (نوشهر، مازندران)، جمع‌آوری و پس از تأیید گونه در باغ گیاه‌شناسی

### تعیین راندمان استخراج

راندمان استخراج از رابطه ۱ تعیین و به صورت درصد بیان گردید (Bahmanabadi, 2011).

$$(1) \quad \text{راندمان استخراج (درصد)} = \left(\frac{W_2}{W_1}\right) \times 100$$

که در آن،

$W_1$  = وزن عصاره خشک شده (گرم)؛ و  $W_2$  = وزن اولیه نمونه‌ها (گرم).

### تعیین میزان کل ترکیبات آنتوسیانینی

میزان ترکیبات آنتوسیانینی کل عصاره به روش اسپکتروفتومتری بر مبنای اختلاف pH اندازه‌گیری شد. برای آماده‌سازی عصاره به‌منظور اندازه‌گیری آنتوسیانین، ابتدا بافر pH=۱ شامل ۱۲۵ میلی‌لیتر کلرید پتاسیم ۰/۲ مولار و ۳۳۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ مولار، و بافر pH=۴/۵ شامل ۴۰۰ میلی‌لیتر استات سدیم ۱ مولار و ۲۴۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱ مولار و ۳۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد.

پس از آن، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با بافر pH = ۱ به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده و پس از گذشت ۱۵ دقیقه میزان جذب قرائت شد. سپس، ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره با بافر pH=۴/۵ به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده و بعد از ۵ دقیقه میزان جذب با اسپکتروفتومتر (uv/vis) JENWAY مدل 6305، انگلستان) تعیین شد. میزان کل ترکیبات آنتوسیانینی با رابطه ۲ تعیین گردید. میزان جذب ماکزیمم براساس آنتوسیانین غالب میوه ولیک سیاه، سیانیدین-۳-گلیکوزید، در طول موج ۵۱۱ نانومتر به‌دست آمد (Fuleki & Francis, 1968).

$$(2) \quad \text{میزان آنتوسیانین کل (میلی گرم/میلی لیتر)}$$

$$= \Delta a \times M \times D / \epsilon \times L$$

که در آن،

$M$  = جرم مولکولی سیانیدین-۳-گلیکوزید (۴۴۹/۲ گرم بر مول)؛  $D$  = فاکتور رقت؛  $\epsilon$  = جذب مولی سیانیدین-۳-گلیکوزید (۲۹۶۰۰ لیتر/مول سانتی‌متر)؛ و  $L$  = طول سل (سانتی‌متر).

### تعیین میزان کل ترکیبات فنلی

میزان کل ترکیبات فنلی با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌گرم اسیدگالیک در گرم عصاره بیان شد. به نیم میلی‌لیتر عصاره، ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو ده بار رقیق شده (۱ میلی‌لیتر فولین سیوکالتیو به حجم ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر رسید) اضافه و پس از اختلاط به‌مدت ۳ دقیقه در حالت سکون قرار داده شد تا واکنش صورت پذیرد. پس از آن، ۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد به فاز آبی اضافه و بعد از یک دقیقه با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. نمونه ۲۴ ساعت نگهداری و سپس جذب آن در طول موج ۷۶۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر (uv/vis) JENWAY مدل 6305، انگلستان) در مقابل بلانک خوانده شد. آزمایش‌ها ۳ بار تکرار و میانگین آنها گزارش شد. از اسید گالیک (غلظت ۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. مقدار ترکیبات فنولی بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نمونه برابر رابطه ۳ محاسبه شد (Bahmanabadi, 2011).

$$(3) \quad \begin{aligned} P &= Y / W \times 1000 \\ Y &= 1.0776 x^2 + 0.2644 x + 0.0099 \end{aligned}$$

که در آن،

$P$  = مقدار کل ترکیبات فنلی (میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره)؛  $W$  = وزن نمونه؛  $x$  = جذب نمونه - جذب شاهد.

۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از این مدت، جذب محلول‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. از لوله آزمایش فاقد آمونیوم فرسولفات به‌عنوان شاهد استفاده گردید. برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره، به ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس به‌دست آمده ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP اضافه شد و پس از طی مراحل آزمایش مطابق محلول‌های استاندارد، جذب محلول‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر نسبت به شاهد (شامل ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر همراه با ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP)، اندازه‌گیری شد. با قراردادن مقدار جذب نمونه‌ها در رابطه ۵، توانایی احیاکنندگی عصاره محاسبه شد (Fan et al., 2008).

$$Y = 1782 X - 9.211 \quad (5)$$

که در آن،

$X$  = جذب نمونه - جذب شاهد؛  $Y$  = میکرومول آهن بر لیتر؛ و  $X$  = جذب خوانده شده در طول موج ۵۹۵ نانومتر.

#### آنالیز آماری

از روش آماری سطح پاسخ، طرح مرکب مرکزی و نرم‌افزار Design Expert (Statease، ویرایش ۸) با دو متغیر دما و زمان فرآیند استخراج و پنج نقطه مرکزی، برای بررسی ارتباط متغیرهای فرآیند و پاسخ‌های تحت بررسی و بهینه‌سازی شرایط فرآیند، استفاده شد. برای بررسی معنی‌دار بودن اثر متغیرها در سطح ۵ درصد، تجزیه واریانس به‌کار برده شد. مقادیر عددی متغیرهای مستقل در جدول ۱ و نقشه آزمایش‌ها و مقادیر پاسخ‌ها در جدول ۲ آورده شده است.

#### قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار) به ۳ میلی‌لیتر از عصاره (با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) افزوده و مخلوط به‌دست آمده به‌شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به‌مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار داده شدند. بعد از این مدت، میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH از رابطه ۴ محاسبه شد.

$$(\%) = 100 \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \quad (4)$$

آزاد DPPH

که در آن،

$A_0$  = جذب شاهد؛ و  $A_1$  = جذب نمونه.

پس از رسم نمودار درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد در برابر غلظت ترکیب آنتی‌اکسیدانی منحنی مناسب روی داده‌ها برازش داده شد و سپس غلظتی را که در آن ترکیب آنتی‌اکسیدانی قادر به مهار کردن ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد است تحت عنوان  $EC_{50}$  محاسبه گردید (Zarban et al., 2004).

#### توانایی احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی<sup>۲</sup> (FRAP)

برای رسم منحنی استاندارد کاتیون آهن دوظرفیتی، محلول پایه‌ای از آمونیوم فرسولفات ۱ میلی‌مولار آماده شد. پس از آن، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول، در لوله‌های آزمایش ریخته و حجم هریک با آب مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس به هر یک از لوله‌ها ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP اضافه شد. مخلوط حاصل به‌خوبی ورتکس گردید و به‌مدت ۴ دقیقه در دمای

جدول ۱- متغیرهای تحت بررسی و سطوح آنان

متغیرهای مستقل	کد و سطوح مربوطه		
	-۱	۰	+۱
دما (درجه سلسیوس)	۴۵	۵۵	۶۵
زمان B (دقیقه)	۱۰	۲۰	۳۰

جدول ۲- نمایش طراحی آزمون و مقادیر پاسخها

آزمایش	دما (درجه سلسیوس)	زمان (دقیقه)	راندمان استخراج (درصد)	میزان کل		EC <sub>50</sub> (میلی گرم بر میلی لیتر)	قدرت احیاکنندگی آهن (میکرومول آهن بر لیتر)
				ترکیبات آنتوسیانینی (میلی گرم بر میلی لیتر)	ترکیبات فنلی (میلی گرم بر میلی لیتر)		
۱	۶۵	۳۰	۱۳/۶۷	۱/۲۷	۷/۳۲	۰/۱۱	۲۳۶/۷۰
۲	۵۵	۲۰	۱۱/۶۷	۱/۱۳	۳/۶۹	۰/۲۴	۱۴۴/۰۴
۳	۴۵	۳۰	۹/۱۷	۱/۱۷	۳/۳۷	۰/۴۳	۱۲۳/۷۵
۴	۵۵	۲۰	۱۱/۳۳	۱/۳۳	۳/۵۰	۰/۲۹	۱۳۹/۹۶
۵	۵۵	۳۰	۱۳/۳۳	۱/۳	۶/۰۸	۰/۲۰	۲۱۰/۱۸
۶	۵۵	۲۰	۱۰/۳۳	۱/۲۹	۳/۰۰	۰/۲۹	۱۵۰/۴۵
۷	۴۵	۲۰	۸/۵	۱/۱۴	۲/۸۲	۰/۵۹	۱۰۱/۲۷
۸	۶۵	۲۰	۱۳/۹۷	۱/۳۶	۴/۶۵	۰/۳۱	۱۷۹/۰۹
۹	۵۵	۲۰	۹/۶۷	۱/۱۲	۴/۰۹	۰/۲۳	۱۶۲/۰۵
۱۰	۴۵	۱۰	۷/۳۳	۱/۰۰	۳/۱۸	۰/۳۲	۱۷۷/۸۹
۱۱	۵۵	۲۰	۱۱/۵	۱/۳۶	۳/۳۱	۰/۳۴	۱۶۷/۸۴
۱۲	۶۵	۱۰	۸/۶۷	۱/۳۵	۳/۱۸	۰/۵۰	۱۴۲/۲۵
۱۳	۵۵	۱۰	۹/۰۰	۱/۰۹	۳/۶۲	۰/۳۱	۱۲۹/۷۸

## نتایج و بحث

### برازش مدل

مدل حذف و سایر جمله‌های دارای اختلاف معنی‌دار در مدل حفظ شدند (Noshad et al., 2011).

### اثر متغیرهای تحت بررسی بر راندمان استخراج

دمای استخراج (A) و زمان استخراج (B) بر راندمان استخراج در مدل خطی، اثر معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) داشتند (جدول ۳). اثر دما و زمان بر راندمان استخراج در شکل ۱ نیز نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که با افزایش زمان و دما، راندمان استخراج عصاره افزایش می‌یابد. بهمن‌آبادی (Bahmanabadi, 2011) با بهینه‌سازی شرایط استخراج عصاره زرشک با فناوری اولتراسوند نشان

مدل مناسب با توجه به معنی‌دار بودن آزمون F، ( $p \leq 0.01$ )، و معنی‌دار نبودن فقدان برازش، ( $P \leq 0.05$ )، و همچنین مقادیر  $R^2$  و  $R^2$  تعدیل شده و ضریب تغییرات انتخاب شد. با توجه به جدول‌های تجزیه واریانس می‌توان دریافت که مدل برازش داده شده برای تمام پارامترهای مورد بررسی کاملاً معنی‌دار است ( $p \leq 0.01$ ). برای بررسی پارامترهای اثرگذار در مطالعه با توجه به جدول تجزیه واریانس، جمله‌های فاقد آزمون F معنی‌دار ( $P \leq 0.05$ ) از

بهینه‌سازی فرآیند استخراج ترکیبات زیست فعال...

امواج فراصوت نشان دادند که با افزایش دما و زمان فرآیند، راندمان استخراج افزایش می‌یابد و شرایط بهینه عصاره‌گیری، دمای ۶۶/۸۱ درجه سلسیوس و زمان ۸۵/۴۳ دقیقه است.

بنابراین، با توجه به پارامترهای دارای اثر معنی‌دار، معادله برازش داده شده در مورد این پاسخ این گونه است (رابطه ۶):

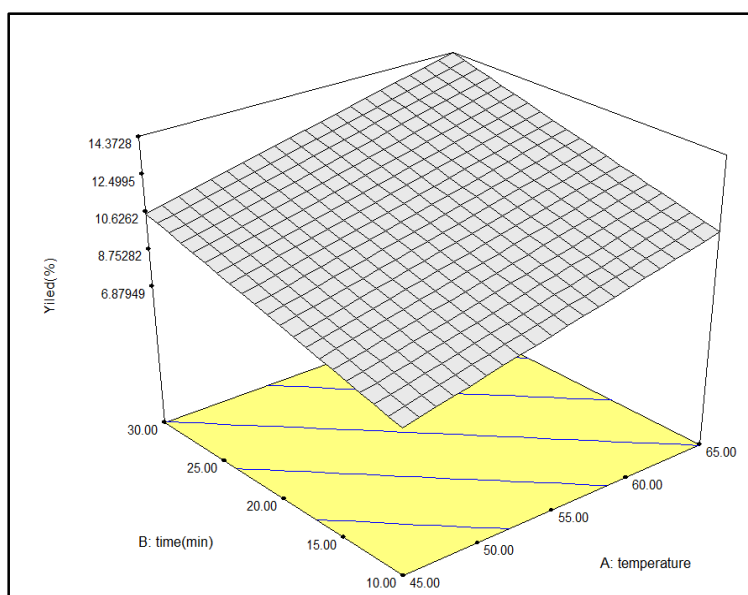
$$Y = + 10/63 + 1/89 A + 1/86 B \quad (6)$$

داد که با افزایش زمان، راندمان استخراج عصاره افزایش پیدا می‌کند که دلیل آن را افزایش مدت انتقال جرم می‌داند. لئو و لی (Lieu & Le, 2010) راندمان استخراج عصاره از انگور با امواج فراصوت را بررسی و اعلام کردند با افزایش دما و زمان، راندمان استخراج افزایش می‌یابد و شرایط بهینه فرآیند، دمای ۷۴ درجه سلسیوس و زمان ۱۳ دقیقه است. شنگ و همکاران (Sheng et al., 2012) با بررسی فرآیند عصاره‌گیری *Forsythia suspensa* با کمک

جدول ۳- تجزیه واریانس مدل خطی - بازده استخراج (درصد)

منابع تغییر	ضریب	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	Prob > F
Model	-	۴۲/۱۱	۲	۲۱/۰۶	۱۶/۲۴	۰/۰۰۰۷*
Intercept	۱۰/۶۳	-	-	-	-	-
A	۱/۸۹	۲۱/۳۲	۱	۲۱/۳۲	۱۶/۴۴	۰/۰۰۲۳
B	۱/۸۶	۲۰/۷۹	۱	۲۰/۷۹	۱۶/۰۳	۰/۰۰۲۵
Lack of Fit	-	۹/۹۹	۶	۱/۶۷	۲/۲۴	۰/۲۲۷۵ <sup>ns</sup>
R-Squared	-	۰/۷۶	-	-	-	-
Adj R-Squared	-	۰/۷۲	-	-	-	-

※: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد و ns: نبود اختلاف معنی‌دار



شکل ۱- اثر متغیرهای دما و زمان بر راندمان استخراج

### اثر متغیرهای تحت بررسی بر میزان کل ترکیبات آنتوسیانینی

مشخص شد دمای استخراج (A) و زمان استخراج (B) بر میزان کل ترکیبات آنتوسیانینی اثر معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) دارند (جدول ۴). اثر دما و زمان روی میزان کل ترکیبات آنتوسیانینی در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش زمان تا ۳۰ دقیقه و دما تا ۶۵ درجه سلسیوس، راندمان استخراج ترکیبات آنتوسیانینی عصاره افزایش می‌یابد. در عصاره‌گیری با استفاده از امواج فراصوت ایجاد کایتاسیون در اثر امواج موجب حرکت و جابه‌جایی مولکولی حلال و نمونه می‌گردد (Chen *et al.*, 2006) مرتضوی و همکاران (Mortazavi *et al.*, 2014) در بهینه‌سازی استخراج آنتوسیانین از میوه زرشک بی‌دانه نشان دادند که افزایش زمان استخراج منجر به افزایش بازده استخراج آنتوسانین می‌شود. اما دما تأثیر کمتری بر پاسخ مورد نظر دارد. تانگ- بین و همکاران (Tang- Bin *et al.*, 2011) اثر متغیر زمان استخراج (۲۰ تا ۱۰۰ دقیقه) با امواج فراصوت بر میزان کل ترکیبات آنتوسیانینی شاه‌توت را بررسی کردند و نشان دادند

که با افزایش زمان استخراج از ۲۰ تا ۴۰ دقیقه، میزان کل ترکیبات آنتوسیانینی افزایش می‌یابد اما در بازه زمانی ۴۰ تا ۱۰۰ دقیقه، با افزایش زمان استخراج، میزان کل ترکیبات آنتوسیانینی تقریباً ثابت باقی می‌ماند که دلیل احتمالی آن ایجاد شرایط تعادلی بین حلال و مواد استخراج شده است و بیشینه میزان کل ترکیبات آنتوسیانینی در زمان ۴۰ دقیقه، برابر با ۵۶/۱۴ میلی‌گرم بر گرم است. یانگ و ژای (Yang & Zhai, 2010) با بررسی فرآیند استخراج ترکیبات آنتوسیانینی از دانه‌های ذرت ارغوانی با فراصوت نشان دادند که با افزایش زمان استخراج، میزان کل ترکیبات آنتوسیانینی افزایش می‌یابد. فان و همکاران (Fan *et al.*, 2008) با بررسی استخراج ترکیبات آنتوسیانینی از سیب‌زمینی شیرین ارغوانی می‌گویند رابطه‌ای خطی بین زمان و دمای استخراج با میزان کل ترکیبات آنتوسیانینی وجود دارد و با افزایش دما و زمان استخراج، میزان کل ترکیبات آنتوسیانینی افزایش می‌یابد. معادله برازش داده شده در مورد این پاسخ به‌صورت رابطه ۷ است:

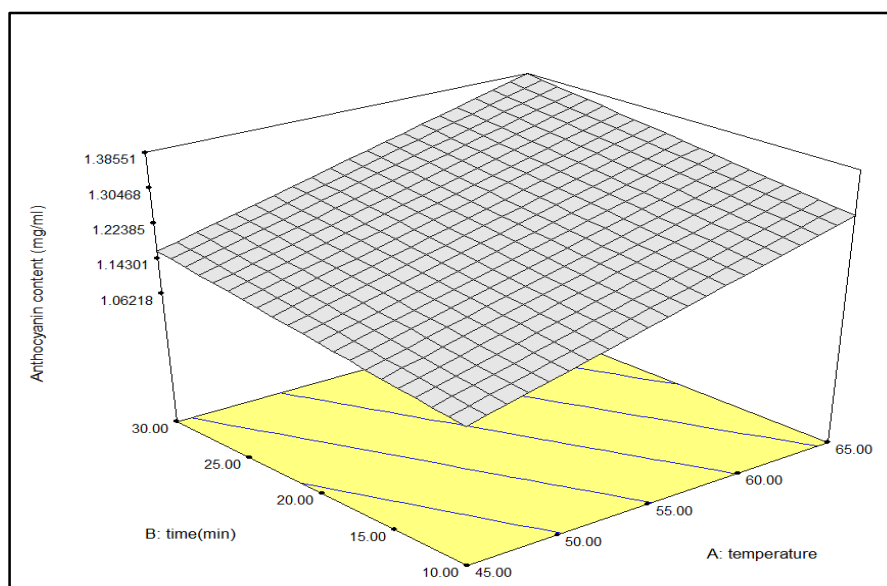
$$Y = +1/22 + 0/11 A + 0/05 \cdot B \quad (7)$$

جدول ۴- تجزیه واریانس مدل خطی- میزان کل ترکیبات آنتوسیانینی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

منابع تغییر	ضریب	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	Prob > F
Model	-	۰/۰۹۰	۲	۰/۰۴۵	۵/۳۳	۰/۰۲۶۶*
Intercept	۱/۲۲	-	-	-	-	-
A	۰/۱۱	۰/۰۷۵	۱	۰/۰۷۵	۸/۸۸	۰/۰۱۳۸
B	۰/۰۵۰	۰/۰۱۵	۱	۰/۰۱۵	۱/۷۸	۰/۲۱۱۸
Lack of Fit	-	۰/۳۳	۶	۰/۰۰۵۴	۰/۴۳	۰/۸۳۰۸ <sup>ns</sup>
R-Squared	-	۰/۷۱۵۹	-	-	-	-
Adj R-Squared	-	۰/۷۱۹۰	-	-	-	-

\*: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد و ns: نبود اختلاف معنی‌دار





شکل ۲- اثر متغیرهای دما و زمان بر میزان کل ترکیبات آنتوسیانینی

در دماهای بالاتر استخراج به‌دنبال دارد (Gan & Bahmanabadi, 2011). Latiff, (2011) بهمین‌آبادی (Bahmanabadi, 2011) با بررسی فرآیند استخراج عصاره از زرشک با امواج فراصوت نشان داد که با افزایش زمان فرآیند تا ۲۰ دقیقه، میزان کل ترکیبات فنولی عصاره به‌صورت پیوسته افزایش می‌یابد اما از ۲۰ دقیقه بیشتر، تفاوت معنی‌داری در میزان کل ترکیبات فنولی عصاره، برجای نمی‌گذارد. چن و همکاران (Chen *et al.*, 2006) نشان دادند که با افزایش نسبت نمونه به حلال در زمان‌های کوتاه استخراج، میزان کل ترکیبات فنولی افزایش اما همین تغییر در زمان‌های طولانی‌تر استخراج، کاهش میزان کل ترکیبات فنولی را بدنبال خواهد داشت. دلیل این امر می‌تواند ورود ناخالصی‌ها به حلال در زمان‌های تماس طولانی باشد. بررسی اثر زمان در فرآیند استخراج ترکیبات فنولی از سبوس گندم با امواج فراصوت نشان داد که با افزایش زمان از ۱۰ تا ۳۰ دقیقه، میزان کل ترکیبات فنولی عصاره به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد اما با افزایش زمان در محدوده ۳۰ تا ۵۰

### تأثیر زمان و دما بر میزان کل ترکیبات فنولی

نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد دمای استخراج (A)، زمان استخراج (B)، اثر درجه دوم زمان ( $B^2$ ) و جمله اثر متقابل دما و زمان (A-B) بر میزان کل ترکیبات فنولی، اثر معنی‌دار دارند (جدول ۵). اثر درجه دوم دما ( $A^2$ ) معنی‌دار نیست و از مدل حذف شد. اثر دما و زمان بر میزان کل ترکیبات فنولی، در شکل ۳ نشان داده شده است، با افزایش زمان و دما، همان‌طور که مشاهده می‌شود، میزان کل ترکیبات فنولی عصاره افزایش می‌یابد. اثر مشاهده شده طی زمان را می‌توان به افزایش مدت انتقال جرم نسبت داد. اثر مثبت دما در افزایش میزان استخراج ترکیبات فنولی نیز در تحقیقات چند تن از محققان به اثبات رسیده است. در واقع، دماهای بالاتر استخراج می‌تواند منجر به نرم‌شدن بافت گیاهی، تخریب اتصالات ترکیبات فنولی با پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها و افزایش قابلیت آن حلال ترکیبات فنولی شود که این اثر می‌تواند انتقال جرم را بهبود دهد. این امر نیز افزایش میزان استخراج ترکیبات فوق را

ترکیبات فنولی می‌شود ولی اثر متقابل دما و زمان بر میزان استخراج معنی دار نیست. معادلهٔ برازش داده شده در مورد این پاسخ به صورت رابطهٔ ۸ است:

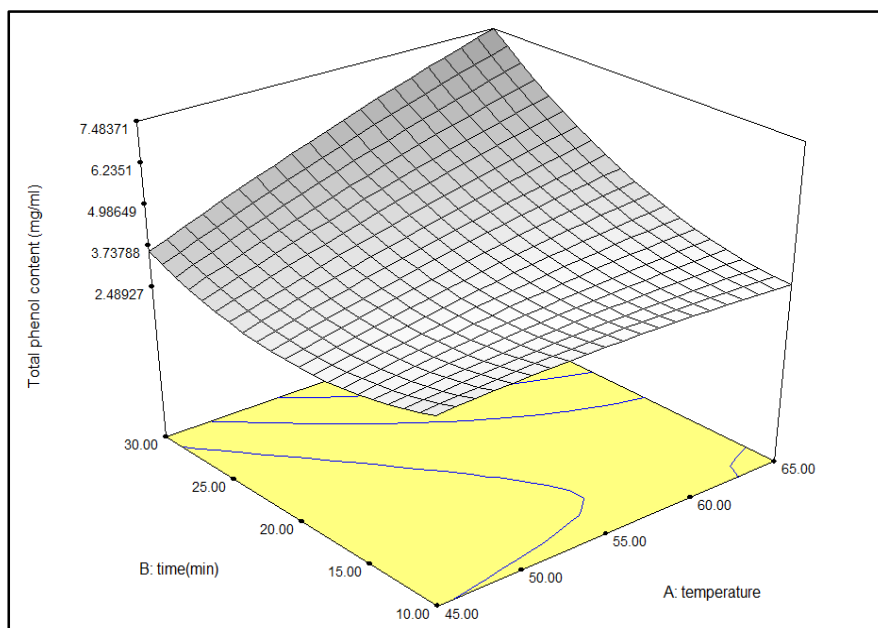
$$Y = + 3/63 + 0/96A + 1/13 B + 0/94 B^2 + 0/99 AB \quad (8)$$

دقیقه، میزان کل ترکیبات فنولی عصاره، تقریباً ثابت باقی ماند (Wang *et al.*, 2008). مرتضوی و همکاران (Mortazavi *et al.*, 2014) تأثیر زمان و دما بر میزان کل ترکیبات فنولی استخراج شده از میوهٔ زرشک بیدانه را بررسی کردند و نشان دادند که افزایش دما و زمان منجر به افزایش بازده استخراج

جدول ۵- تجزیهٔ واریانس مدل چند جمله‌ای درجهٔ دوم - میزان ترکیبات فنولی (میلی گرم بر میلی لیتر)

منابع تغییر	ضریب	مجموع مربعات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	Prob > F
Model	-	۱۹/۷۳	۵	۳/۹۵	۲۳/۹۹	۰/۰۰۰۳*
Intercept	۳/۶۳	-	-	-	-	-
A	۰/۹۶	۵/۵۷	۱	۵/۵۷	۳۳/۸۶	۰/۰۰۰۷
B	۱/۱۳	۷/۶۸	۱	۷/۶۸	۴۶/۷۳	۰/۰۰۰۲
A <sup>2</sup>	-۰/۱۷	۰/۰۸۱	۱	۰/۰۸۱	۰/۴۹	۰/۵۰۵۱
B <sup>2</sup>	۰/۹۴	۲/۴۶	۱	۲/۴۶	۱۴/۹۶	۰/۰۰۶۲
AB	۰/۹۹	۳/۹۰	۱	۳/۹۰	۲۳/۷۲	۰/۰۰۱۸
Lack of Fit	-	۰/۴۸	۳	۰/۱۶	۰/۹۶	۰/۴۹۲۳ <sup>ns</sup>
R-Squared	-	۰/۹۴۴۹	-	-	-	-
Adj R-Squared	-	۰/۹۰۵۵	-	-	-	-

\*: اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد و ns: نبود اختلاف معنی دار



شکل ۳- اثر متغیرهای دما و زمان بر میزان کل ترکیبات فنولی

### تأثیر زمان و دما بر میزان EC<sub>50</sub>

اثر دمای استخراج (A) و زمان استخراج (B) و اثر درجه دوم دما (A<sup>2</sup>) و جمله اثر متقابل دما و زمان (A-B) بر EC<sub>50</sub> معنی‌دار (p < 0.05) است، در حالی که اثر درجه دوم زمان (B<sup>2</sup>)، معنی‌دار نیست و از این رو از مدل حذف شد (جدول ۶). اثر دما و زمان بر قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد، در شکل ۴ نیز نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش زمان و دما، قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد عصاره افزایش می‌یابد. این پارامتر عکس EC<sub>50</sub> است یعنی با افزایش زمان و دمای استخراج، مقدار EC<sub>50</sub> کاهش پیدا می‌کند.

محققان بسیاری گزارش کرده‌اند که میزان ترکیبات فنولی تأثیر بسزایی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد که این امر به‌دلیل قابلیت احیاکنندگی بالای این ترکیبات و نیز توانایی دادن هیدروژن به رادیکال‌های فعالی نظیر DPPH است. پس می‌توان اثر افزایش زمان و دمای استخراج را در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌راحتی توجیه کرد (Mortazavi et al., 2014).

شاددل و همکاران (Shaddel et al., 2011)، نشان دادند که دما و زمان استخراج بر قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH اثر معنی‌داری دارند به گونه‌ای که با افزایش دما و زمان، میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH افزایش نشان می‌دهد (EC<sub>50</sub> کمتر).

دونگ‌روی و همکاران (Dong-rui et al., 2011) اثر دما و زمان استخراج را بر قدرت مهارکنندگی

رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره میوه گیلاس بررسی کردند و نشان دادند که با افزایش دما از ۳۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس، قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH افزایش می‌یابد. با ادامه افزایش دما، به‌دلیل افزایش تجزیه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH کاهش می‌یابد. از سوی دیگر، نشان داده شد که با افزایش زمان استخراج از ۵ تا ۳۰ دقیقه قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH افزایش می‌یابد.

لای و همکاران (Lai et al., 2013) قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره لوبیای سویا را در دماهای ۲۰ تا ۷۵ درجه سلسیوس و زمان‌های ۱۰ تا ۵۰ دقیقه بررسی کردند و گزارش دادند افزایش دمای استخراج تا ۳۰ درجه سلسیوس به افزایش قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH می‌انجامد و افزایش دما بیش از این مقدار، باعث کاهش آن می‌شود. از سوی دیگر، افزایش زمان استخراج تا ۳۰ دقیقه، افزایش قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH را به‌دنبال خواهد داشت اما در زمان‌های طولانی‌تر، این قدرت مهارکنندگی کاهش می‌یابد.

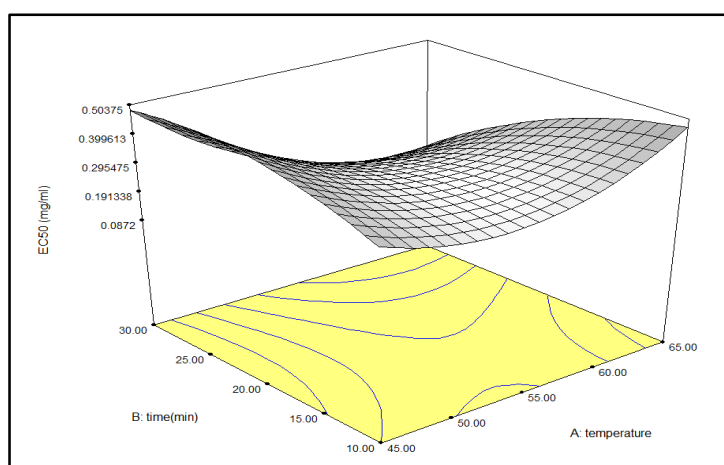
بنابراین، با توجه به پارامترهای دارای اثر معنی‌دار، معادله برازش داده شده در مورد تأثیر زمان و دما بر میزان EC<sub>50</sub> به‌صورت رابطه ۹ است:

$$Y = +0.070 - 0.299A - 0.065B + 0.13A^2 - 0.13AB \quad (9)$$

جدول ۶ - تجزیه واریانس مدل چند جمله‌ای درجه دوم - پارامتر فعالیت آنتی اکسیدانی (mg/ml EC<sub>50</sub>)

منابع تغییر	ضریب	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	Prob > F
Model	-	۰/۱۶	۵	۰/۰۳۳	۸/۲۱	۰/۰۰۷۷*
Intercept	۰/۲۹	-	-	-	-	-
A	-۰/۰۷۰	۰/۰۲۹	۱	۰/۰۲۹	۷/۳۲	۰/۰۳۰۴
B	-۰/۰۶۵	۰/۰۲۵	۱	۰/۰۲۵	۶/۳۱	۰/۰۳۰۴
A <sup>2</sup>	۰/۱۳	۰/۰۴۷	۱	۰/۰۴۷	۱۱/۶۳	۰/۰۱۱۳
B <sup>2</sup>	-۰/۰۶۵	۰/۰۱۲	۱	۰/۰۱۲	۲/۹۱	۰/۱۳۲۰
AB	-۰/۱۳	۰/۰۶۲	۱	۰/۰۶۲	۱۵/۵۷	۰/۰۰۵۶
Lack of Fit	-	۰/۰۲۰	۳	۰/۰۰۶	۳/۴۲	۰/۱۳۲۸ <sup>ns</sup>
R-Squared	-	۰/۸۵۴۳	-	-	-	-
Adj R-Squared	-	۰/۷۵۰۱	-	-	-	-

\*: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد و ns: نبود اختلاف معنی‌دار



شکل ۴- اثر متغیرهای دما و زمان بر EC<sub>50</sub>

#### قدرت احیاکنندگی آهن

دمای استخراج (A)، زمان استخراج (B) و جمله اثر متقابل دما و زمان (A-B) بر قدرت احیاکنندگی آهن اثر معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) دارند، در حالی که جمله‌های درجه دوم فاقد اثر معنی‌دار هستند و از این رو از مدل حذف شدند (جدول ۷). اثر دما و زمان بر قدرت احیاکنندگی آهن در شکل ۵ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که با افزایش زمان و دما، قدرت احیاکنندگی آهن عصاره افزایش می‌یابد.

شاددل و همکاران (Shaddel *et al.*, 2011)، استخراج ترکیبات زیست فعال از پوست بنه را با آب دمای زیربهرانی بررسی کردند و گزارش دادند با افزایش دما و زمان استخراج، قدرت احیاکنندگی آهن افزایش نشان می‌دهد. حساس رودسری و همکاران (Hassas-Roudsari *et al.*, 2009) اثر دو دمای ۱۱۰ و ۱۶۰ درجه سلسیوس را در استخراج عصاره کنجاله کلزا با آب دمای زیربهرانی بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که اختلاف معنی‌داری بین قدرت احیاکنندگی در این دو دما وجود ندارد.

بهینه‌سازی فرآیند استخراج ترکیبات زیست فعال...

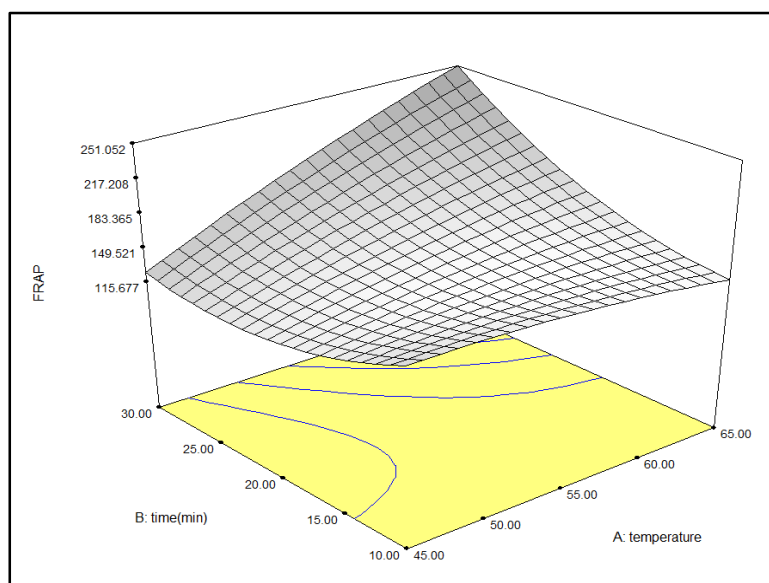
$$Y = + 151/09 + 25/86 A + 20/12 B + 37/15 AB \quad (10)$$

معادله برازش داده شده در مورد این پاسخ به صورت رابطه ۱۰ است:

جدول ۷- تجزیه واریانس مدل چند جمله‌ای درجه دوم - پارامتر قدرت احیاکنندگی آهن (میکرومول آهن بر لیتر)

منابع تغییر	ضریب	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	Prob > F
Model	-	۱۳۴۷۹/۴۹	۵	۲۶۹۶/۹۰	۷/۸۸	۰/۰۰۸۶*
Intercept	۱۵۱/۰۹	-	-	-	-	-
A	۲۵/۸۶	۴۰۱۰/۸۹	۱	۴۰۱۰/۸۹	۱۱/۷۳	۰/۰۱۱۱
B	۲۰/۱۲	۲۴۲۸/۴۸	۱	۲۴۲۸/۴۸	۷/۱۰	۰/۰۳۲۲
A <sup>2</sup>	-۶/۴۸	۱۱۶/۰۴	۱	۱۱۶/۰۴	۰/۳۴	۰/۵۷۸۵
B <sup>2</sup>	۲۳/۳۲	۱۵۰۱/۷۴	۱	۱۵۰۱/۷۴	۴/۳۹	۰/۰۷۴۴
AB	۳۷/۱۵	۵۵۱۹/۷۵	۱	۵۵۱۹/۷۵	۱۶/۱۴	۰/۰۰۵۱
Lack of Fit	-	۱۸۳۵/۰۹	۳	۶۱۱/۷۰	۴/۳۸	۰/۰۹۳۸ <sup>NS</sup>
R-Squared	-	۰/۸۴۹۲	-	-	-	-
Adj R-Squared	-	۰/۷۴۱۵	-	-	-	-

\*: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد و NS: نبود اختلاف معنی‌دار



شکل ۵- اثر متغیرهای دما و زمان بر قدرت احیاکنندگی آهن

تحلیل‌های آماری مورد نظر قرار گرفت. شرایط عملیاتی بهینه، با استفاده از تکنیک بهینه‌سازی عددی<sup>۱</sup> تعیین شد. بدین منظور، هدف‌های بهینه‌سازی، سطوح پاسخ و متغیرهای مستقل تنظیم شد. با

تعیین شرایط بهینه استخراج در فرآیند استخراج عصاره میوه ولیک، دستیابی به بیشترین میزان ترکیبات فنولی، آنتوسیانین و نیز حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بازده استخراج به‌عنوان هدف‌های مورد نظر آزمایش‌ها در تجزیه و

استفاده از تکنیک تابع مطلوبیت<sup>۲</sup>، بهترین پاسخها شرایط بهینه برای متغیرها و پاسخهای مورد آنالیز، به دست آمد (جدول ۸). مطلوبیت به دست آمده در ۱ بود.

جدول ۸- شرایط بهینه استخراج

قدرت	EC <sub>50</sub>	میزان کل	میزان کل ترکیبات	راندمان استخراج	زمان (دقیقه)	دما (درجه سلسیوس)
احیاکنندگی آهن	(میلی گرم بر میلی لیتر)	ترکیبات فنلی	آنتوسیانینی	(درصد)		
(میکرومول آهن بر لیتر)		(میلی گرم بر میلی لیتر)	(میلی گرم بر میلی لیتر)			
۲۴۷/۳۱	۰/۰۹۷	۷/۳۵	۱/۳۸	۱۴/۲۶	۶۴/۵۸	۲۹/۸۴

### نتیجه گیری

به دست آمده از دیگر تحقیقات مشابه روی میوه‌ها و مقدار بالای ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصاره و لیک سیاه می‌توان به عصاره این میوه به عنوان یک افزودنی طبیعی و عملگر برای کاربرد در مواد غذایی توجه کرد. روش سطح پاسخ نیز ابزاری سودمند برای بهینه سازی متغیرهای فرایند استخراج ترکیبات زیست فعال میوه و لیک است تا بتوان از این شرایط بهینه در صنعت بهره جست.

نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که در شرایط بهینه (زمان ۲۹/۸۴ دقیقه و دمای ۶۴/۵۸ درجه سلسیوس)، راندمان استخراج با ۱۴/۲۶ درصد، مقدار کل ترکیبات فنولی و آنتوسیانینی به ترتیب ۱/۳۸ و ۷/۳۵ میلی گرم بر میلی لیتر،  $EC_{50} = 0/097$  میلی گرم بر میلی لیتر، و قدرت احیاکنندگی آهن ۲۴۷/۳۱ میکرومول بر لیتر است. با بررسی نتایج

### مراجع

- Abotalebian, M., Keramat, J. and Dokhani, S. H. 2006. Extraction of phenolic compounds in leaves of peppermint, pune and basil and comparing their antioxidant effect in sunflower oil. M. Sc. Thesis, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Isfahan University. (in Persian)
- Askari, S., Naderi, G. H., Ghanadi, A., Gharipour, M. and Golban, S. 2003. Effect of chamomile, yarrow and hawthorn plants on increasing the resistance of red blood cells and protecting thiol groups (-SH) against oxidizing substances. Journal of Medicinal Plants. 2(6): 41-48.
- Bahmanabadi, J. 2011. Extraction optimization of barberry extract by ultrasound technology using the response surface method. M. Sc. Thesis. Islamic Azad University, Quchan Branch. (in Persian)
- Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J. and Wang, Z. 2006. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using HPLC – MS. Ultrasonics Sonochemistry. 14, 767-778.
- Dong-rui, Y., Lei, G., Shu-jun, W. and Fu-quan, X. 2011. Response surface optimization of extraction process for dpph free radical scavenging components from cherry seed. Food Science. 32(22): 46-50.
- Fan, G., Yonbin, H., Zhenxin, G. and Deming, C. 2008. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). LWT-Food Science and Technology. 41(1): 155-160.
- Fatemi, H. 2004. Food Chemistry. Publishing Company. 4<sup>th</sup> Printing. (in Persian)
- Fernandes, F. A. N., Linhares, F. E. J. and Rodrigues, S. 2008. Ultrasound as pre-treatment for drying of pineapple. Ultrason Sonochem. 15(6): 1049-1054.

- Fuleki, T. and Francis, F. J. 1968. Quantitative methods for anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *Journal of Food Science*. 33, 78-83
- Gan, C. Y. and Latiff, A. A. 2011. Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. *Food Chemistry*. 124, 1277-1283.
- Hassas-Roudsari, M., Chang, P. R., Pegg, R. B. and Tyler, R. T. 2009. Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. *Food Chemistry*. 114, 717-726.
- Lai, J., Xin, C., Zhao, Y., Feng, B., He, C., Dong, Y., Fang, Y. and Wei, S. 2013. Optimization of ultrasonic assisted extraction of antioxidants from black soybean (*glycine max var*) sprouts using response surface methodology. *Molecules*. 18(1): 1101-1110.
- Lieu, N. L. and Le, V. V. M. 2010. Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing. *Ultrasonics Sonochemistry*. 17(1):273-279.
- Mortazavi, S. A., Sharifi, A., Maskooki, A., Niakousari, M. and Elhamirad, A. H. 2014. Optimisation of bioactive compounds extraction from barberry fruit (*berberis vulgaris*) using response surface methodology. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*. 3(1): 11-24.
- Noshad, M., Mohebbi, M., Shahidi, F. and Mortazavi, S. A. 2011. Multi-objective ptimization of osmotic-ultrasonic pretreatments and hot-air drying of quince using response surface methodology. *Food Bioprocess Technology*. 5(6): 2098-2110. Doi: 10.1007/s11947-011-0577-8.
- Pedramnia, A., Sharifi, A. and Tavakolipour, H. 2010. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in barrbery. *Innovation in Food Science and Technology (Journal of Food Science and Technology)*. 2 (4): 53-64.
- Sabeti, H. 1997. *Forests, Trees and Shrubs of Iran*. Tehran University Press. (in Persian)
- Shaddel, R., Haddad-Khodaparast, M. H., Maskooki, A., Sharif, A. and Azadmard-Damirchi, S. 2011. Evaluation of bene hull extraction antioxidant activity by superheated water method. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*. 2(1):73-84.
- Sharif, A., Farhoosh, R., Khodaparast, M. M. H. and Tavassoli-Kafrani, M. H. 2009. Antioxidant activity of bene hull oil compared with sesame and rice bran oils during the frying process of sunflower oil. *Journal of Food lipids (JFL)*. 16(3): 394- 406.
- Sheng, Z., Li, J. and Li, Y. 2012. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phillyrin from *forsythia suspensa* using response surface methodology. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(9): 1633-1644.
- Tang-Bin, Z., Min, W., Ren-You, G. and Wen-Hua, L. 2011. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from mulberry, using response surface methodology. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(5): 3006-3017.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., and Li, X. 2008. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*. 106, 804-810.
- Yang, Z. and Zhai, W. 2010. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC – MS. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11, 470-476.
- Zarban, A., Malakane, M., Hasanpour, M., Najari, M. and Abad, M. 2004. Evaluation of antioxidant properties of 28 medicinal plants in Iran. *Scientific Journal of Birjand University of Medical Sciences*. 11(1): 9-15. (in Persian)

## Optimization of Bioactive Compounds Extraction from Black Hawthorn Fruit (*Crataegus elbursensis*) using Response Surface Methodology

A. Sharifi\*, A. R. Basiri, M. R. Sharifi and R. Ahmadzadeh-Ghavidel

\* Corresponding Author: Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Industrial and Mechanical Engineering, Qazvin Branch, Islamic Azad University, Qazvin, Iran. Email: asharifi@qiau.ac.ir  
Received: 19 June 2018, Accepted: 19 January 2019

### Abstract

Black hawthorn fruit (*Crataegus elbursensis*) is a source of natural antioxidants, especially flavonoids and anthocyanins, which have health effects, especially in the prevention of cardiovascular disease. This study was conducted to determine the effect of temperature and time of ultrasonic-assisted extraction process on extraction efficiency, free radical-scavenging activity and total phenolic and anthocyanin contents of hawthorn fruit. Ultrasonic-assisted extraction process was done at different temperatures (45, 55 and 65 °C) and times (10, 20 and 30 min) and constant sample-to-solvent ratio (1 to 8) and ultrasound frequency (35 KHz). Total phenolic and anthocyanin contents were measured spectrophotometrically and the antioxidant activity of extract was assessed by measuring DPPH radical-scavenging activity ( $EC_{50}$ ) and  $Fe^{3+}$  reducing power. Statistical data analysis showed that at optimal conditions (extraction time 28.85 min and extraction temperature (64.86°C), extraction efficiency, total phenolic and anthocyanin contents, free radical-scavenging activity and  $Fe^{3+}$ -reducing power were 14.31%, 1.38 mg/ml, 7.41 mg/ml, 0.102 mg/ml and 248.79  $\mu$ mol/l, respectively. Due to the high amount of bioactive compounds in the black hawthorn extract, the extract of this fruit can be considered as a natural additive and an agent for use in food.

**Keywords:** Anthocyanin, Antioxidant activity, Phenolic compounds, Ultrasound