



DOI: 10.22069/efjpp.2020.15354.1499

نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد یازدهم، شماره دوم، ۹۸
۱۰۹-۱۳۲

http://efjpp.gau.ac.ir



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی کرمان

بهینه سازی استخراج گرمایی عصاره آبی آرد میوه عناب و مقایسه آن با عصاره هیدروالکلی

شادی بلوریان^۱، فخری شهیدی^۲، حامد حسینی^{۳*}، فرشته حسینی^۱، حامد صابریان^۱، محمد مالکی^۴
^۱استادیار گروه پژوهشی افزودنی های غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران
^۲استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
^۳عضو گروه پژوهشی افزودنی های غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران
^۴دانشجوی دکتری، گروه بهداشت مواد غذایی و آبریان، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۰۷

چکیده

سابقه و هدف: عملکرد سلامتی بخش میوه عناب مربوط به مجموعه ای از ترکیب های فراسودمند موجود در بخش های مختلف این میوه می باشد. ترکیب های زیست فعال و ظرفیت ضد اکسایشی میوه عناب تحت تاثیر عوامل مختلف مثل وارپته، شرایط کاشت، آلودگی پس از برداشت و مرحله رسیدن میوه قرار دارد. هدف از مطالعه حاضر، بهینه سازی شرایط فرایند استخراج عصاره آبی از میوه عناب کاشت شده در ایران و مقایسه مقدار ترکیب های زیست فعال آن با عصاره هیدروالکلی و مقادیر ذکر شده در سایر مطالعات می باشد.

مواد و روش ها: از روش سطح پاسخ برای تعیین مقادیر بهینه ی متغیرهای مستقل، شامل نسبت مایع به جامد، زمان استخراج و دمای استخراج استفاده شد. به این منظور، مقدار مشخصی از آرد عناب با آب مقطر (نسبت های مایع به جامد ۱:۱۰، ۱:۲۵ و ۱:۴۰) مخلوط شده و فرایند استخراج در زمان ها (۳۰ تا ۳۰۰ دقیقه) و دماهای متفاوت (۳۰ تا ۷۰ درجه سانتی گراد) با سرعت همزدن ثابت (۲۵۰ دور در دقیقه) انجام گردید. در نهایت، بازده استخراج کل، مقدار فنول کل، مقدار فلاونوئید کل و ظرفیت ضد اکسایشی عصاره بهینه آبی با عصاره هیدروالکلی (اتانول ۶۰ درصد) و ترکیب ضد اکسایش سنتزی BHT مقایسه شد.

یافته ها: بازده استخراج کل، مقدار فنول کل، مقدار فلاونوئید کل و IC₅₀ برای عصاره های حاصل از فرایند استخراج گرمایی به ترتیب، بین ۵۰/۴۸ تا ۷۷/۹۷ درصد (گرم ماده خشک عصاره بازای ۱۰۰ گرم وزن خشک میوه عناب)، ۸/۲۳ تا ۱۴/۳۸ معادل میلی گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک عصاره، ۱/۴۲ تا ۳/۹۳ معادل میلی گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک عصاره و ۱۶۹۱۱/۶ تا ۳۴۰۲۱/۳ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره عناب تغییر نمودند. مدل چند وجهی مرتبه دوم به شکل مطلوبی برای توصیف رابطه بین متغیرهای پاسخ و متغیرهای مستقل طی فرایند استخراج استفاده شد. شرایط بهینه، شامل زمان ۳۰ دقیقه، دمای ۶۶/۸۸ درجه سانتی گراد و نسبت مایع به جامد ۱:۴۰ برای رسیدن به حداکثر کارایی استخراج، شامل بالاترین مقدار بازده استخراج کل (۷۷/۶۷ درصد)، مقدار فنول کل (۱۳/۹۳ میلی گرم بر گرم) و مقدار فلاونوئید کل (۴/۵۶ میلی گرم بر گرم)، علاوه بر حداقل شاخص IC₅₀ (۲۱۵۷۷ میکروگرم بر میلی لیتر)، تعیین شد. با افزودن اتانول به محیط استخراج (۶۰ درصد)، مقدار ترکیب های فنولی و فلاونوئیدی استخراج شده، و ظرفیت ضد اکسایشی، به ترتیب ۱/۱۲، ۲/۶۵ و ۱/۴۵ برابر افزایش نشان دادند.

*مسئول مکاتبه: hosseini_hamed63@yahoo.com

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد در عصاره هیدروالکلی با غلظت ده هزار ppm (۳۳/۰۸ درصد) نزدیک به فعالیت مهارکنندگی BHT در غلظت ۵۰۰ ppm (۳۵/۵۷ درصد) گردید.

نتیجه گیری: عصاره آبی و هیدروالکلی عنب دارای مقادیر مناسب ترکیب‌های زیست فعال بود، با این حال، با توجه به ظرفیت ضد اکسایش پایین آن و گزارش‌های متفاوت در مورد ظرفیت ضد اکسایشی عنب تولیدی نقاط متفاوت جهان که تحت تاثیر دوره رسیدگی و زمان نگهداری پس از برداشت آن عنوان شده است، پیشنهاد جایگزینی آن با ضد اکسایش‌های سنتزی تحت تاثیر قرار می‌گیرد. اما، می‌توان از آرد میوه عنب یا عصاره حاصل از آن به عنوان ترکیب فراسودمند در محصولات غذایی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: میوه عنب، بهینه‌سازی عصاره آبی، روش سطح پاسخ، عصاره هیدروالکلی، ضد اکسایش سنتزی.

مقدمه

میوه عناب^۱ با نام علمی *Ziziphus jujube* متعلق به خانواده *Rhamnaceae*، یک درخت میوه مقاوم است که گونه‌های مختلف آن دارای خواص بسیار ارزشمند ضد میکروبی، ضد اکسایشی، تقویت‌کننده سیستم ایمنی، ضد دیابت، درمان قند خون بالا و ضد سرطان هستند. علاوه بر این، میوه عناب به طور گسترده به عنوان یک داروی سنتی برای درمان بی خوابی و استرس استفاده می‌گردد (۱). رشد تولید جهانی میوه عناب تحت تاثیر افزایش تقاضا در صنایع غذا و داروسازی برای این محصول بوده و بخش عمده عناب تولیدی جهان به شکل‌های تازه و خشک مصرف می‌شود (۲).

میوه‌های عناب حاوی مقادیر بالای قند (۹/۸ تا ۱۴/۷ درصد بر حسب وزن مرطوب) و چندین ترکیب مهم شامل ویتامین‌های ضروری، فلاونوئیدها، ترکیب‌های فنولی متفاوت (عمدتا شامل اسید گالیک، اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، اسید پروتوکاتچین و اسید کافئیک)، اسید تری ترپنیک، ترکیب‌های معدنی، پلی ساکاریدها و فیبر هستند که این ترکیب‌ها به عنوان عامل اصلی بسیاری از عملکردهای بیولوژیک میوه عناب شناخته می‌شوند (۳). اثر درمانی گیاهان از نظر طب سنتی نتیجه‌ای از برهمکنش تعدادی از ترکیب‌های زیست فعال می‌باشد به طوری که، یک یا تعداد کمی از ترکیب‌ها نمی‌توانند مسئول عملکرد دارویی نهایی برای گیاه مورد نظر باشند. بنابراین، تعیین همزمان چند ترکیب زیست فعال در یک عصاره می‌تواند روش مناسبی برای ارزیابی کیفی جامع آن باشد (۴).

روش‌های بسیاری برای استخراج ترکیب‌های زیست فعال از گیاهان وجود دارد که از آن جمله می‌توان به روش‌های سوکسله، غرقابی (خیساندن)،

استخراج با آب گرم، استخراج به کمک سیال فوق بحرانی و استخراج به کمک فراصوت یا امواج مایکرو اشاره نمود (۵). روش استخراج مرسوم خیساندن با حلال‌های تک جزئی یا چند جزئی، روش معمول برای استخراج ترکیب‌های فنولی از گیاهان مختلف می‌باشد. ادعا می‌شود که این روش دارای معایبی شامل دمای بالا، زمان عملیات طولانی و بازده استخراج پایین می‌باشد. بنابراین، توصیه می‌شود که از روش‌های استخراج کمکی مثل امواج فراصوت، امواج مایکرو و غیره برای تشدید استخراج این ترکیب‌های استفاده شود. با این حال، مشخص شده است که با استفاده از بهینه سازی شرایط استخراج گرمایی می‌توان به نتایج مطلوب مشابه روش‌های پیشرفته دست یافت. در این رابطه، حسینی و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهشی به بهینه سازی شرایط استخراج ترکیب‌های فنولی از برگ رزماری با استفاده از دو روش گرمایی و فراصوت پرداختند. آن‌ها نشان دادند که روش گرمایی در شرایط بهینه طی زمان ۳۰ دقیقه می‌تواند نتایجی بهتر از روش فراصوت در شرایط مشابه با زمان ۱۲ دقیقه فراهم نماید (۶). کوچیک و همکاران (۲۰۱۶) نیز با استفاده از استخراج غرقابی در دمای محیط، به نتایج بهتری نسبت به روش فراصوت در دما و زمان مشابه (دمای محیط، زمان ۶۰ دقیقه) برای استخراج ترکیب‌های فنولی موجود در یک نوع توت دست یافته بودند (۷). روش سطح پاسخ به طور گسترده برای بهینه سازی شرایط استخراج ترکیب‌های زیست فعال از گیاهان مختلف مثل رزماری، توت، دانه قهوه، انگور فرنگی و غیره استفاده شده است (۶-۹). کاسترو لویز و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی اثر روش استخراج بر ظرفیت ضد اکسایشی و ترکیب شیمیایی عصاره‌های فنولی حاصل از چندین گیاه مختلف (*Punica granatum*, *Juglans regia*, *Moringa oleifera* و *Cassia fistula*) پرداختند. آن‌ها

1. Jujube

چکشی صنعتی (Best Engineering CO., India) به قطعات کوچکتر خرد شده و با استفاده از الک، هسته‌ها از گوشته جدا شدند. سپس، تکه‌های گوشته توسط آسیاب چکشی به قطعات کوچکتر خرد شدند و در نهایت توسط یک آسیاب آزمایشگاهی (POLYMIX, PX-MFC 90 D, سوئیس) به آرد میوه عناب تبدیل گردیدند. آرد حاصل از مش ۳۰ عبور داده شد و تا زمان استفاده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردید (۳).

روش استخراج عصاره و طرح آزمایش: به منظور طراحی و بهینه‌سازی شرایط استخراج گرمایی عصاره آبی عناب، طرح مرکب مرکزی ثابت^۱ با ۱۸ آزمایش، شامل ۴ تکرار نقطه مرکزی و ۱۴ نقطه غیر مرکزی، برای بهینه‌سازی متغیرهای مستقل روش سطح پاسخ^۲ و ایجاد یک مدل توصیف کننده پاسخ‌ها استفاده شد که جزئیات آن در مطالعه فنگ و همکاران (۲۰۱۴) اشاره شده است (۱۲). بنابراین، روش سطح پاسخ برای تعیین مقادیر بهینه متغیرهای مستقل، شامل نسبت مایع به جامد (حجمی/وزنی)، زمان استخراج (دقیقه) و دمای استخراج (درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. به این منظور، مقدار مشخصی از آرد عناب (۲ گرم) با آب مقطر (نسبت های مایع به جامد ۱:۱۰، ۱:۲۵ و ۱:۴۰) مخلوط شده و فرایند استخراج در زمان‌ها (۳۰ تا ۳۰۰ دقیقه) و دماهای متفاوت (۳۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد) با سرعت همزدن ثابت (۲۵۰ دور در دقیقه) انجام گردید. محدوده متغیرها بر اساس آزمایش‌های اولیه و ارزیابی مقدار فنول کل عصاره‌های حاصل انتخاب شدند. عمل استخراج در ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری درب سنباده‌ای مجهز به درپوش شیشه‌ای برای جلوگیری از افت حلال طی فرایند استخراج انجام شد. به منظور تامین دمای لازم،

اذعان داشتند که روش استخراج بر نوع و میزان ترکیب‌های فنولی استخراج شده تاثیر مهمی دارد به طوریکه، بهترین نتایج به ترتیب، با استفاده از روش‌های استخراج به کمک امواج مایکرو، استخراج گرمایی، استخراج مرسوم در دمای محیط و استخراج به کمک امواج فراصوت حاصل شده بود (۱۰). از طرف دیگر، سفدر و همکاران (۲۰۱۷) مشاهده نمودند که روش فراصوت منجر به استخراج موثرتر ترکیب‌های فنولی میوه کینو (نوعی مرکبات) در مقایسه با روش خیساندن مرسوم در دمای محیط می‌گردد (۱۱). این یافته‌ها نشان دهنده ضرورت بهینه‌سازی روش‌های مختلف استخراج برای گیاهان متفاوت می‌باشد. علاوه بر این، نوع حلال مورد استفاده نیز دارای اثر مهمی بر نوع و میزان ترکیب‌های فنولی استخراج شده از گیاهان می‌باشد، زیرا ترکیب‌های زیست فعال دارای قطبیت متفاوتی از خود نشان می‌دهند که حلالیت آن‌ها در حلال‌های مختلف را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۷).

در بررسی تحقیقات پیشین تا کنون گزارشی در مورد بهینه‌سازی استخراج عصاره آبی میوه عناب، به‌ویژه عناب رشد یافته در ایران، مشاهده نشد. بنابراین در تحقیق حاضر، ترکیب‌های زیست فعال و ویژگی‌های ضد اکسایشی عصاره آبی حاصل از میوه عناب، به‌عنوان یک محصول تولیدی مهم کشور، به منظور بررسی امکان کاربرد آن در صنعت غذا مورد ارزیابی و بهینه‌سازی قرار گرفت. علاوه بر این، عصاره آبی بهینه عناب با عصاره هیدروالکلی آن و ترکیب ضد اکسایش سنتزی BHT مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد اولیه: میوه‌های عناب خشک شده از جهاد دانشگاهی بیرجند تهیه شدند. نمونه‌ها توسط آسیاب

1. Face-centered central composite design
2. Response surface methodology

تعیین بازده استخراج کل عصاره: حجم مشخصی از هر عصاره (تقریباً ۵ میلی‌لیتر) توزین و در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید، سپس وزن جدید ثبت شد. در نهایت، بازده استخراج کل بر حسب گرم ماده خشک عصاره بازای ۱۰۰ گرم وزن خشک میوه عناب گزارش گردید (۱۶).

تعیین مقدار فنول کل عصاره: مقدار فنول کل به روش فولین-سیوکالتو^۲ مطابق توصیف سینگلتون و همکاران (۱۹۹۹) تعیین گردید (۱۷). مقدار فنول کل بر حسب معادل میلی‌گرم اسید گالیک در یک لیتر عصاره (ppm) توسط معادله درجه اول (۲۸/۶۳۴ - $Y=511/86X$) حاصل از رسم غلظت‌های متفاوت اسید گالیک (صفر تا ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در مقابل عدد جذب آن‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر تعیین گردید، سپس نتایج بر حسب معادل میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک عصاره جهت بهینه سازی شرایط استخراج محاسبه شدند.

تعیین مقدار فلاونوئید کل عصاره: مقدار فلاونوئید کل با استفاده از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم مطابق روش ژیشن و همکاران (۱۹۹۹) با کمی اصلاحات ارزیابی شد (۱۸). ۰/۲۵ میلی‌لیتر عصاره نمونه به لوله آزمون حاوی ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و با ۰/۱۵ میلی‌لیتر محلول ۵ درصد نیتريت سدیم مخلوط شد. بعد از گذشت دقیقاً ۵ دقیقه، ۰/۳ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد به این مخلوط اضافه، مجدداً ۵ دقیقه نگهداری و سپس، یک میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم یک مولار به آن اضافه گردید و جذب مخلوط در ۵۱۰ نانومتر در مقابل شاهد، شامل تمام مراحل ذکر شده بدون افزودن عصاره، ثبت گردید. جهت تعیین مقدار فلاونوئیدها بر

ارلن داخل یک بشر ۴۰۰ میلی‌لیتری حاوی مقداری آب و مجهز به دماسنج قرار گرفت و دمای محیط استخراج توسط هات پلیت (-Heidolph MR Hei-End, آلمان) تنظیم گردید. در پایان هر استخراج، مخلوط با استفاده از یخ تا دمای محیط سرد گردید، سپس در ۶۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ (Herolab unicen FR, آلمان) شد، مایع بالایی از کاغذ صافی واتمن شماره یک عبور داده شد و تا زمان آزمایش‌های بیشتر در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۱۳). متغیرهای پاسخ جهت بهینه سازی شرایط استخراج عصاره آبی حاصل از آرد میوه عناب شامل بازده استخراج کل (بر حسب گرم عصاره خشک بازای ۱۰۰ گرم وزن خشک آرد میوه عناب)، مقدار فنول کل (بر حسب معادل میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک عصاره)، مقدار فلاونوئید کل (بر حسب معادل میلی‌گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک عصاره) و شاخص IC_{50} به عنوان غلظت لازم عصاره برای رسیدن به ۵۰ درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH^۱ (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)، انتخاب شدند و هر یک از این شاخص‌ها به شرح زیر تعیین گردید. علاوه بر این، بهترین عصاره حاصل از مرحله بهینه سازی استخراج آبی، با یک عصاره آبی الکلی (غلظت اتانول ۶۰ درصد) مورد مقایسه قرار گرفت تا تاثیر نوع حلال بر کارایی استخراج ترکیب‌های موثره مشخص گردد. غلظت اتانول آبی مورد استفاده در فرایند استخراج بر اساس آزمایش‌های مقدماتی و اطلاعات ارائه شده در کارهای قبلی انتخاب شد (۱۴، ۱۵). آزمایش مقدماتی با غلظت اتانول متفاوت (۳۰ تا ۸۰ درصد) در شرایط بهینه استخراج آبی انجام شد که نتایج آن، غلظت انتخابی (۶۰ درصد) را تایید نمود.

استفاده از طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی انجام شد و به منظور بررسی همبستگی بین آزمون های مختلف، مقادیر پاسخ ها در مقابل هم رسم شده و میزان نزدیکی آن ها به خط مرجع به عنوان ضریب همبستگی r^2 تعریف گردید (۶).

بحث و نتیجه گیری

نتایج آزمایش های عملی استخراج گرمایی در شرایط مختلف زمان (۳۰ تا ۳۰۰ دقیقه)، دما (۳۰ تا ۷۰ درجه سانتی گراد) و نسبت مایع به جامد (۱:۱۰ تا ۱:۴۰) در جدول ۱ ارائه شده اند. رابطه بین بازده استخراج، مقدار فنول و فعالیت ضد اکسایشی می تواند ارزش بیولوژیکی عصاره های گیاهی را مشخص نماید (۲۰)؛ بنابراین در مطالعه حاضر، این شاخص ها به عنوان متغیر پاسخ استفاده شدند. بازده استخراج کل، مقدار فنول کل، مقدار فلاونوئید کل و IC_{50} برای عصاره های حاصل از فرایند استخراج گرمایی به ترتیب، بین ۵۰/۴۸ تا ۷۷/۹۷ درصد (گرم ماده خشک عصاره به ازای ۱۰۰ گرم وزن خشک میوه عنب)، ۸/۲۳ تا ۱۴/۳۸ معادل میلی گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک عصاره (یا ۳۴۰/۹۹ تا ۱۴۰۲/۰۸ ppm بر حسب عصاره خام)، ۱/۴۲ تا ۳/۹۳ معادل میلی گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک عصاره (یا ۷۸/۱۴ تا ۳۱۷/۲۹ ppm بر حسب عصاره خام) و ۱۶۹۱۱/۶ تا ۳۴۰۲۱/۳ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره عنب تغییر نمودند. در ادامه، حداکثر مقدار شاخص های بررسی شده در پژوهش حاضر با گزارش های قبلی برای عصاره حاصل از میوه عنب مقایسه گردید. میراکیلوا و همکاران (۲۰۱۶) با وجود سه بار استخراج میوه خرد شده عنب با آب داغ (۱:۳۰)، بازده استخراج کمتری (۵۸ درصد بر مبنای ماده خشک) در مقایسه با حداکثر بازدهی استخراج کل در مطالعه حاضر کسب نمودند (۲۱).

حسب معادل میلی گرم کوئرستین^۱ در یک لیتر عصاره (ppm)، از منحنی استاندارد کوئرستین (صفر تا ۵ میلی گرم بر میلی لیتر) با معادله درجه اول $Y=885/74X-6/0049$ ($R^2=1$) استفاده شد و جهت بهینه سازی شرایط استخراج، نتایج بر حسب معادل میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک عصاره محاسبه شدند.

تعیین ظرفیت ضد اکسایشی عصاره (ارزیابی مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH): فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد عصاره میوه عنب بر طبق روش برند-ویلیامز و همکاران (۱۹۹۵) بر اساس توانایی مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH صورت گرفت. به منظور بهینه سازی شرایط استخراج، نتایج به عنوان عدد IC_{50} بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر عصاره محاسبه گردید. شاخص IC_{50} معیاری از توانایی مهار رادیکال آزاد عصاره می باشد، به طوریکه مقادیر پایینتر آن نشان دهنده توانایی بالاتر عصاره در مهار رادیکال آزاد می باشد (۱۹). علاوه بر این، یک محلول از بوتیلید هیدروکسی تولوئن (BHT) در غلظت های متفاوت (۱۰۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تهیه شده و عدد IC_{50} آن جهت مقایسه با عصاره بهینه عنب تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایش ها در دو تکرار انجام و میانگین آن ها در ارزیابی سطح پاسخ استفاده شدند. تحلیل آماری نتایج، شامل ANOVA، همبستگی داده ها و مدلسازی فرایند استخراج توسط نرم افزار آماری Design-Expert (Stat-Ease، ویرایش ۱۰، آمریکا) انجام شد. نمودارهای سطح پاسخ سه بعدی توسط این نرم افزار و در نقطه مرکزی متغیرهای مستقل رسم شدند. مقایسه بین استخراج آبی و هیدروالکلی با

1. Quercetin
2. Butylated hydroxytoluene

جدول ۱- طرح مرکب مرکزی ثابت به همراه متغیرهای مستقل و مقادیر واقعی پاسخ ها.

Table 1. Face-centered central composite design (CCD) experimental design with natural independent variables and experimental data for the observed responses.

آزمایش (Run)	متغیرهای مستقل Independent variables			پاسخ ها Responses			
	زمان (Time min; A)	دما (Temperature °C; B)	مایع به جامد (LS ratio mL g ⁻¹ ; C)	TEY ^a	TPC ^b	TFC ^c	IC ₅₀ ^d
1	165	50	10	50.8781	9.18	1.59	26554.8
2	165	30	25	71.6161	11.65	2.43	20306.2
3	165	70	25	72.0429	11.21	2.92	28209.5
4	165	50	25	71.8295	13.02	2.74	24266.7
5	300	30	10	50.5658	8.66	1.42	22667.7
6	30	30	40	77.2394	14.03	2.96	16911.6
7	165	50	25	72.1302	12.81	2.68	26297.3
8	300	70	40	77.8223	12.42	3.93	28608.6
9	30	70	40	77.3122	14.05	3.80	21954.6
10	165	50	25	72.0856	12.68	2.64	25000
11	165	50	40	76.968	14.38	3.33	23339.7
12	30	70	10	50.4783	8.75	2.15	24308.4
13	30	50	25	72.1709	13.63	3.10	20575.5
14	300	30	40	76.9479	13.37	3.10	19534.9
15	30	30	10	50.7781	8.76	1.64	19505.8
16	300	50	25	72.6831	13.01	2.90	28123.4
17	300	70	10	51.3028	8.23	1.99	34021.3
18	165	50	25	72.0002	12.59	2.68	25800

^a بازده استخراج کل بر حسب گرم عصاره خشک بازای ۱۰۰ گرم وزن خشک میوه عناب.

^b مقدار فنول کل بر حسب معادل میلی گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک عصاره.

^c مقدار فلاونوئید کل بر حسب معادل میلی گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک عصاره.

^d غلظت عصاره مورد نیاز برای رسیدن به ۵۰ درصد بازداري رادیکال آزاد DPPH بر حسب مایکروگرم بر میلی لیتر.

^a Total extraction yield is grams of dry extracts per 100 g of dry weight of jujube fruit.

^b Total polyphenols content by mg Gallic acid equivalent /g of extract dry weight.

^c Total flavonoid content by mg Quercetin equivalent /g of extract dry weight.

^d The extract concentration required to 50% inhibition of DPPH*; µg/mL.

خوراکی میوه سه واریته متفاوت میوه عناب، به ترتیب بین ۱/۶ تا ۳/۲۸، ۲/۷۶ تا ۱۸/۵۲ و ۲/۱۷ تا ۳/۹ معادل میلی گرم کوئرستین در گرم ماده خشک عصاره تغییر نمودند، درحالیکه این مقادیر برای مقدار فنول کل به ترتیب، ۲/۲۸ تا ۴/۱۶، ۶/۰۸ تا ۳۲/۸ و ۵/۵۷ تا ۸/۱۳ معادل میلی گرم اسید گالیک در گرم ماده خشک عصاره ثبت شده بودند. در پژوهش آنها، با وجود استفاده از اتانول آبی جهت استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی، مقادیر کمتری برای ترکیب‌های زیست فعال موجود در گوشته عناب نسبت به کار حاضر ثبت شده بود (۲۳).

در بین پژوهش‌های انجام شده، مقدار بالاتر ۱۴۹/۳۲ معادل میلی گرم اسید گالیک بر گرم ماده

بر اساس گزارش لی و همکاران (۲۰۰۷)، مقدار ترکیب‌های فنولی گونه‌های مختلف عناب رشد یافته در چین بین ۵/۱۸ تا ۸/۵۳ معادل میلی گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک عصاره تغییر نمود (۲۲). الالوی و همکاران (۲۰۱۶) این تغییرات را برای گونه‌های مختلف عناب رشد یافته در تونس بین حدود ۴ تا ۶ معادل میلی گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک عصاره گزارش نمودند (۱). ژانگ و همکاران (۲۰۱۰) اذعان داشتند که بیشترین ظرفیت ضد اکسایشی، ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی و آنتوسیانین‌ها در پوسته عناب یافت می‌شود. بر اساس نتایج آنها، مقدار فلاونوئید کل عصاره آبی الکلی (۸۰ درصد اتانول) حاصل از هسته، پوسته و بخش

عنان طی مراحل رسیدن به ترتیب، از ۶۵/۸ به ۲۰/۱ معادل میلی گرم اسید گالیک در گرم ماده خشک و از ۸۵ به ۱۰ معادل میلی گرم راتین بر گرم ماده خشک گزارش شده بود. این مقادیر برای گوشته میوه عناب به ترتیب، از ۳۲/۳ به ۲۲ معادل میلی گرم اسید گالیک در گرم ماده خشک و از ۱۰ به ۵ معادل میلی گرم راتین بر گرم ماده خشک بود. آن‌ها با توجه به شاخص‌های ارزیابی شده، بهترین زمان برداشت میوه عناب را در مرحله رنگ سفید معرفی نمودند (۳).

ضریب همبستگی (R^2) جهت ارزیابی رابطه بین متغیرهای پاسخ تعیین شد که نتایج آن در جدول ۲ ارائه شده است. بر طبق جدول ۲، همبستگی بالایی بین واحدهای مورد استفاده برای هر شاخص مشاهده شد که نشان دهنده امکان استفاده از هر دو واحد برای بهینه سازی شرایط استخراج می‌باشد. بنابراین، یکی از واحدها برای هر متغیر پاسخ انتخاب و در ارزیابی شرایط بهینه استفاده گردید. رابطه ضعیف بین ترکیب‌های فنولی یا فلاونوئیدی و ظرفیت ضد اکسایشی عصاره‌ها نشان دهنده این است که احتمالاً، سایر ترکیب‌ها نیز در ظرفیت ضد اکسایشی عصاره عناب نقش دارند (جدول ۱).

خشک عصاره) هم توسط شمس نجف آبادی و همکاران (۲۰۱۷) برای مقدار ترکیب‌های فنولی میوه عناب تازه گزارش شد که با توجه به عدم شباهت و فاصله زیاد با سایر مطالعات (حتی مطالعات ذکر شده در مقاله آن‌ها)، می‌توان آن را ناشی از خطا در محاسبه مقدار ترکیب‌های فنولی توسط آن‌ها یا زمان برداشت متفاوت میوه عناب دانست (۲۴). به طور کلی، مقدار فنول کل میوه عناب به عوامل گوناگون مانند واریته گیاه، شرایط رشد، کود استفاده شده و مقدار نور دریافت شده توسط گیاه بستگی داشته و بین ۲/۲ تا ۴۶ معادل میلی گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک عصاره تغییر می‌کند (۳، ۱۴). رنگ پوسته عناب طی مراحل رسیدن، از رنگ سبز به سفید و سپس، قرمز تغییر می‌کند. وانگ و همکاران (۲۰۱۳) بیشترین ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی، و بالاترین ظرفیت ضد اکسایشی در پوست عناب را در مرحله رنگ سبز این میوه ثبت نمودند و بعد از مرحله رنگ سفید، افت معنی دار این شاخص‌ها را مشاهده نمودند. در مورد گوشته میوه، این شاخص‌ها بعد از مرحله رنگ سبز دچار افت شدند. بر اساس نتایج آن‌ها، تغییرات ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی پوسته میوه

جدول ۲- میزان همبستگی بین متغیرهای پاسخ ارزیابی شده طی فرایند استخراج گرمایی.

Table 2. The correlation extent between response variables actually assessed during heat-assisted extraction.

شاخص‌ها (Indices)	ضرایب همبستگی (Correlation coefficients, R^2)					
	TEY ^a	EY ^b	TPC ^c	TPY ^d	TFC ^e	TFY ^f
TEY	-	1	0.99	0.91	0.91	0.79
EY	1	-	0.99	0.91	0.92	0.79
TPC	0.99	0.99	-	0.87	0.91	0.8
TPY	0.91	0.91	0.87	-	0.86	0.7
TFC	0.92	0.92	0.91	0.86	-	0.57
IC ₅₀ ^g	0.05	0.06	0.04	0.11	0.13	0.003

^a بازده استخراج کل بر حسب گرم عصاره خشک بازای ۱۰۰ گرم وزن خشک آرد میوه عناب. ^b بازده استخراج بر حسب گرم ماده خشک در ۱۰۰ میلی لیتر عصاره. ^c مقدار فنول کل بر حسب معادل میلی گرم اسید گالیک در یک لیتر عصاره (ppm). ^d مقدار فنول کل بر حسب معادل میلی گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک عصاره. ^e مقدار فلاونوئید کل بر حسب معادل میلی گرم کوئرستین در یک لیتر عصاره (ppm). ^f مقدار فلاونوئید کل بر حسب معادل میلی گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک عصاره. ^g غلظت عصاره مورد نیاز برای رسیدن به ۵۰ درصد بازدارای رادیکال آزاد DPPH بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر.

^a Total extraction yield (TEY) is grams of dry extracts per 100 g of dry weight of jujube flour. ^b Extraction yield (EY) is grams of dried extract in 100 mL of the sample. ^c Total polyphenols content by mg Gallic acid equivalent /L of extract (ppm). ^d Total polyphenols content by mg GAE/g of extract dry weight. ^e Total flavonoid content by mg Quercetin equivalent /L of extract (ppm). ^f Total flavonoid content by mg Quercetin equivalent /g of extract dry weight. ^g The extract concentration required to 50% inhibition of DPPH* by $\mu\text{g/mL}$.

جدول ۳- تجزیه و تحلیل واریانس مدل های پاسخ حاصل از طرح مرکب مرکزی برای استخراج حرارتی ترکیبات فنولی از آرد میوه عناب.
Table 3. ANOVA results of regression models estimated from central composite design for heat-assisted extraction of polyphenols from jujube fruit mill.

مقدار فنول کل Total phenol content			بازده استخراج کل Total extraction yield			متغیر ANOVA Source
Regression Coefficient	P-Value	F-value	Regression Coefficient	P-Value	F-value	
12.77	< 0.0001	347.61	72.03	< 0.0001	9655.28	Model
-0.35	0.0001	50.50	0.13	0.0242	7.69	A- زمان (A-Time)
-0.18	0.0062	13.52	0.18	0.0057	13.98	B- دما (B-Temp.)
2.47	< 0.0001	2490.59	13.23	< 0.0001	74590.95	C- مایع به جامد (C-LS ^b)
-0.17	0.0138	9.86	0.23	0.0028	18.01	AB
-0.21	0.0055	14.15	-0.049	0.3903	0.82	AC
-0.062	0.2965	1.25	0.064	0.2729	1.39	BC
0.57	0.0003	35.53	0.38	0.0037	16.43	A ²
-1.33	< 0.0001	194.96	-0.22	0.0454	5.61	B ²
-0.97	< 0.0001	105.25	-8.13	< 0.0001	7627.97	C ²
	0.7632	0.51		0.3853	1.53	عدم برازش مدل Lack-of-fit
	1.32			0.23		CV ^c %
	0.997 / 0.99 / 0.98			0.999 / 0.999 / 0.999		R ² /R ² _{Adj} /R ² _{Pred} ^e
غلظت مورد نیاز برای ۵۰ درصد بازداری رادیکال IC ₅₀ ^a			مقدار فلاونوئید کل Total flavonoid content			
Regression Coefficient	P-Value	F-value	Regression Coefficient	P-Value	F-value	
25233.08	< 0.0001	51.54	2.71	< 0.0001	174.60	Model
2970.00	< 0.0001	141.63	-0.030	0.2251	1.73	A- زمان (A-Time)
3817.62	< 0.0001	234.00	0.32	< 0.0001	196.29	B- دما (B-Temp.)
-1670.86	0.0002	44.82	0.83	< 0.0001	1296.20	C- مایع به جامد (C-LS ^b)
1322.71	0.0015	22.47	6.675×10 ⁻³	0.8031	0.066	AB
-449.69	0.1457	2.60	0.082	0.0132	10.04	AC
-254.94	0.3876	0.83	0.074	0.0217	8.08	BC
-775.72	0.1443	2.62	0.26	0.0004	34.51	A ²
-867.32	0.1080	3.27	-0.066	0.1748	2.22	B ²
-177.92	0.7202	0.14	-0.28	0.0002	39.02	C ²
	0.6873	0.65		0.1079	5.00	عدم برازش مدل Lack-of-fit
	3.26			2.75		CV ^c %
	0.98 / 0.96 / 0.88			0.99 / 0.989 / 0.96		R ² /R ² _{Adj} /R ² _{Pred} ^e

^a غلظت مورد نیاز عصاره برای رسیدن به ۵۰ درصد بازداری رادیکال آزاد DPPH بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر؛ ^b نسبت مایع به جامد (حجمی/وزنی)؛ ^c ضریب تغییرات (درصد)؛ ^d ضریب تعیین تنظیم شده؛ ^e ضریب تعیین پیش بینی شده.

^a The extract concentration required to 50% inhibition of DPPH[•]; ^b Liquid-to-solid ratio (v/w); ^c Coefficient of variation; ^d Adjusted determination coefficient; ^e Predicted determination coefficient.

فنولی در مهار رادیکال‌های آزاد، رادیکال‌های سوپر اکسید و هیدروکسیل از طریق انتقال تک الکترونی^۱

برخی از مطالعات نشان دهنده رابطه مستقیم بین ظرفیت ضد اکسایشی و ترکیب‌های فنولی در گیاهان مختلف بوده و آن را ناشی از توانایی ترکیب‌های

1. Single-electron transfer

چند وجهی مرتبه دوم^۲ تناسب بالایی نشان دادند، به طوریکه کفایت مدل بر اساس مقادیر بالای شاخص F مدل معرفی شده در همه‌ی پاسخ‌ها تایید گردید. علاوه بر این، ضریب تعیین کل (R^2) شامل ضریب تعیین تنظیم شده و پیش بینی شده (R^2 -adj) و (R^2 -pred) معلوم نمود که مدل درجه دوم می‌تواند برای توصیف فضای آزمایش استفاده شود، زیرا علاوه بر ثبت مقادیر بالا برای این شاخص، اختلاف بین ضرایب تعیین تنظیم شده و پیش بینی شده از مقدار قابل قبول توصیه شده توسط نرم افزار آماری (۰/۲) کمتر گردید.

با توجه به ضریب تعیین کل مدل‌ها (جدول ۳)، بیش از ۹۹ درصد تغییر پذیری در متغیرهای پاسخ می‌تواند توسط مدل توضیح داده شود. علاوه بر این، عدم برازش مدل برای تمام پاسخ‌ها غیر معنی دار شد ($P > 0/1$) که نشان دهنده کفایت و تناسب مدل برای پیش بینی متغیرهای پاسخ می‌باشد (۲۸). ضریب تغییر^۳ به عنوان معیاری از درجه پراکندگی داده‌ها، برای تمام پاسخ‌ها به اندازه کافی بالا بود و تناسب مدل برای پیش بینی تمام پاسخ‌ها را تایید نمود (۲۹). معادله‌های چند وجهی مرتبه دوم ۱، ۲، ۳ و ۴ بر حسب متغیرهای غیر کد گذاری شده، برای توصیف رابطه بین متغیرهای پاسخ و سه متغیر استخراج، به ترتیب شامل زمان استخراج (A)، دمای استخراج (B) و نسبت مایع به جامد (C) توسط نرم افزار آماری به شرح زیر معرفی شدند.

معادله (۱) بازده استخراج

$$\text{Total extraction yield} = 26.84542 - 9.48314 \times 10^{-3} A + 0.044783 B + 2.68125 C + 8.51083 \times 10^{-5} AB - 2.42891 \times 10^{-5} AC + 2.12530 \times 10^{-4} BC + 2.06959 \times 10^{-5} A^2 - 5.50823 \times 10^{-4} B^2 - 0.036119 C^2$$

معادله (۲) مقدار فنول کل

$$\text{Total phenol content} = -1.82623 - 7.07277 \times 10^{-3} A + 0.33827 B + 0.40835 C - 6.43074 \times 10^{-5} AB - 1.02720 \times 10^{-4} AC - 2.05821 \times 10^{-4} BC +$$

می‌دانند (۲۲). با این حال، عدم همبستگی بین مقدار ترکیب‌های فنولی و ظرفیت ضد اکسایشی عصاره حاصل از ۶ نوع گیاه مختلف در سایر مطالعات مشاهده شده بود (۲۵، ۲۶). علاوه بر این، در تایید نتایج کار حاضر، لی و همکاران (۲۰۰۵) هیچ رابطه‌ای بین مقدار ترکیب‌های فنولی یا ویتامین C استخراج شده از پوسته و گوشته ۵ گونه میوه عناب و ظرفیت ضد اکسایشی آن مشاهده نمودند (۲۷). آن‌ها اذعان داشتند ویژگی‌های ذکر شده بالا تنها عوامل منحصر به فرد موثر بر ظرفیت ضد اکسایشی ترکیب‌های فنولی نیستند و سایر ترکیب‌های زیست فعال و اثر تشدید کننده بین آن‌ها نیز نقش مهمی در ظرفیت ضد اکسایشی عصاره گیاهی ایفا می‌نماید.

علاوه بر این، آن‌ها اعتقاد داشتند احتمالاً، ترکیب‌های فنولی دیگری نیز در عصاره عناب وجود دارند که با روش فولین-سیوکالتو به خوبی تعیین مقدار نمی‌شوند. با این حال، مطالعاتی هم وجود داشتند که همبستگی بالایی بین مقدار پلی فنول‌های کل، مقدار فلاونوئیدهای کل و ظرفیت ضد اکسایشی (تعیین شده بر اساس آزمون مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیا کنندگی آهن سه ظرفیتی) میوه عناب در مراحل مختلف رسیدن و قسمت‌های مختلف این میوه را گزارش نمودند (۳، ۲۳). این مقدار تناقض بین گزارش‌های مختلف می‌تواند ضرورت مطالعات بیشتر بر روی گونه‌های مهم عناب رشد یافته در کشور را تایید نماید.

مدلسازی فرایند استخراج: به منظور تعیین مقادیر

بهینه‌ی متغیرهای مستقل فرایند استخراج، نسبت‌های مایع به جامد ۱:۱۰، ۱:۲۵ و ۱:۴۰، دماهای استخراج ۳۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های استخراج متغیر بین ۳۰ و ۳۰۰ دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفتند. همان طور که در جدول ۳ قابل مشاهده است، نتایج آزمایشی حاصل از فرایند استخراج (جدول ۱) با مدل

2. Second-order polynomial model

3. Coefficient of variance

فرایند استخراج مشاهده شد. به طور کلی، انتقال جرم یا بازده استخراج بافت گیاهان با افزایش دما، افزایش نشان می‌دهد که علت آن کاهش کشش سطحی و ویسکوزیته حلال و افزایش سرعت انتشار و حلالیت مواد جامد تحت تاثیر افزایش دما می‌باشد (۳۱). با توجه به تحلیل آماری مربوط به اثر خطی نسبت مایع به جامد (شکل نشان داده نشده است)، بالاترین بازده استخراج کل (۷۷/۷۹ درصد) با استفاده از نسبت مایع به جامد ۱:۳۵ حاصل شد و در مقادیر بالاتر این نسبت، تغییر معنی‌داری در بازده استخراج کل مشاهده نشد. اشباع بودن محیط استخراج با ترکیب‌های استخراج شده یک عامل محدود کننده مهم است که پدیده انتشار سلولی را به طور منفی تحت تاثیر قرار می‌دهد و منجر به کاهش یا توقف انتقال جرم از بافت گیاه به حلال احاطه کننده آن می‌گردد، در حالی که این محدودیت با افزایش نسبت مایع به جامد در فرایند استخراج رفع می‌گردد (۷، ۳۲).

شرایط اعمال شده طی استخراج ترکیب‌های زیست فعال از گیاه می‌توانند به طور مستقل یا همزمان، کفایت استخراج را تحت تاثیر قرار دهند (۳۲). بنابراین، تصاویر سطح پاسخ سه بعدی نشان دهنده اثرات متقابل بین متغیرهای مستقل در شکل ۱ نمایش شده‌اند، به طوریکه اثر دو متغیر مستقل بر روی پاسخ تغییر یافته و متغیر مستقل دیگر در نقطه مرکزی ثابت می‌ماند. بر اساس تجزیه و تحلیل آماری (جدول ۳) و شکل ۱، بازده استخراج کل به طور معنی‌دار ($P < 0/01$) تحت تاثیر اثر متقابل زمان و دما قرار گرفت و اثرات متقابل سایر متغیرهای مستقل (AC و BC) بر روی پاسخ معنی‌دار ($P > 0/1$) نشد، بنابراین دما یا زمان فرایند به طور مستقل از نسبت مایع به جامد توانستند بازده استخراج کل را تحت تاثیر قرار دهند. در رابطه با اثرات متقابل متغیرهای مستقل بر روی پاسخ، نتایج مشابهی برای عصاره‌ی

$$3.10695 \times 10^{-5} A^2 - 3.31609 \times 10^{-3} B^2 - 4.33163 \times 10^{-3} C^2$$

معادله (۳) مقدار فلاونوئید کل

$$\begin{aligned} \text{Total flavonoid content} &= 0.24780 - \\ &6.09526 \times 10^{-003} A + 0.026245 B + 0.098410 C \\ &+ 2.47238 \times 10^{-6} AB + 4.05147 \times 10^{-5} AC + \\ &2.45397 \times 10^{-4} BC + 1.43431 \times 10^{-5} A^2 - \\ &1.65623 \times 10^{-4} B^2 - 1.23541 \times 10^{-3} C^2 \end{aligned}$$

معادله (۴) غلظت عصاره لازم برای رسیدن به ۵۰ درصد بازدهی رادیکال آزاد

$$\begin{aligned} IC_{50} &= 9833.42310 + 17.10292 A + 348.12253 \\ &B + 7.27716 C + 0.48989 AB - 0.22207 AC - \\ &0.84979 BC - 0.042563 A^2 - 2.16829 B^2 - \\ &0.79074 C^2 \end{aligned}$$

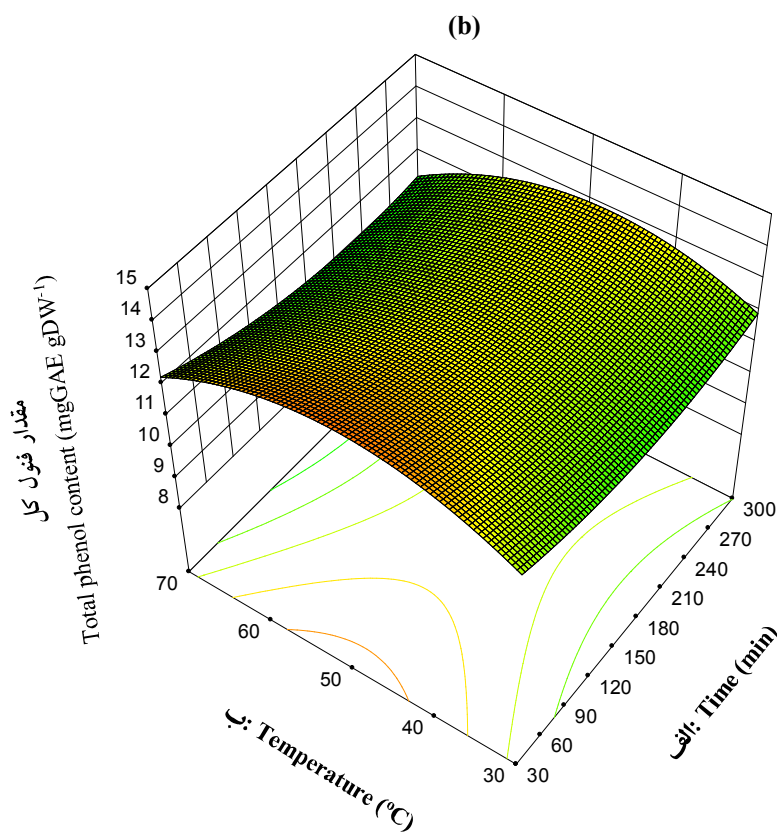
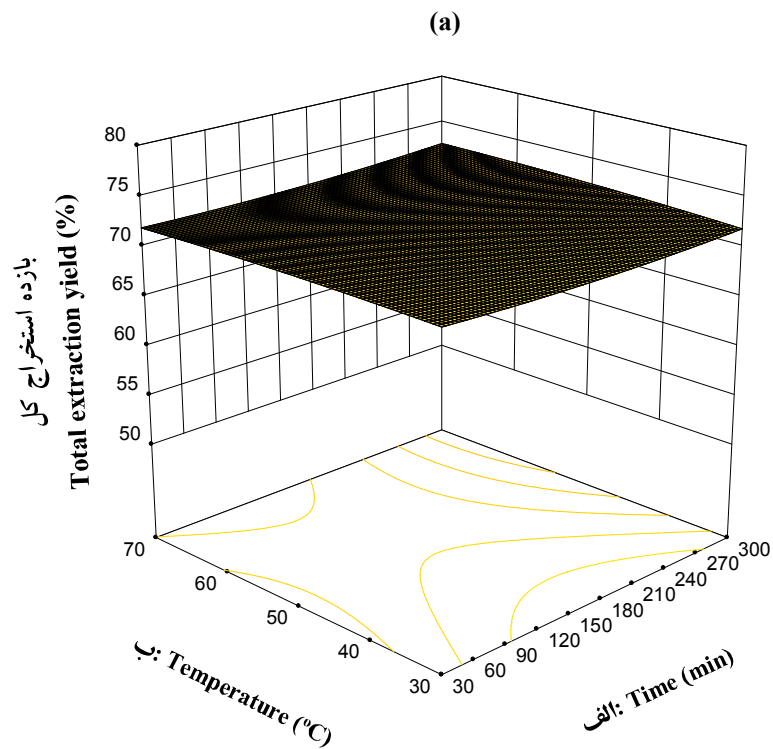
اثر متغیرهای فرایند بر بازده استخراج کل: استخراج، مرحله مهمی برای جداسازی ترکیب‌های شیمیایی از مواد گیاهی است و کارایی آن توسط عوامل گوناگون، مثل نوع ترکیب شیمیایی، روش استخراج، اندازه ذرات نمونه، نوع و قطبیت حلال، pH، زمان استخراج، دمای استخراج و ترکیب‌های تشکیل دهنده نمونه تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۳۰). بر اساس جدول ۲، همبستگی بالایی بین مواد جامد کل و مقدار ترکیب‌های فنولی یا فلاونوئیدی حاصل از میوه عناب مشاهده شد. درحالی‌که، مشابه ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی، همبستگی مطلوبی بین مقدار مواد جامد استخراج شده و ظرفیت ضد اکسایشی عصاره عناب مشاهده نشد.

نتایج آزمایشی و تجزیه و تحلیل آماری بازده استخراج کل برای عصاره‌های آرد میوه عناب طی فرایند استخراج در شرایط متفاوت در جدول ۳ ارائه شده است. با توجه به اعداد P و ضرایب رگرسیون مشخص شده برای اثرات خطی و متقابل، به ترتیب، اثر خطی نسبت مایع به جامد ($P < 0/01$)، اثر متقابل زمان و دما ($P < 0/01$)، اثر خطی دما ($P < 0/01$) و اثر خطی زمان ($P < 0/05$) مهمترین متغیرهای موثر بر روی بازدهی استخراج کل شدند. بنابراین، افزایش معنی‌دار سریع یا تدریجی این شاخص، به ترتیب با افزایش نسبت مایع به جامد یا افزایش دما و زمان

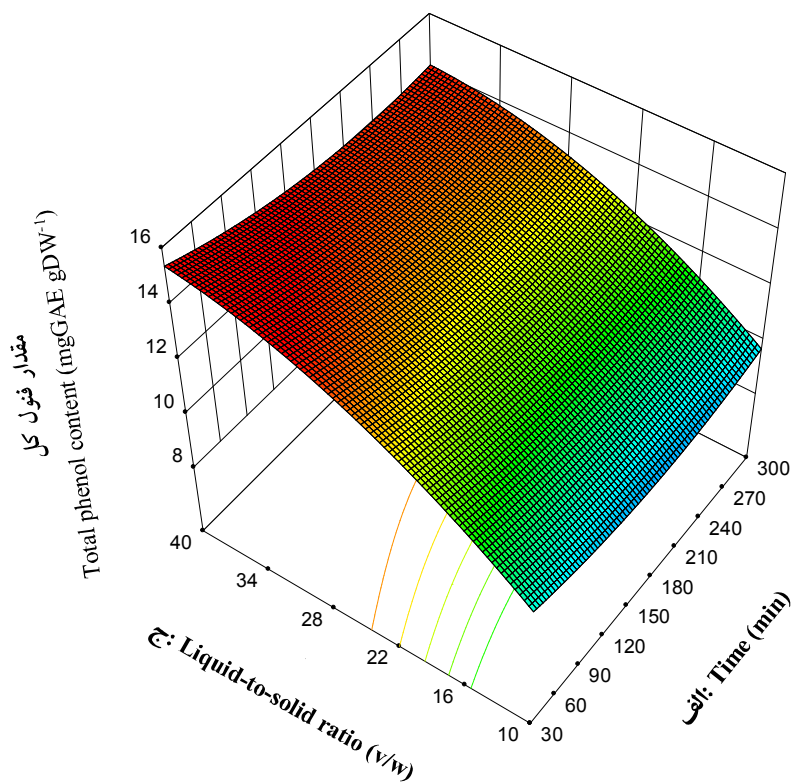
حاصل از گیاهان مختلف، شامل قاصدک^۴، بابونه^۵، گل گل همیشه بهار^۶ و نعناع^۷ گزارش شده بود (۳۳).
 اثرات متغیرهای فرایند بر روی بازدهی ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی: اثر متغیرهای مستقل بر روی مقدار ترکیب‌های فنول و فلاونوئیدی بر اساس نتایج ANOVA ارزیابی گردید که جزئیات آن در جدول ۳ قابل مشاهده است. بر طبق ضرایب رگرسیون آزمون ANOVA برای اثرات خطی متغیرهای مستقل، به ترتیب نسبت مایع به جامد (۲/۴۷)، زمان استخراج (۰/۳۵-) و دمای استخراج (۰/۱۸-) بیشترین تاثیر معنی‌دار (P < ۰/۰۱) را بر روی مقدار ترکیب‌های فنولی استخراج شده از آرد میوه عناب نشان دادند؛ و این ترتیب برای مقدار فلاونوئید کل عبارت بود از نسبت مایع به جامد و دمای استخراج (P < ۰/۰۱) بر اساس تاثیر خطی دما و زمان استخراج بر روی مقدار استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی، مقدار فنول کل نسبت به فلاونوئیدها وابستگی بیشتری به زمان استخراج نشان داد، به طوریکه مقدار فنول کل بر خلاف ترکیب دیگر، کاهش معنی‌دار (P < ۰/۰۱) طی زمان استخراج نشان داد. علاوه بر این، مقدار فنول کل با افزایش دما تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد، به طور معنی‌دار (P < ۰/۰۱) افزایش یافت که با افت قابل ملاحظه در دماهای بالاتر همراه شد، درحالی‌که مقدار فلاونوئید کل با افزایش دما تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد به طور مداوم افزایش نشان داد. این یافته می‌تواند نشان دهنده پایداری بیشتر ترکیب‌های فلاونوئیدی نسبت به فنول کل در مقابل دمای بالا و زمان طولانی فرایند در نظر گرفته شود. کارایی استخراج ترکیب‌های فنولی از گیاهان تا حد زیادی تحت تاثیر زمان فرایند قرار می‌گیرد. با این حال، مشخص شده است که ترکیب‌های فنولی استخراج شده طی زمان‌های طولانی

استخراج دچار تجزیه می‌گردند (۳۴). نتایج مشابه در رابطه با تخریب ترکیب‌های فنولی طی زمان‌های طولانی استخراج، برای برخی گیاهان شامل گوشته و هسته میوه عناب (۱۴)، ریحان و رزماری (۳۴) مشاهده شده است. مقادیر پیش بینی شده برای مقدار فنول کل عصاره عناب در رسم منحنی‌های سطحی پاسخ شکل ۱ (b-c) استفاده شدند. مقدار فنول کل عصاره با توجه به شکل ۱ و ضرایب رگرسیون ارائه شده در جدول ۳ برای اثرات متقابل، با افزایش همزمان زمان و دما یا زمان و نسبت مایع به جامد دچار کاهش معنی‌دار (P < ۰/۰۱) شد. نتایج مشابهی توسط هان و همکاران (۲۰۱۵) طی استخراج عصاره از گوشته و هسته میوه عناب مشاهده شد (۱۴). به طور کلی، با افزایش زمان استخراج، مقادیر بیشتر ترکیب‌های فنولی از بافت گیاه استخراج می‌شوند، درحالی‌که استفاده از زمان طولانی همراه با دمای بالا منجر به تجزیه این ترکیب‌ها می‌شود. بنابراین، می‌توان از بهینه سازی زمان استخراج برای رفع این مشکل بهره برد (۲۸). دمای استخراج بالا از طریق افزایش حلالیت و سرعت انتشار ترکیب‌های فنولی، و کاهش ویسکوزیته و کشش سطحی حلال می‌تواند به جدا شدن بیشتر ترکیب‌های فنولی که در اتصال محکم با بافت گیاه هستند، کمک نماید (۱۴، ۳۱، ۳۴). با این حال، افزایش دمای بیشتر می‌تواند پایداری ترکیب‌های فنولی را از طریق تجزیه شیمیایی تحت تاثیر قرار داده و مقدار آن را کاهش دهد، به طوریکه برخی پژوهشگران بالاترین استحصال ترکیب‌های فنولی را در محدوده دمای ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد، به ترتیب برای میوه‌های *Euterpe oleracea* و عناب ثبت نموده و افت این ترکیب‌ها را در دماهای بالاتر مشاهده نمودند (۱۴، ۳۵).

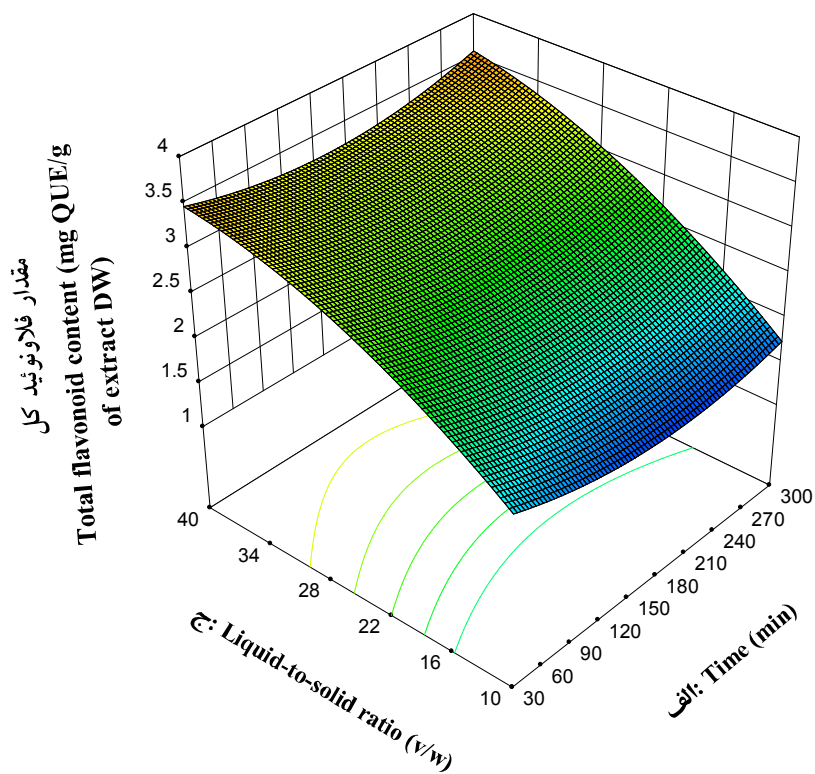
4. Dandelion
5. Chamomile
6. Marigold
7. Yarrow

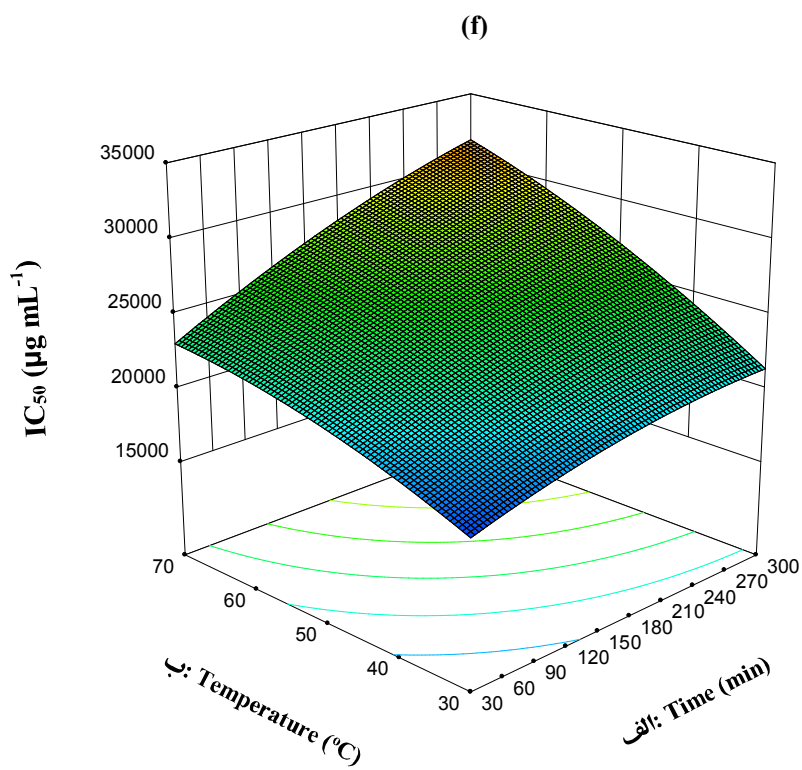
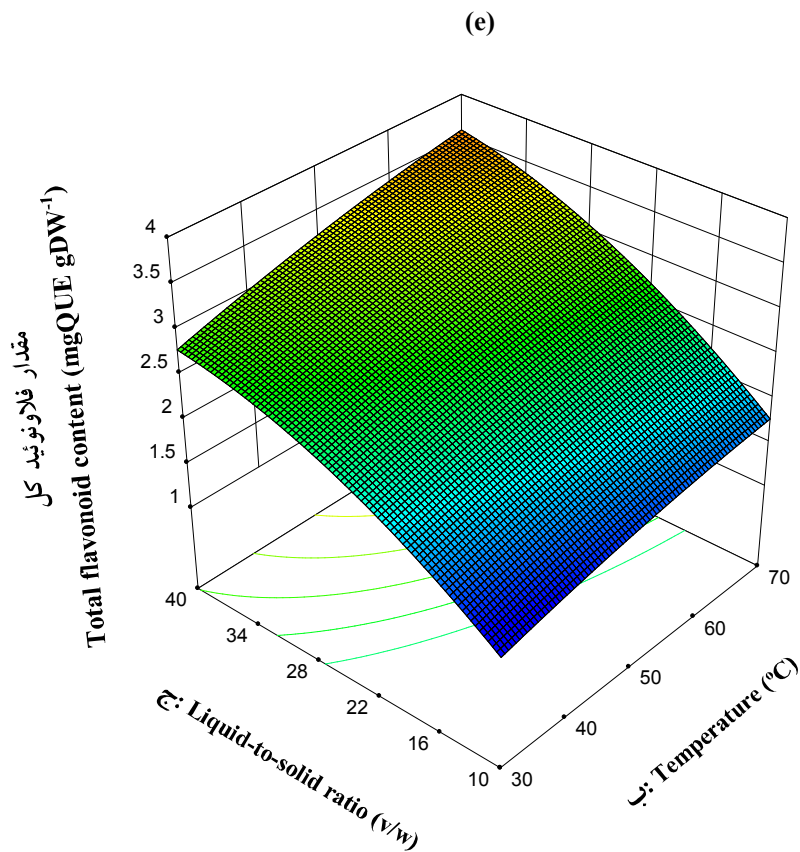


(c)



(d)





شکل ۱- نمودار های سطح پاسخ نشان دهنده اثرات متقابل متغیرهای فرایند استخراج گرمایی، شامل زمان (الف)، دما (ب) و نسبت مایع به جامد (ج) بر روی بازده استخراج کل (a)، مقدار فنول کل (b-c)، مقدار فلاونوئید کل (d-e) و IC_{50} (f) عصاره های عناب. برای هر نمودار، متغیر مستقل سوم در نقطه مرکزی ثابت نگهداشته شده است.

Figure 1. Response surface plots showing combined effects of HAE parameters, namely time (A), temperature (B) and liquid-to-solid ratio (C) on total extraction yield (a), total polyphenols content (b-c), total flavonoid content (d-e) and IC_{50} (f). For each surface plot, the other variable was kept constant at the central level.

منجر به تشدید فشار اسمزی و سطح تماس می‌گردد، بنابراین حجم بیشتری از حلال به داخل بافت گیاه وارد شده و نفوذ ترکیب‌های زیست فعال از طریق دیواره سلولی به داخل حلال تشدید می‌گردد (۳۸). نتایج آماری جدول ۳ در تایید ضرایب همبستگی بین مقدار فنول کل ($R^2=0/11$) یا فلاونوئید کل ($R^2=0/003$) و ظرفیت ضد اکسایشی (جدول ۲)، نشان می‌دهد که مقدار فنول کل نسبت به مقدار فلاونوئید کل، اثر بیشتری بر روی ظرفیت ضد اکسایشی عصاره داشته است، به طوری که با افزایش زمان و دما، به ترتیب عدم تغییر و افزایش معنی‌دار برای مقدار فلاونوئید کل ثبت شد، درحالی که در تطابق با نتایج آماری مربوط به مقدار فنول کل، ظرفیت ضد اکسایشی عصاره با افزایش زمان و دمای فرایند به طور خطی کاهش یافت.

اعتبار مدل‌های پیش‌بینی کننده: به منظور اعتبار سنجی مدل‌ها، مقادیر پیش‌بینی شده و به دست آمده پاسخ‌ها در شرایط بهینه استخراج تعیین شدند که نتایج آن در جدول ۴ قابل مشاهده هستند. نتایج حاصل از آزمایش‌های واقعی نزدیک به مقادیر پیش‌بینی گردیدند که تاییدی بر کفایت مدل حاصل از روش سطح پاسخ برای توضیح فضای آزمایش می‌باشد. بنابراین، مدل‌های بهینه و توسعه یافته به شکل صحیحی مسیر استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی را توصیف نموده و می‌توانند برای پیش‌بینی شرایط بهینه مورد نیاز جهت رسیدن به حداکثر کارایی استخراج ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی از میوه عناب استفاده شوند.

اثر متغیرهای فرایند بر روی شاخص IC_{50} عصاره عناب: برای تعیین ظرفیت ضد اکسایشی عصاره عناب در مطالعه حاضر، فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره مورد بررسی قرار گرفت. رادیکال آزاد DPPH نسبت به ABTS پایدارتر بوده و به عنوان معمولترین و گسترده‌ترین روش جهت تعیین ظرفیت ضد اکسایشی گیاهان استفاده می‌شود (۱۴، ۳۶). رابطه‌ای معکوس بین شاخص IC_{50} و ظرفیت ضد اکسایشی یک ترکیب وجود دارد، به طوری که مقدار پایتتر IC_{50} برای یک ترکیب نشان دهنده‌ی ظرفیت ضد اکسایشی بالاتر آن می‌باشد (۳۷). نتایج آماری ANOVA برای شاخص IC_{50} عصاره آبی میوه عناب در جدول ۳ ارائه شده است. بر طبق جدول ۳، ظرفیت ضد اکسایشی عصاره عناب وابستگی معنی‌داری ($P < 0/01$) به متغیرهای مستقل خطی (A، B و C) و تغییر همزمان زمان و دما (AB) نشان داد، درحالی که سایر اثرات متقابل یا کوآدراتیک تاثیر معنی‌داری ($P > 0/1$) بر روی این پاسخ نداشتند. با توجه به ضرایب رگرسیون ارائه شده در جدول ۳ برای شاخص IC_{50} ، می‌توان فهمید که کاهش دما یا زمان استخراج، افزایش نسبت مایع به جامد و کاهش همزمان دما و زمان استخراج، به ترتیب مهمترین عوامل کاهش شاخص IC_{50} و در نتیجه افزایش ظرفیت ضد اکسایشی عصاره حاصل بوده‌اند. تاثیر منفی زمان طولانی و دمای بالا بر روی ظرفیت ضد اکسایشی عصاره می‌تواند ناشی از افت ترکیب‌های مهار کننده رادیکال آزاد تحت تاثیر این عوامل باشد (۲۹، ۳۴). توضیح اینکه افزایش نسبت مایع به جامد

جدول ۴- اعتبار سنجی نتایج برای مدل‌های کوآدراتیک حاصل از طرح مرکب مرکزی، علاوه بر مقایسه نتایج استخراج آبی با استخراج آبی-الکلی آرد میوه عناب در شرایط بهینه تعیین شده.

Table 4. Validation of results for quadratic models obtained from CCD in optimization experiments, as well as representing the experimental results for the other probable extractions procedures.

مقادیر پاسخ واقعی برای استخراج هیدروالکلی ۶۰٪ Hydroethanolic	مقادیر پاسخ (Response values)		شرایط بهینه (Optimum conditions)			متغیرهای پاسخ (Response variables)
	واقعی (Actual)	پیش بینی شده (Estimated)	مایع به جامد (Liquid-to-Solid)	دما (Temp., °C)	زمان (دقیقه) (Time, min)	
استخراج گرمایی مرسوم Heat-assisted extraction (HAE)						
79.44±0.15 ^a	77.67±0.17 ^b	77.28				TEY ^b
15.56±0.53 ^a	13.93±0.51 ^b	14.38	39.99:1	66.88	30	TPC ^c
12.07±0.11 ^a	4.56±0.02 ^b	3.76				TFC ^d
14831.33±612 ^b	21577.64±534 ^a	21360.91				IC ₅₀ ^e

^a استخراج گرمایی با اتانول آبی (۶۰ درصد) در شرایط بهینه شده استخراج گرمایی آبی جهت مقایسه آب با مخلوط آب و اتانول. ^b بازده استخراج کل بر حسب گرم عصاره خشک بازای ۱۰۰ گرم وزن خشک آرد میوه عناب. ^c مقدار فنول کل بر حسب معادل میلی گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک عصاره. ^d مقدار فلاونوئید کل بر حسب معادل میلی گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک عصاره. ^e غلظت عصاره مورد نیاز برای رسیدن به ۵۰ درصد بازداری رادیکال آزاد DPPH بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر.

^a Hydroethanolic HAE in optimal conditions obtained from HAE for comparative purposes. ^b Total extraction yield is grams of dry extracts per 100 g of dry weight of jujube flour. ^c Total phenol content by mg gallic acid equivalent /g of extract dry weight. ^d Total flavonoid content by mg quercetin equivalent /g of extract dry weight. ^e The extract concentration required to 50% inhibition of DPPH*, µg/mL.

فهمید که استفاده از مخلوط آب و اتانول نتایج بهتری نسبت به کاربرد هر یک از آن‌ها به تنهایی داشته است. مشخص شده است که کاربرد حلال چند جزئی حاوی آب و اتانول منجر به تسهیل استخراج ترکیب‌های زیست فعال از گیاه می‌شود. در واقع، آب مواد گیاهی را متورم نموده و امکان نفوذ بیشتر اتانول به داخل بافت گیاه را فراهم می‌کند و در ادامه، اتانول به جداسازی اتصال بین ترکیب زیست فعال و زمینه بافت گیاهی کمک می‌نماید (۲۸، ۷). این اثر سینرژیستی نشان می‌دهد چرا تمامی شاخص‌های مورد ارزیابی برای عصاره هیدروالکلی نسبت به عصاره بهینه شده آبی مطلوب‌تر شدند (جدول ۴). علاوه بر این، کاربرد مخلوط آب و اتانول می‌تواند استخراج مواد جامد محلول در هر یک از آن‌ها را تسهیل نماید زیرا قطبیت ترکیب‌های زیست فعال متفاوت می‌باشد. در مطالعات گذشته، نتایج مشابه برای برخی گیاهان دارویی مشاهده شده بود (۳۹).

مقایسه بین عصاره آبی، عصاره آبی الکلی و BHT:

به‌منظور تعیین اثر نوع حلال بر کارایی استخراج ترکیب‌های زیست فعال مورد بررسی، از یک حلال دو جزئی (آب و اتانول) برای استخراج عصاره عناب در همان شرایط بهینه عصاره آبی استفاده شد (جدول ۴). با مقایسه بین عصاره آبی بهینه شده و عصاره هیدروالکلی (غلظت اتانول ۶۰ درصد) مشخص می‌شود که ترکیب‌های فنولی نسبت به فلاونوئیدها و ظرفیت ضد اکسایشی حساسیت کمتری نسبت به کاهش قطبیت حلال داشته‌اند، به‌طوری‌که با افزودن اتانول به محیط استخراج (۶۰ درصد)، مقدار فلاونوئید استخراج شده و ظرفیت ضد اکسایشی، به ترتیب ۲/۶۵ و ۱/۴۵ برابر افزایش نشان دادند؛ درحالی‌که، تنها یک افزایش ۱/۱۲ برابری برای مقدار ترکیب‌های فنولی مشاهده شد. به طور کلی، با توجه به مقایسه دو حلال مصرفی و نتایج آزمایش‌های مقدماتی (غلظت‌های اتانول ۳۰ تا ۸۰ درصد)، می‌توان

مرتبه دوم به شکل مطلوبی برای توصیف رابطه بین متغیرهای پاسخ و سه متغیر مستقل فرایند استخراج استفاده شد. شرایط بهینه، شامل زمان ۳۰ دقیقه، دمای ۶۶/۸۸ درجه سانتی‌گراد و نسبت مایع به جامد ۱:۴۰ برای رسیدن به حداکثر کارایی استخراج تعیین شد. با افزودن اتانول به محیط استخراج (۶۰ درصد)، مقدار ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی استخراج شده، و ظرفیت ضد اکسایشی، به ترتیب ۱/۱۲، ۲/۶۵ و ۱/۴۵ برابر افزایش نشان دادند. فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد عصاره هیدورالکلی در غلظت ده هزار ppm (۳۳/۰۸ درصد) نزدیک به فعالیت مهارکنندگی BHT در غلظت پانصد ppm (۳۵/۵۷ درصد) گردید. بنابراین، آرد میوه عناب دارای مقادیر مناسب ترکیب‌های زیست فعال بود؛ اما، با توجه به ظرفیت ضد اکسایشی پایین آن و گزارش‌های متفاوت در مورد ظرفیت ضد اکسایشی عناب تولیدی نقاط متفاوت جهان که تحت تاثیر دوره رسیدگی و زمان نگهداری پس از برداشت آن عنوان شده است، پیشنهاد جایگزینی آن با ضد اکسایش‌های سنتزی تحت تاثیر قرار می‌گیرد. اما، می‌توان از آرد میوه عناب یا عصاره حاصل از آن به عنوان ترکیب فراسودمند در محصولات غذایی استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حامیان مالی این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را داریم. این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی مصوب و با حمایت مالی مشترک جهاد دانشگاهی خراسان رضوی و دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت.

منابع

1. Elaloui, M., Laamouri, A., Ennajah, A., Cerny, M., Mathieu, C., Vilarem, G., Chaar, H., and Hasnaoui, B. 2016. Phytoconstituents of leaf extracts of

علاوه بر این، مقایسه‌ای بین قوی‌ترین عصاره عناب و ترکیب ضد اکسایش سنتزی BHT به عنوان یک مهار کننده رادیکال آزاد شناخته شده انجام گردید. بر طبق نتایج، مقدار IC_{50} برای ترکیب ضد اکسایش سنتزی برابر ۷۱۴/۷۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با ۱۴۸۳۱/۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای بهترین عصاره عناب (عصاره هیدروالکلی در شرایط بهینه، جدول ۴) تعیین شد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد عصاره هیدورالکلی در غلظت ده هزار ppm (۳۳/۰۸ درصد) نزدیک به فعالیت مهارکنندگی BHT در غلظت پانصد ppm (۳۵/۵۷ درصد) گردید. از طرف دیگر، هان و همکاران (۲۰۱۵) مقادیر ۵۰۵/۷ و ۴۵۷/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر را به ترتیب، برای IC_{50} عصاره هیدورالکلی حاصل از گوشته و هسته میوه عناب تازه برداشت شده گزارش نمودند (۱۴). اختلاف این مقادیر با کار حاضر می‌تواند ناشی از زمان و شرایط نگهداری پس از برداشت و سایر عوامل ذکر شده بالا (بخش اول نتایج) باشد.

نتیجه‌گیری کلی

بازده استخراج کل، مقدار فنول کل، مقدار فلاونوئید کل و IC_{50} برای عصاره‌های حاصل از فرایند استخراج گرمایی به ترتیب، بین ۵۰/۴۸ تا ۷۷/۹۷ درصد (گرم ماده خشک عصاره بازای ۱۰۰ گرم وزن خشک میوه عناب)، ۸/۲۳ تا ۱۴/۳۸ معادل میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک عصاره، ۱/۴۲ تا ۳/۹۳ معادل میلی‌گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک عصاره و ۱۶۹۱۱/۶ تا ۳۴۰۲۱/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره عناب تغییر نمودند. مدل چند وجهی

- Ziziphus jujuba* Mill. plants harvested in Tunisia. Industrial Crops and Products, 83, 133-139.
2. Li, J.-W., Ding, S.-D., and Ding, X.-L. 2007. Optimization of the ultrasonically

- assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. *jinsixiaozao*. Journal of Food Engineering, 80(1): 176-183.
3. Wang, C., Cheng, D., Cao, J. and Jiang, W. 2013. Antioxidant capacity and chemical constituents of Chinese jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) at different ripening stages. Food Science and Biotechnology, 22(3): 639-644.
 4. Liao, L., Won, T.H., Kang, S.S., and Shin, J. 2012. Simultaneous analysis of bioactive metabolites from *Zizyphus jujuba* by HPLC–DAD–ELSD–MS/MS. Journal of Pharmaceutical Investigation, 42(1): 21-31.
 5. Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., and Ju, Y.-H. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. Journal of Food and Drug Analysis, 22(3):296-302.
 6. Hosseini, H., Bolourian, S., Yaghoubi Hamgini, E., and Ghanuni Mahababadi, E. 2018. Optimization of heat- and ultrasound-assisted extraction of polyphenols from dried rosemary leaves using response surface methodology. Journal of Food Processing and Preservation, e13778 (<https://doi.org/10.1111/jfpp.13778>).
 7. Cujic, N., Savikin, K., Jankovic, T., Pljevljakusic, D., Zdunic, G., and Ibric, S. 2016. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. Food Chemistry, 194: 135–142.
 8. Zuorro, A. 2015. Optimization of polyphenol recovery from espresso coffee residues using factorial design and response surface methodology. Separation and Purification Technology, 152, 64-69.
 9. Bochi, V.C., Barcia, M.T., Rodrigues, D., Speroni, C.S., Giusti, M.M., and Godoy, H.T. 2014. Polyphenol extraction optimisation from Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. Food Chemistry, 164: 347-354.
 10. Castro-Lopez, C., Ventura-Sobrevilla, J.M., Gonzalez-Hernandez, M.D., Rojas, R., Ascacio-Valdes, J.A., Aguilar, C.N., and Martinez-Avila, G.C.G. 2017. Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. Food Chemistry, 237: 1139-1148.
 11. Safdar, M.N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., and Saddozai, A.A. 2017. Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. Journal of Food and Drug Analysis, 25(3): 488-500.
 12. Fang, X., Wang, J., Wang, Y., Li, X., Zhou, H., and Zhu, L. 2014. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of wedelolactone and antioxidant polyphenols from *Eclipta prostrata* L. using response surface methodology. Separation and Purification Technology, 138: 55-64.
 13. Ekici, L. 2014. Effects of concentration methods on bioactivity and color properties of poppy (*Papaver rhoeas* L.) sorbet, a traditional Turkish beverage. LWT - Food Science and Technology, 56(1): 40-48.
 14. Han, H. J., Lee, J.-S., Park, S.-A., Ahn, J.-B., and Lee, H.G. 2015. Extraction optimization and Nano encapsulation of jujube pulp and seed for enhancing antioxidant activity. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 130: 93-100.
 15. Choi, J., An, X., Lee, B.H., Lee, J. S., Heo, H.J., Kim, T., Ahn, J.-W., and Kim, D.-O. 2015. Protective effects of bioactive phenolics from jujube (*Zizyphus jujuba*) seeds against H₂O₂-induced oxidative stress in neuronal PC-12 cells. Food Science and Biotechnology, 24(6): 2219-2227.
 16. Pineros-Hernandez, D., Medina-Jaramillo, C., Lopez-Cordoba, A., and Goyanes, S. 2017. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. Food Hydrocolloids, 63: 488-495.
 17. Singleton, V.L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in

- Enzymology, 299 (pp. 152-178): Academic Press.
18. Zhishen, J., Mengcheng, T., and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4): 555-559.
 19. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
 20. Braga, G.C., Melo, P.S., Bergamaschi, K.B., Tiveron, A.P., Massarioli, A.P., and Alencar, S.M.D. 2016. Extraction yield, antioxidant activity and phenolics from grape, mango and peanut agro-industrial by-products. *Ciencia Rural Journal*, 46: 1498-1504.
 21. Mirakilova, D.B., Rakhimov, D.A., and Azizov, U.M. 2016. Chemical compositions of fruit and dry aqueous extract of *Ziziphus jujuba*. *Chemistry of Natural Compounds*, 52(3): 472-474.
 22. Li, J.-W., Fan, L.-P., Ding, S.-D., and Ding, X.-L. 2007. Nutritional composition of five cultivars of chinese jujube. *Food Chemistry*, 103(2): 454-460.
 23. Zhang, H., Jiang, L., Ye, S., Ye, Y., and Ren, F. 2010. Systematic evaluation of antioxidant capacities of the ethanolic extract of different tissues of jujube (*Ziziphus jujuba Mill.*) from China. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6): 1461-1465.
 24. Shams Najafabadi, N., Sahari, M.A., Barzegar, M., and Hamidi Esfahani, Z. 2017. Effects of concentration method and storage time on some bioactive compounds and color of jujube (*Ziziphus jujuba var vulgaris*) concentrate. *Journal of Food Science and Technology*, 54(9): 2947-2955.
 25. Ismail, A., Marjan, Z.M., and Foong, C.W. 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*, 87(4): 581-586.
 26. Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., and Heinonen, M. 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10): 3954-3962.
 27. Li, J.-w., Ding, S.-d., and Ding, X.-l. 2005. Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube. *Process Biochemistry*, 40(11): 3607-3613.
 28. Ghitescu, R.-E., Volf, I., Carausu, C., Buhlmann, A.-M., Gilca, I.A., and Popa, V.I. 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22: 535-541.
 29. Zhou, Z., Shao, H., Han, X., Wang, K., Gong, C., and Yang, X. 2017. The extraction efficiency enhancement of polyphenols from *Ulmus pumila L.* barks by trienzyme-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*, 97: 401-408.
 30. Stalikas, C.D. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18): 3268-3295.
 31. Wettasinghe, M., and Shahidi, F. 1999. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis L.*) seeds. *Food chemistry*, 67, 399-414.
 32. Castro-Lopez, C., Ventura-Sobrevilla, J.M., Gonzalez-Hernandez, M.D., Rojas, R., Ascacio-Valdes, J.A., Aguilar, C.N., and Martinez-Avila, G.C.G. 2017. Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. *Food Chemistry*, 237: 1139-1148.
 33. Jurinjak Tusek, A., Benkovic, M., Belscak Cvitanovic, A., Valinger, D., Jurina, T., and Gajdos Kljusuric, J. 2016. Kinetics and thermodynamics of the solid-liquid extraction process of total polyphenols, antioxidants and extraction yield from *Asteraceae* plants. *Industrial Crops and Products*, 91: 205-214.
 34. Juntachote, T., Berghofer, E., Bauer, F., and Siebenhandl, S. 2006. The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(2): 121-133.

35. Pompeu, D.R., Silva, E.M., and Rogez, H. 2009. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. *Bioresource Technology*, 100(23): 6076-6082.
36. Perez-Jimenez, J., Serrano, J., Taberero, M., Arranz, S., Diaz- Rubio, M.E., Garcia-Diz, L., Goni, I., and Saura-Calixto, F. 2009. Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64, 102-7.
37. Liu, F.F., Ang, C.Y., and Springer, D. 2000. Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8): 3364-3371.
38. Liyana-Pathirana, C., and Shahidi, F. 2005. Optimisation of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93(1), 47-56.
39. Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., and Ju, Y.-H. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3): 296-302.



Optimization of heat-assisted extraction of aqueous extracts from jujube flour and its comparison with hydroethanolic extract

S. Bolourian¹, F. Shahidi², H. Hosseini^{3*}, F. Hosseini¹, H. Saberian¹, M. Maleki⁴

¹ Assistant Professor, Food Additives Department, Food Science and Technology Research Institute, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran

² Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad Iran.

³ Member of Food Additives Department, Food Additives Department, Food Science and Technology Research Institute, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran

⁴ PhD Student, Department of Food Hygiene and Aquaculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 2019/02/21; Accepted: 2019/04/29

Abstract

Background and objectives: Many of the biological functions of jujube fruit could be due to its antioxidant compounds. However, antioxidants and antioxidant capacity of fruits could be affected by several factors, such as cultivar, agronomic condition, postharvest manipulation, and maturation of fruit. The aim of the present study was to optimize the conditions used in extraction of aqueous extract from jujube cultivated in Iran, as well as comparing amounts of jujube bioactive compounds with both hydroethanolic extract and literature.

Materials and methods: Response surface methodology was used to determine optimal amounts of independent variables, namely liquid-to-solid (L/S) ratio (v/w), extraction period, and temperature. Therefore, The samples were extracted using water, in well-sealed flasks with different L/S ratios ranging from 10:1–40:1 for specific extraction periods ranging from 30–300 min, where the temperature of the extraction medium ranged between 30 and 70 °C (within ± 1 °C) under constant stirring, (250 rpm). Finally, the responses, including total extraction yield, total phenol content (TPC), total flavonoid content (TFC) and IC₅₀, determined in optimal extract was compared with those determined in hydroethanolic extract or BHT synthetic antioxidant.

Results: The TEY, TPC, TFC and IC₅₀ in the extracts from HAE process were ranged from 50.48 to 77.97%, 8.23 to 14.38 mg GAE/g of extract dry weight, 1.42 to 3.93 mg Quercetin equivalent/g of extract DW), and 16911.6 to 34021.3 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The optimum HAE conditions included an extraction time of 30 min, temperature of 66.88 °C, and 40:1 liquid-to-solid ratio, resulting in the maximum TEY (77.67%), TPC (13.93 mg/g), TFC (4.56 mg/g) and minimum IC₅₀ (21577 $\mu\text{g/mL}$). When aqueous ethanol (60%) was used as solvent during extraction process, 1.22-, 2.65- and 1.45-fold increase were observed in the amounts of TPC, TFC and antioxidant capacity, respectively. the radical-scavenging activity (free radical inhibition percentage) of the optimum jujube extract at concentration of 10000 ppm (33.08%) was found to be approximately equivalent to that measured for 500 ppm concentration of BHT (35.57%).

*Corresponding author; hosseini_hamed63@yahoo.com

Conclusion: High levels of bioactive compounds were detected in the aqueous and hydroethanolic extract from jujube. These extracts are not suggested to be used as alternative for synthetic antioxidants due to their low levels of antioxidant capacity, as well as contradictory reports for jujube antioxidant capacity which is changed depending on fruit ripening and postharvest condition. However, the jujube fruit flour or extracts could be used as functional additive in enrichment of food products.

Keywords: Jujube fruits; Optimization of aqueous extract; Response surface methodology; Hydroethanolic extract; Synthetic antioxidant.

