

*Research Article***Optimization of microwave-assisted extraction of bioactive compounds from aerial parts of *Catharanthus roseus* L.**Parivash Zandi<sup>1</sup>, Mandana Bimakr<sup>2\*</sup>, Ali Ganjloo<sup>2</sup>

1. MSc of Food Technology, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

2. Associate Professor, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

(Received 3 July 2022, Received in revised form 4 August 2022, Accepted 9 August 2022)

**Introduction:** One of the most widely used conventional methods for bioactive compounds recovery from natural sources is Soxhlet extraction. But this process showed different disadvantages such as longer extraction time and large consumption of solvent, which limited its application for bioactive compounds recovery. One of the green and new emerging technologies for plant extractions is microwave-assisted extraction (MAE). This technology has recently received much attention as an alternative means to extract bioactive compounds from plant materials. MAE has noted to possess a number of advantages over a more traditional solvent extraction, including rapid extraction and less consumption of an extraction solvent. Parvansh with the scientific name *Catharanthus roseus* L. is native to the island of Madagascar. This plant is cultivated in many tropical and subtropical regions. *C. roseus* is an evergreen plant and has flowers with beautiful and varied colors from pink to purple. Parvansh has medicinal uses in Spain, United States, China, Africa, India and Southern Europe and in Iran. Parvansh cultivated in Khuzestan, Bushehr, Hormozgan, sistan and Baluchestan provinces and rarely in Tehran. This study aimed to optimize the MAE conditions for maximum recovery of bioactive compounds from *C. roseus* using response surface methodology (RSM). Furthermore, a comparative study was carried out between MAE and Soxhlet methods to determine the most preferable process for bioactive compounds recovery from *C. roseus* aerial parts.

**Materials and methods:** A microwave-assisted extractor apparatus with maximal microwave power of 1000 W at a frequency of 2450 MHz was used for extraction of bioactive compounds from *C. roseus* aerial parts. Microwave power (100-300 W), sample to solvent ratio (1:20-1:40 w/v) and microwave irradiation time (9-14 min) were independent variables. Optimization was performed using numerical technique with the aim of maximizing the extraction yield and total phenolic content. A binary solvent composed of ethanol (EtOH) and water (H<sub>2</sub>O) was selected as an efficient and safe extraction solvent. For performing Soxhlet extraction, About 5 gram of ground sample were put in a thimble holder and covered with wool. Thimble was transferred into a Soxhlet apparatus. Approximately, 200 mL of binary ethanol was added to extraction flask which was connected to the extractor. During extraction, the thimble holder was gradually filled with condensed fresh solvent used for extraction from a distillation flask. Each extraction was performed for 6 h in triplicate. The responses were considered as crude extraction yield and total phenolic compounds for numerical optimization process. However, the free radical scavenging activity of extracts obtained using optimized conditions were determined in terms of DPPH and HO free radical scavenging capacity (%DPPHsc and %HOsc). Box-Behnken design (BBD; Design Expert Software, Trial version 12, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) of Response Surface Methodology (RSM) was conducted to optimize the three independent variables, namely, microwave power (X1), solid to solvent ration (X2), and irradiation time (X3), with low (-1), medium (0), and high levels (+1) for each independent variable.

**Results and discussion:** In the present study, the effect of MAE independent variables including microwave power, sample-to-solvent ratio, and irradiation time were investigated and optimized for efficient recovery of

---

\* Corresponding author: [mandanabimakr@znu.ac.ir](mailto:mandanabimakr@znu.ac.ir)

bioactive compounds from *C. roseus* aerial parts. The model  $p$ -value was less than 0.05 indicating that the models were statistically significant. The Analysis of variance (ANOVA) results and regression coefficients of linear, quadratic, and interaction terms of independent variables showed that all independent variables studied had significant ( $p < 0.05$ ) effect on responses. According to the results, the obtained quadratic polynomial model fits well with the experimental data with a high coefficient of determination (0.99). In a desirable and acceptable statistical model, the adjusted coefficient of determination ( $R^2_{adj}$ ) is close to the coefficient of determination, which is obvious in the present study. The lack of fit test is non-significant ( $p > 0.05$ ) in the case of pure error. Also, the coefficient of variation (CV) in low values indicates a small difference between experimental and predicted values, as well as high accuracy and reliability of experimental data. Therefore, the fitted quadratic polynomial model is suitable for predicting the response within the range of the studied variables). The optimum MAE conditions were determined as 250 W microwave power, 11 min microwave irradiation time and (1:33 w/v) ratio of sample to solvent. Under these conditions, TPC and yield were determined as 118.40 mg GAE/g and 18.21%, respectively. There was no significant difference between experimental and predicted values of the responses, which showed the accuracy of the optimization process. The traditional Soxhlet method was used to evaluate the efficiency of MAE technology. According to the results, the yield obtained under the optimal conditions of MAE was around 60% related to the results from Soxhlet. However, in terms of free radical scavenging activity and total phenolic compounds the MAE extract was significantly better than those obtained using Soxhlet extraction ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** In this study, it was shown that *C. roseus* aerial part is a potential source of valuable bioactive compounds, which highlighted its importance for further utilization in food applications. Furthermore, MAE process was successfully optimized using RSM based on BBD to obtain the highest values of TPC and crude extraction yield simultaneously. A comparative study was also carried out between MAE and Soxhlet extraction to determine the efficiency of MAE process. It was revealed that lower quantity of extracts could be obtained using MAE compared with Soxhlet process while; the TPC and free radical scavenging activity of bioactive compounds was considerably better. Therefore, it could be stated that MAE is an efficient green technology for successful recovery of bioactive compounds from *C. roseus* aerial part.

**Keywords:** *Catharanthus roseus* L., Microwave-assisted extraction, Optimization, Total phenolic content.

**How to cite this article:**

Zandi, P., Bimakr, M., Ganjloo, A., (2023). Optimization of microwave-assisted extraction of bioactive compounds from aerial parts of *Catharanthus roseus* L. *Innov. Food Technol.*, 10(2), 153-169.

### مقاله پژوهشی

## بهینه‌سازی استخراج ترکیبات زیست‌فعال از اندام هوایی پروانش به کمک مایکروویو

پریوش زندی<sup>۱</sup>، ماندانا بی مکر<sup>۲\*</sup>، علی گنجلو<sup>۲</sup>

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد فناوری مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان  
۲. دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

(تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۰۴/۱۲، تاریخ آخرین بازنگری: ۱۴۰۱/۰۵/۱۳، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۱۸)

### چکیده

در این مطالعه استخراج ترکیبات زیست‌فعال از اندام هوایی پروانش با کمک مایکروویو بر اساس روش‌شناسی سطح-پاسخ و طرح باکس-بنکن بررسی و بهینه‌یابی شد. قدرت مایکروویو (۱۰۰-۳۰۰ W)، نسبت نمونه به حلال (۱:۴۰-۱:۲۰ w/v) و مدت زمان تابش مایکروویو (۹-۱۴ min) متغیرهای مستقل مورد بررسی در این مطالعه بودند. بهینه‌یابی با استفاده از تکنیک عددی و با هدف به حداکثر رساندن عملکرد کمی استخراج و میزان ترکیبات فنولی کل صورت پذیرفت. بر اساس نتایج به دست آمده اثر کلیه متغیرهای مستقل مورد مطالعه بر پاسخ‌ها (عملکرد کمی استخراج و میزان ترکیبات فنولی کل) معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). شرایط بهینه استخراج به کمک امواج مایکروویو با قدرت مایکروویو ۲۵۰ W، مدت زمان تابش مایکروویو ۱۱ min و نسبت نمونه به حلال ۱:۳۳ w/v به دست آمد. تحت شرایط بهینه میزان عملکرد کمی استخراج و میزان ترکیبات فنولی کل به ترتیب ۱۱۸/۲۱٪ و ۱۱۸/۴۰ mg GAE/g بود. از روش سنتی سوکسله جهت بررسی کارایی فناوری استخراج به کمک امواج مایکروویو استفاده شد. روش سنتی از لحاظ کمی عملکردی بهتر ( $0.29/68 \pm 0.19$ ) اما از لحاظ کیفی (میزان ترکیبات فنولی کل ( $16/0 \pm 19/18$  mg GAE/g) و میزان فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH ( $10/17 \pm 0/14$ ) و HO ( $8/34 \pm 0/17$ ) عملکردی کمتر از روش استخراج به کمک مایکروویو داشت. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که با استفاده از روش استخراج به کمک مایکروویو می‌توان به ترکیبات زیست‌فعال فنولی بیشتر و با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوب در مدت زمان کوتاه‌تر و با مصرف انرژی کمتر دست یافت.

واژه‌های کلیدی: پروانش، استخراج به کمک مایکروویو، بهینه‌سازی، میزان ترکیبات فنولی کل.

## ۱. مقدمه

سرشار از ترکیبات زیست‌فعال می‌باشند، از اهمیت بسزایی برخوردار است. باید توجه داشت که وجود گزارش‌هایی مبنی بر بروز عوارض نامطلوب ناشی از مصرف ترکیبات ضد اکسایشی مصنوعی نظیر بوتیلات هیدروکسی تولوئن<sup>۴</sup>، بوتیلات هیدروکسی آنیزول<sup>۵</sup> و غیره اهمیت این موضوع را دوچندان می‌کند [۶].

یکی از مهم‌ترین اقدامات برای استحصال ترکیبات زیست‌فعال از منابع مختلف گیاهی انتخاب روش استخراج است [۷]. به‌طور کلی، می‌توان روش‌های استخراج ترکیبات زیست‌فعال را به روش‌های سنتی (بر اساس تقطیر بخار آب یا استخراج با حلال آلی) و روش‌های نوین شامل استخراج به کمک امواج فراصوت، استخراج به کمک دی‌اکسید کربن فوق بحرانی و آب فوق گرم تقسیم‌بندی کرد. روش‌های سنتی معمولاً به‌صرف زمان‌های طولانی و استفاده از مقادیر زیاد حلال نیاز دارند لذا محققان همواره در حال تلاش برای یافتن روش‌های نوین و یا ارتقاء روش‌های موجود برای جایگزینی با روش‌های سنتی بوده‌اند. از جمله روش‌های نوین استخراج ترکیبات زیست‌فعال می‌توان به فناوری استخراج به کمک مایکروویو اشاره نمود. فناوری مایکروویو به‌عنوان یکی از مؤثرترین و سریع‌ترین روش‌های استخراج ترکیبات زیست‌فعال از منبع مختلف نظیر دور ریزهای غذایی [۸]، پوست آوآکادو [۹]، زعفران [۱۰] و برگ‌های گردو [۱۱] معرفی شده است. برخلاف روش‌های سنتی، در فناوری مایکروویو گرمایش به‌صورت حجمی رخ می‌دهد یعنی تمام قسمت‌ها به‌طور هم‌زمان همگی با یک سرعت گرم می‌شوند. بنابراین، حلال خیلی سریع به نقطه جوش خود می‌رسد که نهایتاً منجر به انجام فرایند در زمان‌های بسیار کوتاه می‌شود [۱۲]. استفاده از مقادیر کمتر حلال، کارایی بالاتر و تکرارپذیری آن از دیگر مزایای این فناوری در مقایسه با روش‌های سنتی بشمار می‌رود. به‌علاوه اینکه در صورت کنترل صحیح این فناوری برای استخراج ترکیبات حساس به حرارت نیز مناسب می‌باشد [۱۳]. به‌طور کلی، این فناوری را می‌توان تحت تأثیر متغیرهای مختلفی نظیر مقدار و ماهیت

از دیرباز گیاهان دارویی یکی از اولین و در دسترس‌ترین منابع مورد استفاده برای انسان بوده‌اند که متأسفانه در دهه‌های اخیر به‌دلیل توسعه و پیشرفت داروهای شیمیایی و صنعتی مصرف آنها محدود شده است. گیاه پروانش با نام علمی *Catharanthus roseus* L. متعلق به خانواده خرزه گیان<sup>۱</sup> است. پروانش از معدود گیاهان دارویی است که سابقه درمانی طولانی در فرهنگ عامیانه بین‌النهرین دارد [۱]. پروانش بومی جزیره ماداگاسکار از اقیانوس هند است و در بسیاری از مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری به‌عنوان یک گیاه زینتی معرفی شده است. این گیاه به‌صورت تجاری در اسپانیا، ایالات‌متحده آمریکا، چین، آفریقا، هند و جنوب اروپا کاربردهای دارویی دارد [۲]. پروانش در ایران نیز در استان‌های خوزستان، بوشهر، هرمزگان، سیستان و بلوچستان و به‌ندرت در تهران کاشت می‌شود. نتایج تحقیقات صورت پذیرفته حاکی از آن است که گیاه پروانش دارای ترکیبات با ارزش زیست‌فعال است که هم از نظر بیولوژیکی (خواص ضد اکسایشی) و هم از نظر پزشکی (خواص ضدالتهابی و ضد میکروبی) حائز اهمیت هستند [۳]. هم‌چنین، خاصیت ضد سرطانی دو ترکیب آلکالوئیدی این گیاه شامل وینبلاستین<sup>۲</sup> و وینکریستین<sup>۳</sup> برای درمان انواع سرطان نظیر سرطان سینه و سرطان پوست تأیید شده است [۴].

از جمله مهم‌ترین فعالیت‌های بیولوژیکی ترکیبات زیست‌فعال فعالیت ضد اکسایشی است. از این رو، این ترکیبات با ارزشمند در ارتقاء سیستم دفاعی ضد اکسایشی بدن برای مقابله با رادیکال‌های آزاد تولیدشده در نتیجه تنش اکسیداتیو می‌توانند مؤثر واقع شوند [۵]. از طرف دیگر، ترکیبات زیست‌فعال با داشتن گروه‌های هیدروکسیل قابلیت خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد را دارند و می‌توانند به‌عنوان ترکیبات اهداءکننده هیدروژن یا الکترون از اکسیداسیون چربی و لیپیدها که از عوامل اصلی افت کیفیت مواد غذایی بشمار می‌روند ممانعت به عمل آورند [۵]. بنابراین شناسایی و استفاده از منابع گیاهی خصوصاً گیاهان دارویی که منابع

1. Apocynaceae
2. Vinblastine
3. Vincristine

4. Butylated hydroxytoluene (BHT)
5. Butylated hydroxyanisole (BHA)

**۲.۲. استخراج ترکیبات زیست‌فعال به روش سوکسله**  
 به‌منظور انجام فرایند استخراج ترکیبات زیست‌فعال به روش سوکسله ابتدا مقدار ۵ g از نمونه خشک‌شده را در انگستانه ریخته و سطح آن توسط پشم شیشه پوشانده شد. سپس ۲۰۰ ml اتانول (۸۰٪) به آن افزوده شد و فرایند استخراج به مدت ۶ h انجام گردید. پس از اتمام فرآیند، مخلوط از کاغذ صافی عبور داده شد و حلال مورد نظر با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخان تحت خلاء در دمای ۴۵ °C حذف گردید. سپس نمونه به‌دست‌آمده برای انجام آزمون‌های بعدی در محل تاریک با دمای ۱۸ °C - نگهداری شد.

### ۲.۳. استخراج ترکیبات زیست‌فعال به کمک مایکروویو

به‌منظور استخراج ترکیبات زیست‌فعال به کمک مایکروویو، ابتدا مقدار مشخصی از نمونه با حلال (اتانول ۸۰٪) مخلوط و به یک بالن انتقال داده شد. فرایند استخراج در دستگاه استخراج‌گر مایکروویو با در نظر گرفتن سه متغیر مستقل شامل قدرت مایکروویو (۱۰۰-۳۰۰ W)، نسبت نمونه به حلال (۱:۲۰-۱:۴۰ w/v) و مدت زمان اعمال مایکروویو (۹-۱۴ min) انجام شد. لازم به توضیح است که انتخاب محدوده متغیرهای مستقل مورد مطالعه براساس آزمایش‌های اولیه انجام پذیرفت. پس از اتمام فرایند، مخلوط از کاغذ صافی عبور داده شد و به‌منظور حذف حلال از دستگاه تبخیرکننده چرخان تحت خلاء در دمای ۴۵ °C استفاده گردید. سپس ترکیبات استخراج‌شده برای انجام آزمون‌های بعدی در محل تاریک با دمای ۱۸ °C - نگهداری شدند.

### ۲.۴. ارزیابی عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال

میزان عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال براساس روش وزن‌سنجی با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت  $\pm 0.001$  گرم و رابطه (۱) تعیین شد.

$$Extraction Yield (\%) = \frac{m_e}{m_s} \times 100 \quad (1)$$

حلال مورد استفاده، مدت زمان فرایند، قدرت مایکروویو، دمای فرایند و مشخصات ماتریس گیاهی دانست [۱۴]. اختر و همکاران (۲۰۱۹) و نور و همکاران (۲۰۲۱)، در مطالعات مروری به معرفی و بررسی متغیرهای مهم تأثیرگذار بر استخراج ترکیبات زیست‌فعال از منابع گیاهی مختلف با کمک مایکروویو پرداختند [۱۵، ۱۶]. با استفاده از مجموعه‌ای از تکنیک‌های ریاضی و آمار نظیر روش‌شناسی سطح پاسخ می‌توان به توصیف رابطه‌ای بین متغیرهای مستقل و پاسخ‌ها و در نهایت به بهینه‌یابی این پاسخ‌ها پرداخت [۱۷]. در فرایند استخراج ترکیبات زیست‌فعال دستیابی به حداکثر عملکرد کمی استخراج و بیشترین میزان ترکیبات فنولی کل دارای اهمیت بسیاری است.

این مطالعه با هدف توسعه فناوری استخراج به کمک مایکروویو برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال از گیاه دارویی پروانش انجام شد. بدین منظور تأثیر متغیرهای مستقل شامل قدرت مایکروویو (۱۰۰-۳۰۰ W)، نسبت نمونه به حلال (۱:۲۰-۱:۴۰ w/v) و مدت زمان تابش مایکروویو (min) ۹-۱۴ به‌منظور به حداکثر رساندن عملکرد کمی استخراج و میزان ترکیبات فنولی کل عصاره استخراج شده از گیاه پروانش با استفاده از روش‌شناسی سطح پاسخ بررسی و بهینه‌یابی گردید.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲.۱. مواد اولیه و آماده‌سازی

گیاه پروانش از مزرعه‌ای واقع در استان البرز جمع‌آوری شد. اندام هوایی آن پس از شستشو با آب روی صفحات فلزی مشبک جهت حذف آب اضافی قرار گرفت. سپس تا رسیدن به وزن ثابت در آون با دمای ۴۰ °C خشک شد و تا زمان انجام آزمایش‌ها در فریزر با دمای ۱۸ °C - نگهداری شدند. قبل از انجام آزمایش‌ها، اندام هوایی خشک توسط یک خردکن آزمایشگاهی آسیاب شد و پس از عبور از الک با مش ۱۸ مورد استفاده قرار گرفت. کلیه حلال‌ها و مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش دارای خلوص بالا بوده و از شرکت‌های معتبر مرک و سیگما-آلدردیج خریداری شدند.



رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از رابطه (۲) تعیین شد.  
 (۲) 
$$= \text{درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH} = \frac{A_b - A_s}{A_b} \times 100$$
  
 در این رابطه،  $A_b$  جذب شاهد و  $A_s$  جذب نمونه است.

## ۲.۷. اندازه‌گیری میزان فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد به روش هیدروژن پراکسید ( $H_2O_2$ )

برای بررسی توانایی مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد  $H_2O_2$  توسط عصاره حاوی ترکیبات زیست‌فعال استخراج‌شده از اندام هوایی گیاه پروانش، ابتدا ۱/۵ ml عصاره (رقیق‌شده با اتانول با نسبت ۱:۱۰) با ۲ ml از محلول هیدروژن پراکسید ۳۰٪ مخلوط شد. سپس میزان جذب در طول موج ۵۳۰ توسط دستگاه طیف‌سنج نور مرئی-ماوراء بنفش (SPECORD 250، آلمان) قرائت گردید [۲۰]. توانایی مهار رادیکال‌های آزاد  $H_2O_2$  با استفاده از رابطه (۳) تعیین شد.  
 (۳) 
$$= \text{درصد مهار رادیکال‌های } H_2O_2 = \frac{A_c - A_s}{A_c}$$
  
 در این رابطه  $A_s$  و  $A_c$  به ترتیب میزان جذب محلول کنترل و جذب محلول نمونه می‌باشند.

## ۲.۸. طراحی آزمایش‌ها و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای بررسی، مدل‌سازی و بهینه‌یابی اثرات متغیرهای مستقل شامل قدرت مایکروویو (۱۰۰-۳۰۰ W)، نسبت نمونه به حلال (۱:۲۰-۱:۴۰ w/v) و مدت زمان اعمال مایکروویو (۹-۱۴ min) بر عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال و میزان ترکیبات فنولی کل از اندام هوایی گیاه پروانش از روش‌شناسی سطح پاسخ براساس طرح باکس-بنکن استفاده شد. در جدول (۱) متغیرهای مستقل و سطوح بالا و پایین هر یک که براساس نتایج آزمایش‌های اولیه مشخص شده‌اند آورده شده است. بر این اساس تیمارهای مورد مطالعه ۱۷ تیمار شامل ۵ تکرار در نقطه مرکزی به‌منظور تعیین خطا می‌باشد که در جدول (۲) به‌صورت کاملاً تصادفی ارائه شده است. به‌طور معمول در روش‌شناسی سطح پاسخ از برآزش مدل چندجمله‌ای درجه دوم بر داده‌های تجربی استفاده

در این رابطه،  $m_e$  و  $m_s$  به ترتیب وزن عصاره استخراج‌شده و وزن نمونه خشک مورد استفاده برای عصاره‌گیری برحسب گرم می‌باشند [۱۸].

## ۲.۵. اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی کل

میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌های حاوی ترکیبات زیست‌فعال به‌دست‌آمده از اندام هوایی گیاه پروانش با استفاده از روش فولین-سیوکالتیو طبق روش سینگلتون و همکاران [۱۹]، با اندکی اصلاحات اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۰/۵ ml عصاره با غلظت مشخص با ۲/۵ ml شناساگر فولین-سیوکالتیو که قبلاً با آب دیونیزه به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شده است، مخلوط و به مدت ۵ min در دمای اتاق قرار گرفت. سپس ۲ ml سدیم کربنات (۰/۷/۵٪) به مخلوط اضافه و به‌آرامی هم‌زده شد. مخلوط نهایی به مدت ۹۰ min در دمای اتاق نگهداری شد و در نهایت میزان جذب در طول موج ۷۶۵ nm توسط دستگاه طیف‌سنج نور مرئی-ماوراء بنفش (SPECORD 250، آلمان) ثبت گردید. از گالیک اسید برای رسم منحنی استاندارد در محدوده غلظت ۱۰۰-۲۰ ppm (معادله خط،  $R^2=0.999$ ,  $Y=0.007X+0.25$ ) استفاده شد و نتیجه نهایی به‌صورت میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن عصاره (mg GAE/g) بیان شد.

## ۲.۶. اندازه‌گیری میزان فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد به روش ۲ و ۲ دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)

بررسی توانایی مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره حاوی ترکیبات زیست‌فعال به‌دست‌آمده از اندام هوایی گیاه پروانش طبق روش زنگین و همکاران [۱۹]، با اندکی اصلاحات صورت پذیرفت. بدین منظور ۰/۱ ml از عصاره (رقیق‌شده با اتانول با نسبت ۱:۱۰ w/v) با ۲/۹ ml محلول DPPH (۰/۱ mM) مخلوط و ۳۰ min در محیط تاریک و در دمای اتاق قرار گرفت. سپس میزان جذب در طول موج ۵۱۷ nm توسط دستگاه طیف‌سنج نور مرئی-ماوراء بنفش (SPECORD 250، آلمان) قرائت گردید. توانایی مهار

جداول (۳) و (۴)، اثرات خطی، درجه دوم و متقابل متغیرهای مستقل مورد مطالعه به‌طور معنی‌داری بر عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال و میزان ترکیبات فنول کل عصاره‌ها تأثیر داشتند ( $p < 0.05$ ). تنها اثر متقابل قدرت و نسبت نمونه به حلال بر میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌ها فاقد اثر معنی‌دار بود ( $p > 0.05$ ). بنابراین، برای تعیین مدل کاهش یافته این عبارت از مدل مربوطه حذف و داده‌های تجربی بار دیگر برازش شدند [۱۶]. همان‌طور که ملاحظه می‌شود مقادیر  $p$  برای هر دو مدل برازش شده کمتر از  $0.05$  بود که بر این اساس می‌توان اذعان نمود که از این مدل‌ها به‌خوبی می‌توان برای تخمین پاسخ‌های مورد مطالعه استفاده نمود [۲۱]. همچنین، این ادعا با مقادیر بالای ضریب همبستگی (بیش‌تر از  $0.99$ ) نیز تأیید شد. در یک مدل آماری مطلوب و مورد قبول، ضریب همبستگی تعدیل شده ( $Adj-R^2$ ) نزدیک به ضریب تبیین می‌باشد که در مطالعه‌ی حاضر این امر مشاهده شد (جداول ۳ و ۴). به‌علاوه اینکه آزمون فقدان برازش نیز برای هر دو مدل به‌دست‌آمده معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ ) که این نتیجه حاکی از آن است که می‌توان به‌صورت موفقیت‌آمیزی از مدل‌های برازش شده برای پیش‌بینی پاسخ‌های مورد نظر استفاده نمود. همچنین ضریب تغییرات برای عملکرد کمی استخراج و میزان ترکیبات فنولی کل به ترتیب معادل  $1/54$  و  $0.119$  بود که نشان‌دهنده‌ی اختلاف کم بین مقادیر تجربی و مقادیر پیش‌بینی‌شده و همچنین دقت مدل‌های برازش شده بر داده‌های تجربی است. روابط (۵) و (۶) به ترتیب مدل‌های چند جمله‌ای درجه دوم برازش شده بر داده‌های تجربی عملکرد کمی استخراج و میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌ها هستند.

Extraction yield (۵)

$$= +17.15 + 1.80A + 0.82B + 1.48C + 1.14AB + 1.38AC - 0.33BC - 1.72A^2 - 1.54B^2 - 1.26C^2$$

Total phenolic content (۶)

$$= +118.24 + 0.72A + 5.34B - 2.28C - 0.45AC + 0.46BC - 4.48A^2 - 5.66B^2 - 3.61C^2$$

که در این روابط، A، B و C به ترتیب قدرت مایکروویو، نسبت نمونه به حلال و مدت زمان تابش مایکروویو می‌باشند.

می‌شود. در این روش برای هر پاسخ مدلی تعریف می‌شود که در آن اثرات اصلی و متقابل متغیرهای مستقل روی هر پاسخ به‌صورت جداگانه بیان می‌شود. مدل چندجمله‌ای درجه دوم را می‌توان به‌صورت رابطه (۴) نوشت:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (4)$$

در این رابطه  $\beta_0$  و  $\beta_i$  و  $\beta_{ii}$  و  $\beta_{ij}$  ضرایب رگرسیونی به ترتیب برای عرض از مبدأ، اثرات خطی، درجه دوم و متقابل،  $X_j$  و  $X_i$  متغیرهای مستقل و  $k$  تعداد متغیرهای مستقل هستند. صحت مدل‌ها از طریق آزمون فقدان برازش<sup>۱</sup>، ضریب تغییرات، مقادیر ضریب همبستگی ( $R^2$ )، ضریب همبستگی تعدیل‌شده ( $adj-R^2$ ) و عدد  $p$  در سطح اطمینان  $95\%$  بررسی شد. برای تعیین شرایط بهینه از تکنیک بهینه‌سازی عددی با هدف به حداکثر رساندن عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال و میزان ترکیبات فنولی کل عصاره استفاده شد. طراحی آزمایش‌ها، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، رسم نمودارهای سه بعدی و بهینه‌یابی عددی با نرم‌افزار Design Expert 7.0.3 (Minneapolis, USA) انجام شد.

### ۳. نتایج و بحث

#### ۳.۱. مدل‌سازی فرایند استخراج ترکیبات زیست‌فعال

##### به کمک مایکروویو

مقادیر داده‌های تجربی به‌دست‌آمده از آزمون‌های تصادفی تعیین‌شده براساس طرح باکس-بنکن برای عملکرد کمی استخراج و میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌ها در جدول (۲) ارائه شده است. همان‌طور که در جدول (۲) مشاهده می‌شود میزان عملکرد کمی استخراج و میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌های استخراج‌شده از اندام هوایی گیاه پروانش به ترتیب در محدوده‌های  $11/50-18/67\%$  و  $mg\ GAE/g$   $118/40-101/00$  به دست آمد. اثرات متغیرهای مستقل مورد مطالعه و اثرات متقابل بین آنها از طریق آزمون تجزیه و تحلیل واریانس ارزیابی شد که نتایج آن به ترتیب در جدول (۳) و (۴) آورده شده است. براساس نتایج ارائه‌شده در

1. Lack-of-Fit test

در شکل (۱) تطابق نتایج حاصل از مدل و داده‌های تجربی فنولی کل عصاره‌ها ارائه شده است. تطابق نزدیک این مقادیر به‌منظور اعتبارسنجی مدل‌های برازش شده مربوط به نشان‌دهنده مطلوبیت بالای مدل‌های پیشنهادی می‌باشد. عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال و میزان ترکیبات

جدول (۱) سطوح متغیرهای مستقل و کدهای مرتبط

Table 1. Levels of independent variables and related codes

Independent variables	Symbol	Levels		
		-1	0	+1
Microwave power (W)	A	100	200	300
Sample: solvent ratio (w/v)	B	1:20	1:30	1:40
Irradiation time (min)	C	9	11.5	14

جدول (۲) طراحی آزمایش‌ها بر اساس طرح باکس-بنکن و داده‌های تجربی مرتبط.

Table 2. The Box-Behnken experimental design and related responses values

Run	Microwave power (W)	Sample: solvent ratio (w/v)	Irradiation time (min)	Extraction yield (%)	Total phenolic content (mg GAE/g)
1	200.00	30.00	11.50	17.00	118.20
2	200.00	20.00	14.00	15.21	101.00
3	100.00	40.00	11.50	11.50	112.75
4	200.00	20.00	9.00	11.53	106.14
5	200.00	30.00	11.50	17.04	118.40
6	300.00	30.00	14.00	18.67	108.00
7	100.00	20.00	11.50	12.43	102.05
8	300.00	40.00	11.50	17.64	114.00
9	100.00	30.00	9.00	12.42	111.40
10	300.00	30.00	9.00	13.03	113.80
11	200.00	30.00	11.50	17.17	118.33
12	200.00	30.00	11.50	17.30	118.23
13	200.00	30.00	11.50	17.25	118.50
14	300.00	20.00	11.50	14.00	103.60
15	200.00	40.00	9.00	14.13	116.00
16	100.00	30.00	14.00	12.55	107.41
17	200.00	40.00	14.00	16.50	112.72

جدول (۳) نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مدل سطح پاسخ به‌دست‌آمده برای عملکرد کمی استخراج

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for response surface model obtained for extraction yield

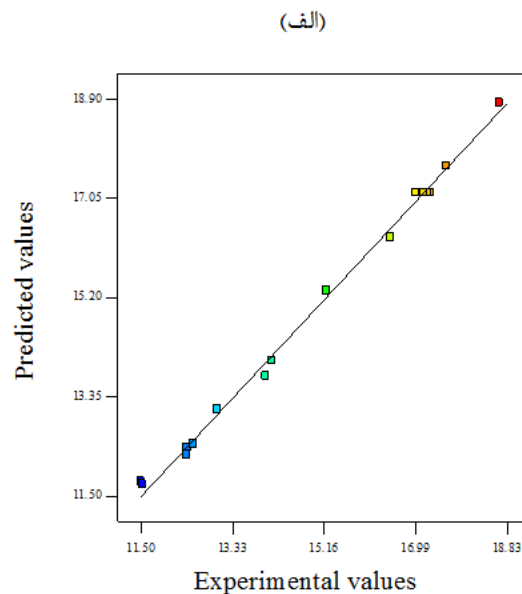
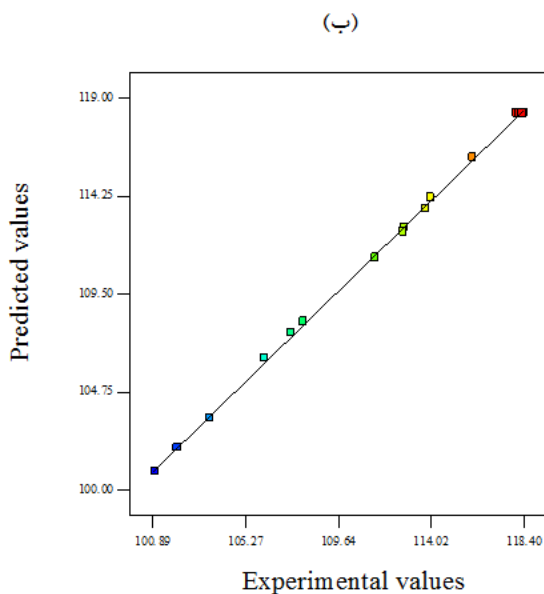
Source	Sum of Squares	DF	F-Value	p-value Prob > F
Model	94.66	9	167.67	< 0.0001
A- Microwave Power	25.99	1	488.47	< 0.0001
B-Solid: solvent ratio	5.41	1	101.71	< 0.0001
C-Irradiation time	17.46	1	328.20	< 0.0001
AB	5.18	1	97.27	< 0.0001
AC	7.59	1	142.64	< 0.0001
BC	0.43	1	8.06	0.0251
A <sup>2</sup>	12.45	1	234.02	< 0.0001
B <sup>2</sup>	1.05	1	188.82	< 0.0001
C <sup>2</sup>	6.74	1	126.57	< 0.0001
Residual	0.37	7		
Lack-of-Fit	0.31	3	6.03	0.0577
Pure Error	0.067	4		
R <sup>2</sup>	0.9961	Adj-R <sup>2</sup>	0.9910	
C.V. %	1.54			



جدول (۴) نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مدل سطح پاسخ به‌دست آمده برای میزان ترکیبات فنولی کل

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for response surface model obtained for total phenolic content

Source	Sum of Squares	DF	F Value	p-value Prob > F
Model	580.27	8	1603.38	<0.0001
A- Microwave Power	4.19	1	92.63	< 0.0001
B-Solid: solvent ratio	227.70	1	5033.32	< 0.0001
C-Irradiation time	41.45	1	916.27	< 0.0001
AC	0.82	1	18.10	0.0028
BC	0.86	1	19.12	0.0024
A <sup>2</sup>	84.40	1	1865.75	< 0.0001
B <sup>2</sup>	135.11	1	2986.71	< 0.0001
C <sup>2</sup>	54.94	1	1214.47	< 0.0001
Residual	0.36	8		
Lack-of-Fit	0.29	4	4.06	0.1016
Pure Error	0.071	4		
R <sup>2</sup>	0.9994	Adj-R <sup>2</sup>	0.9988	
C.V. %	0.19			



شکل (۱) نمودار تطابق نتایج حاصل از مدل و داده‌های تجربی برای (الف) عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال و (ب) ترکیبات فنولی کل.

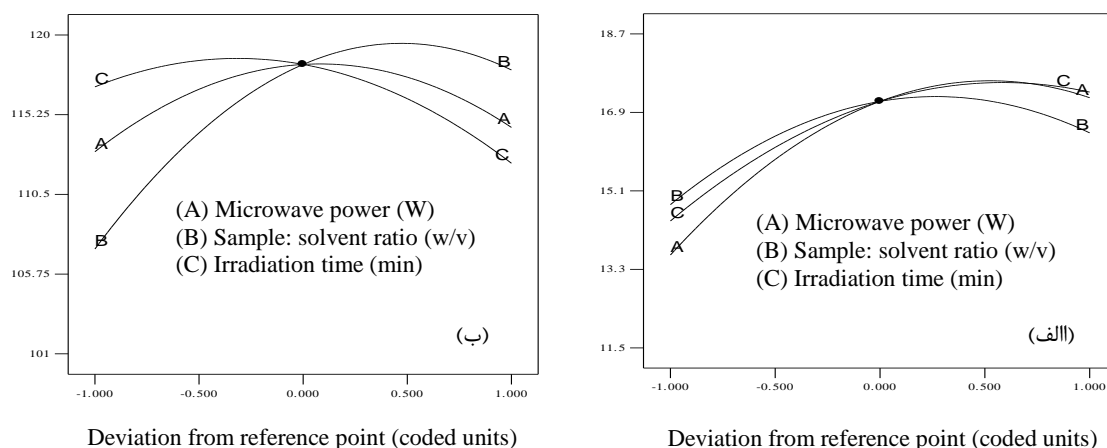
Fig 1. Plot of Actual vs. Predicted values for (b) extraction yield and (b) total phenolic content

در گام نخست، نمودار پرشیدگی به‌منظور بررسی حساسیت پاسخ‌های مورد مطالعه به تغییرات متغیرهای مستقل رسم شد (شکل ۲ الف و ب). لازم به توضیح است که شیب یا انحنای تند منحنی هر متغیر مستقل نشان می‌دهد که پاسخ مورد بررسی در برابر متغیر مستقل مورد مطالعه حساسیت

۲.۳. بررسی تأثیر متغیرهای مستقل بر عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال استخراج‌شده به کمک مایکروویو

میزان عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال داشتند. در حالی که با توجه به شکل (۲-ب) به ترتیب متغیرهای مستقل نسبت نمونه به حلال، قدرت مایکروویو و مدت زمان تابش مایکروویو بیشترین تأثیر را بر میزان ترکیبات فنولی کل داشتند.

بیشتری دارد و در مقابل انحنای ملایم‌تر یا خط افقی بیانگر غیرحساس بودن پاسخ در برابر تغییرات آن متغیر مستقل می‌باشد [۲۲]. با توجه به شکل (۲-الف) در بین متغیرهای مستقل مورد مطالعه، به ترتیب قدرت مایکروویو، مدت زمان تابش مایکروویو و نسبت نمونه به حلال بیشترین تأثیر را بر



شکل (۲) نمودار پرتurbation برای (الف) عملکرد کمی استخراج و (ب) ترکیبات فنولی کل.  
Fig 2. Perturbation plot for (b) extraction yield and (b) total phenolic content

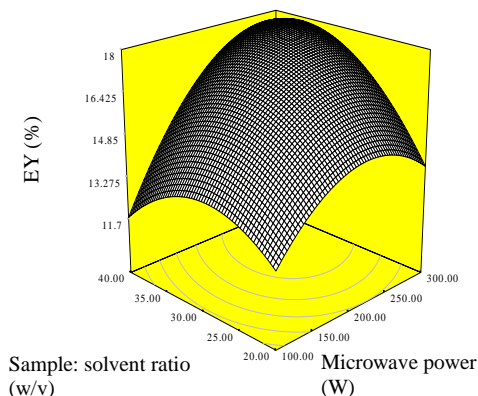
معمول مورد استفاده در سیستم‌های تجاری است، ترازبندی مولکول‌ها و به دنبال آن تلاش آنها برای بازگشت به حالت اولیه  $10^9 \times 4/9$  بار در ثانیه رخ می‌دهد، که این روند سبب گرم شدن سریع محیط می‌شود. در ادامه رطوبت موجود در نمونه تحت تأثیر تنش‌های حرارتی قرار می‌گیرد که این امر نهایتاً باعث ایجاد فشار، تورم و پارگی احتمالی سلول‌های گیاهی خواهد شد [۱۲]. از این رو در مطالعه حاضر، با افزایش قدرت مایکروویو تا سطح مشخصی مقدار عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال افزایش یافت و پس از آن به تدریج شاهد کاهش پاسخ مورد مطالعه بودیم. این نتیجه می‌تواند ناشی از تخریب حرارتی ترکیبات زیست‌فعال در سطوح بالای قدرت مایکروویو باشد. نتایج مشابهی توسط ماران و همکاران [۲۳] پیرامون تأثیر قدرت مایکروویو بر عملکرد کمی استخراج پکتین از پوست پرتقال گزارش گردید. در مطالعه‌ای لی و همکاران [۲۴] افزایش عملکرد کمی استخراج به کمک فناوری مایکروویو را ناشی از افزایش

به منظور بررسی تأثیر هم‌زمان متغیرهای مستقل بر عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال از اندام هوایی پروانش حین فرایند استخراج به کمک مایکروویو نمودارهای سه‌بعدی سطح پاسخ رسم شدند (شکل ۳-الف، ب و ج). در شکل (۳-الف) تأثیر هم‌زمان قدرت مایکروویو و نسبت نمونه به حلال بر عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال نشان داده شده است. طبق نتایج به دست آمده هر دو متغیر مستقل مورد بررسی تأثیر قابل توجهی بر پاسخ مورد نظر داشتند، به گونه‌ای که با افزایش قدرت مایکروویو و نسبت نمونه به حلال به ترتیب تا حدود ۲۶۰ W و نسبت ۱:۳۴ w/v روند افزایشی در مقدار عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال مشاهده شد؛ ولی در ادامه با افزایش سطوح این متغیرها، تغییر قابل ملاحظه‌ای در جهت بهبود عملکرد استخراج ترکیبات زیست‌فعال مشاهده نشد. انرژی مایکروویو از طریق حرکت یونها و چرخش‌های دوقطبی باعث حرکت مولکول‌ها می‌شود. در فرکانس ۲۴۵۰ MHz که فرکانس

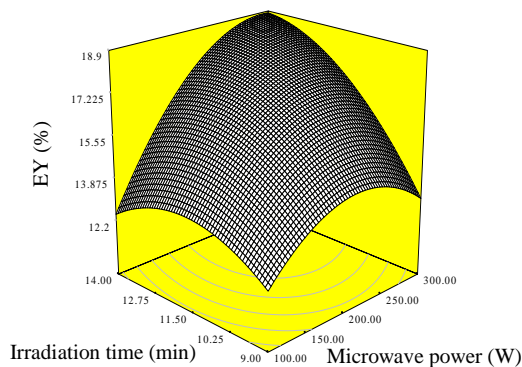
شده است. طبق نتایج، هر دو متغیر مورد مطالعه تأثیر قابل توجهی بر پاسخ را نشان می‌دهند. نسبت نمونه به حلال یکی دیگر از عوامل تأثیرگذار بر کارایی فناوری استخراج به کمک مایکروویو جهت استخراج ترکیبات زیست‌فعال می‌باشد که در این مطالعه به بررسی آن پرداخته شده است. همان‌طور که در نتایج نشان داده شده است با افزایش نسبت نمونه به حلال تا حدود  $1:3.5$  w/v مقدار عملکرد کمی افزایش یافته است. این نتیجه می‌تواند ناشی از تورم بیشتر ساختار سلولی در نتیجه دسترسی بیشتر به حلال باشد [۲۳]. اما افزایش بیش از حد نسبت جرمی سبب ایجاد روند کاهشی در نتایج شده است که می‌تواند ناشی از کاهش جذب انرژی توسط نمونه باشد [۲۶]. از طرفی دیگر تداوم افزایش نسبت نمونه به حلال موجب مصرف مقادیر زیاد حلال و صرف هزینه بیشتر جهت تغلیظ ترکیبات زیست‌فعال می‌شود. از این رو یافتن سطح بهینه متغیر مورد مطالعه از اهمیت بسزایی برخوردار است.

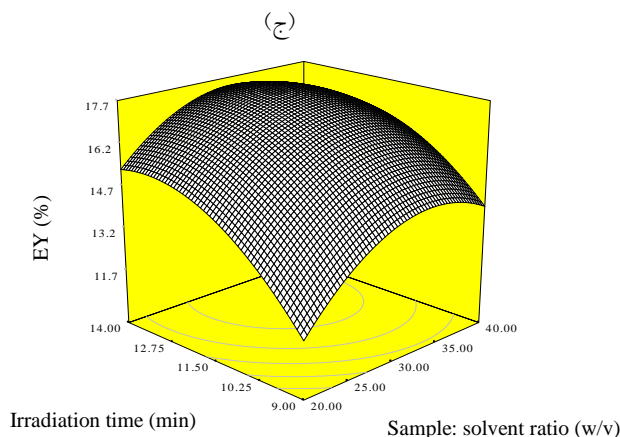
جابجایی حلال، پارگی سلولی و تشدید رهایش ترکیبات هدف به درون حلال دانستند. در شکل (۳-ب) تأثیر هم‌زمان قدرت مایکروویو و مدت زمان تابش مایکروویو بر عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در سطح مشخصی از متغیرهای مورد مطالعه (حدود  $260$  W و  $12$  min) بیشینه مقدار عملکرد کمی استخراج به دست آمد که این نتیجه می‌تواند بیانگر اهمیت فرایند بهینه‌سازی باشد. افزایش مدت زمان تابش مایکروویو از طریق تشدید آسیب ساختار سلولی می‌تواند باعث بهبود انتقال جرم حل‌شونده از ماتریکس گیاهی به حلال و نهایتاً افزایش میزان عملکرد کمی استخراج گردد. البته همان‌گونه که در نتایج نشان داده شده است از شدت اثر این متغیر پس از گذشت مدت زمان معینی به دلیل کاهش اختلاف غلظت حل‌شونده در حلال و سلول گیاهی کاسته خواهد شد [۲۵]. در شکل (۳-ج) تأثیر هم‌زمان نسبت نمونه به حلال و مدت زمان تابش مایکروویو بر عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال نشان داده

(الف)



(ب)





شکل (۳) نمودارهای سه بعدی تأثیر متقابل متغیرهای مستقل شامل قدرت مایکروویو (وات)، نسبت نمونه به حلال (وزنی/حجمی) و مدت زمان تابش (دقیقه) بر میزان عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال از اندام هوایی پروانش

Fig 3. Response surface plots showing the interaction effects of independent variables including microwave power (W), sample: solvent ratio (w/v) and irradiation time on the extraction yield of bioactive compounds from aerial parts of *Catharanthus roseus* L.

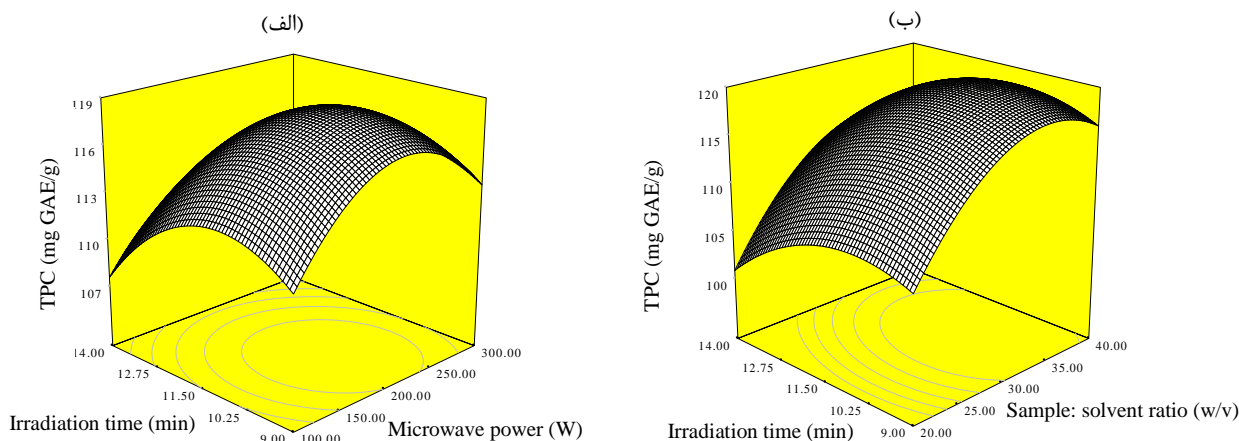
می‌شود [۲۷]. مجموعه این رخدادها می‌تواند سبب بهبود رهايش ترکیبات هدف از ساختار گیاهی گردد که به‌خوبی در نتایج این بخش از مطالعه مشاهده می‌شود (شکل ۴-الف و ب). در شکل (۴-الف) اثر دوگانه قدرت مایکروویو بر میزان ترکیبات فنولی کل عصاره استخراج شده از اندام هوایی پروانش کاملاً مشهود است. با افزایش قدرت مایکروویو تا حدود ۲۵۰ W مقدار پاسخ مورد مطالعه افزایش یافت؛ اما با به‌کارگیری سطوح بالاتر قدرت مایکروویو روند کاهشی در میزان ترکیبات فنولی کل عصاره مشاهده گردید که می‌تواند ناشی از تخریب حرارتی ترکیبات فنولی باشد. نتایج مشابهی توسط لی و همکاران [۲۴] در استخراج ترکیبات فنولی از میوه *Gordonia axillaris* گزارش گردید. لازم به توضیح است که با به‌کارگیری هم‌زمان سطوح بالا قدرت مایکروویو و مدت زمان تابش کاهش ترکیبات فنولی کل تشدید گردید. علت این نتیجه می‌تواند مجاورت طولانی‌تر ترکیبات حساس حرارتی با دمای بالا باشد. مدت زمان تابش مایکروویو یکی دیگر از عوامل کلیدی مؤثر بر فرایند استخراج به کمک مایکروویو است و انتخاب سطح مناسب این متغیر برای اطمینان از دستیابی به حداکثر پاسخ مورد مطالعه کاملاً ضروری است [۲۸]. در شکل (۴-الف و ب) تأثیر هم‌زمان مدت زمان تابش مایکروویو با دیگر متغیرهای مستقل مورد

### ۳.۳. بررسی تأثیر متغیرهای مستقل بر میزان ترکیبات فنولی کل عصاره استخراج شده به کمک مایکروویو

به‌منظور بررسی تأثیر هم‌زمان متغیرهای مستقل بر میزان ترکیبات فنولی کل عصاره استخراج شده از اندام هوایی پروانش حین فرایند استخراج به کمک مایکروویو نمودارهای سه‌بعدی سطح پاسخ رسم گردیدند (شکل ۴-الف و ب). در شکل (۴-الف) تأثیر هم‌زمان قدرت مایکروویو و مدت زمان تابش بر میزان ترکیبات فنولی کل عصاره نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود میزان ترکیبات فنولی کل عصاره با افزایش قدرت مایکروویو از ۱۰۰ W تا حدود ۲۵۰ W افزایش یافت. این نتیجه می‌تواند ناشی از تأثیر مستقیم انرژی مایکروویو بر ساختار گیاهی باشد [۲۷]. تابش مایکروویو باعث سست شدن دیواره سلولی و در نتیجه باز شدن سریع و گسترده ساختار سلولی و ایجاد منافذ در آن می‌شود. این رخداد سبب افزایش تماس حلال با ترکیبات حل‌شونده خواهد شد. لازم به ذکر است که انرژی الکترومغناطیسی بیشتری توسط هدایت یونی و چرخش‌های دو قطبی بر مولکول‌های زیستی منتقل می‌شود که این امر منجر به پخش شدن سریع انرژی در داخل حلال و ترکیبات درون سلولی و در نتیجه ایجاد حرکت مولکولی و ایجاد حرارت

گیاهی و در نتیجه تسریع و بهبود فرایند استخراج باشد [۳۰]. از دیگر دلایل تأثیر نسبت نمونه به حلال بر میزان ترکیبات فنولی کل می‌توان به گرادیان غلظت بین حلال و محتویات سلول‌های گیاهی پروانش اشاره نمود که با افزایش نسبت نمونه به حلال تا سطح مشخصی، گرادیان غلظت افزایش یافته و خروج ترکیبات درون سلولی فزونی می‌یابد. ولی با تداوم افزایش نسبت نمونه به حلال روند کاهش در نتایج مشاهده گردید که می‌تواند ناشی از کاهش جذب انرژی توسط حلال و نمونه باشد [۳۱]. نتایج مشابهی توسط ماران و همکاران [۲۳] پیرامون تأثیر نسبت نمونه به حلال بر استخراج پکتین از پوست پرتقال از طریق فناوری استخراج به کمک مایکروویو مشاهده گردید. در مطالعه‌ای دیگر ژائو و همکاران [۳۲] به بررسی استخراج ترکیبات فنولی از میوه *Melastoma sanguineum* توسط فناوری استخراج به کمک مایکروویو پرداختند. آنها نتایج مشابهی پیرامون تأثیر نسبت نمونه به حلال بر میزان ترکیبات فنولی کل گزارش نمودند، به‌صورتی که بالاترین میزان ترکیبات فنولی کل با به‌کارگیری نسبت نمونه به حلال ۱:۳۲ w/v مشاهده شد [۳۲].

مطالعه بر میزان ترکیبات فنولی کل عصاره نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌گردد با افزایش مدت زمان تابش مایکروویو تا حدود ۱۱/۵۰ min میزان ترکیبات فنولی کل عصاره به‌صورت پیوسته افزایش می‌یابد و پس از آن به‌تدریج کاسته می‌شود. این پدیده را می‌توان این‌گونه توضیح داد که جذب انرژی مایکروویو در سیستم استخراج باعث افزایش تجمع حرارتی در محلول می‌شود که نهایتاً سبب انحلال ترکیبات هدف تا حدود ۱۱/۵۰ min می‌شود. هرچند که به‌کارگیری مدت زمان‌های طولانی‌تر تابش مایکروویو به دلیل آسیب حرارتی به ترکیبات فنولی سبب کاهش تدریجی میزان ترکیبات فنولی کل عصاره می‌گردد. نتایج مشابهی توسط ماران و همکاران [۲۳] و چن و همکاران [۲۹] گزارش گردید. نسبت نمونه به حلال از دیگر عواملی است که بر میزان ترکیبات فنولی کل عصاره استخراج شده به روش استخراج به کمک مایکروویو تأثیرگذار است. براساس شکل (۴-ب) بالاترین میزان ترکیبات فنولی کل با به‌کارگیری نسبت نمونه به حلال حدود ۱:۳۵ w/v به‌دست آمد. این نتیجه می‌تواند ناشی از تأثیر افزایش نسبت نمونه به حلال بر تسهیل نفوذ حلال به درون سلول‌های



شکل (۴) نمودارهای سه بعدی تأثیر متقابل متغیرهای مستقل شامل قدرت مایکروویو (وات)، نسبت نمونه به حلال (وزنی/حجمی) و مدت زمان تابش (دقیقه) بر میزان ترکیبات فنولی کل عصاره استخراج شده از اندام هوایی پروانش

Fig 3. Response surface plots showing the interaction effects of independent variables including microwave power (W), sample: solvent ratio (w/v) and irradiation time on the total phenolic content of extracts recovered from aerial parts of *Catharanthus roseus* L.

### ۳.۵. مقایسه فناوری نوین استخراج به کمک مایکروویو با روش سنتی سوکسله

سوکسله به‌عنوان یک روش کلاسیک و مرجع برای استخراج ترکیبات با ارزش از منابع مختلف گیاهی همواره مورد استفاده قرار گرفته است. در مطالعه حاضر نیز از روش سوکسله به‌عنوان یک روش بازبازی استاندارد جهت بررسی کارایی فناوری استخراج به کمک مایکروویو استفاده شد. مقدار عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال به‌دست‌آمده به‌روش سوکسله معادل  $0.19 \pm 0.29/68\%$  تعیین گردید. اما از طرفی میزان ترکیبات فنولی کل عصاره حاصل از روش سوکسله  $0.18 \pm 0.16/19$  mg GAE/g بود که این کاهش نسبت به روش استخراج به کمک مایکروویو به دلیل آسیب حرارتی شدید ترکیبات فنولی ناشی از دمای بالا و مدت زمان فرایند طولانی می‌باشد. همچنین فعالیت ضد رادیکالی عصاره به‌دست‌آمده تحت شرایط بهینه استخراج به کمک مایکروویو و روش سنتی سوکسله بر مبنای توانایی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (DPPHsc (% و HO (HOsc (% مورد سنجش قرار گرفت و نتایج آن در جدول (۵) آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود روش مورد استفاده برای استخراج تأثیر قابل توجهی بر فعالیت ضد رادیکالی عصاره بازبازی شده از اندام هوایی پروانش داشته است. به‌گونه‌ای که بیشترین فعالیت ضد رادیکالی برای عصاره بازبازی شده به روش استخراج به کمک مایکروویو به دست آمد. فعالیت ضد رادیکالی بالاتر مشاهده شده در نمونه‌های تحت تیمار می‌تواند ناشی از میزان ترکیبات فنولی کل بالاتر باشد.

### ۳.۴. بهینه‌سازی چند پاسخ فرایند استخراج ترکیبات زیست‌فعال به کمک مایکروویو

سطوح مطلوب متغیرهای مستقل مورد مطالعه برای دستیابی به حداکثر عملکرد کمی استخراج و میزان ترکیبات فنولی کل عصاره از طریق بهینه‌سازی چند پاسخ فرایند با استفاده از تکنیک عددی تعیین شد. شرایط بهینه فرایند استخراج به کمک مایکروویو، به‌صورت قدرت مایکروویو W ۲۵۰، نسبت نمونه به حلال w/v ۱:۳۳ و مدت زمان تابش مایکروویو ۱۱ min به دست آمد. تحت این شرایط، عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال و میزان ترکیبات فنولی کل به ترتیب  $0.18/21\%$  و  $118/40$  mg GAE/g پیش‌بینی گردید. فرایند استخراج ترکیبات زیست‌فعال به کمک مایکروویو از اندام هوایی گیاه پروانش در شرایط بهینه شده در پنج تکرار به‌منظور مقایسه نتیجه پیش‌بینی‌شده با مقدار تجربی انجام شد. مقادیر تجربی عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال و میزان ترکیبات فنولی کل عصاره تحت شرایط بهینه بسیار نزدیک به مقادیر پیش‌بینی شده بود. مقادیر تجربی به‌دست‌آمده برای عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال و میزان ترکیبات فنولی کل عصاره تحت شرایط بهینه به ترتیب  $0.10 \pm 0.18/64\%$  و  $0.11$  mg GAE/g بود. در نتیجه از روش‌شناسی سطح پاسخ بر اساس طرح باکس-بنکن می‌توان به‌عنوان یک ابزار دقیق و کارآمد برای پیش‌بینی عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال و میزان ترکیبات فنولی کل عصاره حاصل از اندام هوایی پروانش به کمک مایکروویو استفاده نمود.

جدول (۵) بررسی مقایسه‌ای تأثیر روش‌های مختلف استخراج بر فعالیت ضد رادیکالی عصاره

Table 5. Comparative study of the effect of different extraction methods on the antiradical activity of the extract

Extraction method	%DPPH <sub>sc</sub>	%HO <sub>sc</sub>
MAE <sup>1</sup>	42.70±0.10	33.29±0.10
SOX <sup>2</sup>	10.17±0.14	8.34±0.17

1. Optimal conditions for microwave-assisted extraction (Microwave power 250 W, irradiation time 11 min, sample to solvent ratio 1:33 w/v)

2. Soxhlet extraction conditions (Temperature: solvent boiling point, Extraction time: 6h)

۱. شرایط بهینه استخراج به کمک مایکروویو (قدرت مایکروویو ۲۵۰W، مدت زمان تابش مایکروویو ۱۱min و نسبت نمونه به حلال w/v ۱:۳۳)

۲. شرایط استخراج به روش سوکسله (دما نقطه جوش حلال، مدت زمان استخراج ۶ ساعت)

۱۱ و نسبت نمونه به حلال ۱:۳۳ w/v به دست آمد که نتایج حاصل از پیش‌بینی مدل با مقادیر تجربی مطابقت خوبی داشت. مقایسه روش استخراج به کمک مایکروویو با روش سنتی سوکسله نشان داد که روش سنتی از لحاظ کمی عملکردی بهتر اما از لحاظ کیفی (میزان ترکیبات فنولی کل و میزان فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد) عملکردی به مراتب کمتر از روش استخراج به کمک مایکروویو دارد. براساس نتایج به‌دست‌آمده می‌توان ادعا نمود که فناوری استخراج به کمک مایکروویو یک روش کارآمد برای استحصال ترکیبات فنولی با فعالیت ضد اکسایش مطلوب می‌باشد که قابلیت استفاده در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی را خواهد داشت. در نهایت می‌توان بررسی تأثیر روش‌های شدت بخشی بر رهایش ترکیبات زیست‌فعال از اندام هوایی پروانش تحت شرایط بهینه استخراج به کمک مایکروویو را به‌عنوان پژوهش آتی پیشنهاد نمود.

#### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه زنجان به دلیل مساعدت‌های مالی در اجرای این تحقیق که بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته فناوری مواد غذایی می‌باشد، سپاسگزاری می‌نماییم.

#### ۴. نتیجه‌گیری

در این مطالعه برای اولین بار استخراج ترکیبات زیست‌فعال از اندام هوایی گیاه پروانش با استفاده از فناوری استخراج به کمک مایکروویو مورد بررسی و بهینه‌سازی قرار گرفت. در این راستا تأثیر سه متغیر مستقل مؤثر بر فرایند استخراج به کمک مایکروویو شامل قدرت مایکروویو، نسبت نمونه به حلال و مدت زمان تابش مایکروویو بر عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال و میزان ترکیبات فنولی کل عصاره مورد بررسی قرار گرفت که هر سه اثر معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) بر پاسخ‌ها داشتند. براساس نتایج به‌دست‌آمده عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست‌فعال و میزان ترکیبات فنولی کل به ترتیب در محدوده ۱۱/۵۰ تا ۱۸/۶۷٪ و ۱۱۸/۴۰ تا ۱۰۱/۰۰ mg GAE/g متغیر بود که نشانگر توانایی فناوری استخراج به کمک مایکروویو جهت بازیابی ترکیبات با ارزش زیست‌فعال از اندام هوایی پروانش می‌باشد. مقادیر بالای ضریب همبستگی، ضریب همبستگی تعدیل‌شده به همراه بی‌معنا بودن آزمون فقدان برازش و ضرایب تغییرات اندک حاکی از کارایی مدل‌های برازش شده برای پیش‌بینی عملکرد کمی استخراج و میزان ترکیبات فنولی کل بود. شرایط بهینه فرایند استخراج با کمک مایکروویو، به‌صورت قدرت مایکروویو ۲۵۰ W، مدت زمان تابش مایکروویو min

#### منابع

- [1] Das, S., & Sharangi, A. (2017). Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* L.): Diverse medicinal and therapeutic benefits to humankind. *J. pharmacogn. phytochem.*, 6(5), 1695-1701.
- [2] Shoba, V. & Pugazhendy, K. (2017). Ethnobotanical and phyto pharmacological activities of madagascar periwinkle (*Catharanthus Roseus*)-A detailed review. *Indo Am. J. pharm.*, 4(12), 4979-4986.
- [3] Mir, M.A., Kumar, A., & Goel, A. (2018). Phytochemical analysis and antioxidant properties of the various extracts of *Catharanthus roseus*. *J. Chem. Pharm.*, 10(10), 22-31.
- [4] Mishra, J.N. & Verma, N.K. (2017). A brief study on *Catharanthus Roseus*: A review. *Int. J. Res. Pharm. Sci.*, 2, 20-23.
- [5] Wilson, D.W., Nash, P., Buttar, H.S., Griffiths, K., Singh, R., Meester, F.D., Horiuchi, R., & Takahashi, T. (2017). The role of food antioxidants, benefits of functional foods, and influence of feeding habits on the health of the older person: An overview. *Antioxidants*, 6, 81-101.
- [6] Jahanbakhsh, Z., Mohammadi, M. T., Jafari, M., Khoshbaten, A., & Salehi, M. (2012). Role of oxidative stress in the aortic constriction-induced ventricular hypertrophy in rat. *J. Physiol. Pharmacol.*, 16, 146-155.
- [7] Samavati, V., & Manoochehrizade, A. (2013). *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* leaf: New source of polysaccharide and its antioxidant activity. *Carbohydr. Polym.*, 98, 199-207.
- [8] Alvi, T., Asif, Z., & Iqbal Khan, M.K. (2022). Clean label extraction of bioactive compounds from food waste through microwave-assisted extraction technique-A review. *Food Biosci.*, 46, 101580.



- [9] Araujo, R.G., Rodríguez-Jasso, R. M., Ruíz, H. A., Govea-Salas, M., Pintado, M., & Aguilar, C. N. (2021). Recovery of bioactive components from avocado peels using microwave-assisted extraction. *Food Bioprod. Process.*, *127*, 152-161.
- [10] Sarfarazi, M., Jafari, S. M., Rajabzadeh, G., & Galanakis, C. M. (2020). Evaluation of microwave-assisted extraction technology for separation of bioactive components of saffron (*Crocus sativus* L.). *Ind. Crops Prod.*, *145*, 111978.
- [11] Vieira, V., Prieto, M. A., Barros, L., Coutinho, J. A. P., Ferreira, O., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Optimization and comparison of maceration and microwave extraction systems for the production of phenolic compounds from *Juglans regia* L. for the valorization of walnut leaves. *Ind. Crops Prod.*, *107*, 341-352.
- [12] Camel, V., (2000). Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *TrAC - Trends Anal. Chem.*, *19*(4), 229-248.
- [13] Gallo, M., Ferracane, R., Graziani, G., Ritieni, A., & Fogliano, V. (2010). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from four different spices. *Molecules*, *15*, 6365-6374.
- [14] Lucchesi, M.E., Chemat, F., & Smadja, J. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A.*, *1043*, 323-327.
- [15] Akhtar, I., Javad, S., Yousaf, Z., Iqbal, S., & Jabeen, K. (2019). Microwave assisted extraction of phytochemicals an efficient and modern approach for botanicals and pharmaceuticals. *Pak. J. Pharm. Sci.*, *32*, 223-230.
- [16] Nour, A., Alara, O.R., Nour, A.H., Omer, M.S., & Ahmad, N.B. (2021). Microwave-assisted extraction of bioactive compounds (Review). In book: Microwave Heating Publisher: Intech Open.
- [17] Bas, D., & Boyac, I. (2007). Modeling and optimization II: Comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a biochemical reaction. *J. Food Eng.*, *78*, 846-854.
- [18] Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* *299*, 152-178.
- [19] Zengin, G., Cakmak, Y.S., Guler, G.O., & Aktumsek, A. (2010). In vitro antioxidant capacities and fatty acid compositions of three *Centaurea* species collected from Central Anatolia region of Turkey. *Food Chem. Toxicol.* *48*, 2638-2641.
- [20] Boulekbache-Makhlouf, L., Medouni, L., Medouni-Adrar, S., Arkoub, L., & Madani, K. (2013). Effect of solvents extraction on phenolic content and antioxidant activity of the byproduct of eggplant. *Ind. Crops Prod.*, *49*, 668-674.
- [21] Quiles-Carrillo, L., Mellinas, C., Garrigós, M. D. C., Balart, R., & Torres-Giner, S. (2019). Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic compounds with antioxidant activity from carob pods. *Food Anal. Methods*, *12*, 2480-2490.
- [22] Weremfo, A., Adulley, F., & Adarkwah-Yiadom, M. (2020). Simultaneous optimization of microwave-assisted extraction of phenolic compounds and antioxidant activity of avocado (*Persea americana* Mill.) seeds using response surface methodology. *J. Anal Methods Chem.*, *2020*, 1-11.
- [23] Maran, J.P., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., & Sridhar, R. (2013). Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel. *Carbohydr. Polym.*, *97*, 703-709.
- [24] Li, Y., Li, S., Lin, S.-J., Zhang, J. J., Zhao, C.-N., & Li, H.-B. (2017). Microwave-assisted extraction of natural antioxidants from the exotic *Gordonia axillaris* fruit: Optimization and identification of phenolic compounds. *Molecules*, *22*, 1481-1497.
- [25] Bengardino, M.B., Fernandez, M. V., Nutter, J., Jagus, R. J., & Aguero, M. V. (2019). Recovery of bioactive compounds from beet leaves through simultaneous extraction: modelling and process optimization. *Food Bioprod. Process.*, *118*, 227-236.
- [26] Valdés, A., Vidal, L., Beltran, A., Canals, A., & Garrigós, M. C. (2015). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from almond skin byproducts (*Prunus amygdalus*): A multivariate analysis approach. *J. Agric. Food Chem.*, *63*, 5395-5402.
- [27] Tsaltaki, C., Katsouli, M., Kekes, T., Chanioti, S., & Tzia, C. (2019). Comparison study for the recovery of bioactive compounds from *Tribulus terrestris*, *Panax ginseng*, *Gingko biloba*, *Lepidium meyenii*, *Turnera diffusa* and *Withania somnifera* by using microwave-assisted, ultrasound-assisted and conventional extraction methods. *Ind. Crops Prod.*, *142*, 111875.
- [28] Xianzhe, Z., Fangping, Y., Chenghai, L., & Xiangwen, X. (2011). Effect of process parameters of microwave assisted extraction (MAE) on polysaccharides yield from Pumpkin. *J. Northeast Agric. Univ.*, *8*, 79-86.
- [29] Chen, Y., Xie, M.Y., & Gong, X.F. (2007). Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. *J. Food Eng.*, *81*, 162-170.



- [30] He, B., Zhang, L. L., Yue, X. Y., Liang, J., Jiang, J., Gao, X. L., & Yue, P. X. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chem.*, 204, 70-76.
- [31] Roshani Neshat, R., Bimakr, M., & Ganjloo, A. (2020). Effects of binary solvent system on radical scavenging activity and recovery of verbascoside from Lemon verbena leaves. *J. Hum. Environ. Health Promot.*, 62(2), 69-76.
- [32] Zhao, C.-N., Zhang, J. J., Li, Y., Meng, X., & Li, H. B. (2018). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Melastoma sanguineum* fruit: Optimization and identification. *Molecules*, 23(10), 2498.