

بهینه‌سازی پارامترهای موثر در استخراج اسانس از بذر (*Heracleum persicum* Desf. Ex Fischer) با استفاده از روش سطح پاسخ

مریم رضاپور^۱، محمد فتاحی^{۲*}

^۱دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
^۲دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۰۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۲۴

چکیده

امروزه استفاده از اسانس‌های گیاهی در صنایع غذا و دارو در حال افزایش است. لذا مطالعه حاضر، با هدف بهینه‌سازی فاکتورهای موثر در به حداکثر رساندن عملکرد اسانس و تعیین ترکیبات اسانس در شرایط بهینه صورت گرفت. اثر پارامترهای: مقادیر مختلف گیاه (X_1)، زمان اسانس‌گیری (X_2) و اندازه ذرات بذرها با مش (X_3)، در سه سطح (۱، ۰، -۱) به‌عنوان متغیر مستقل، برای بهینه‌سازی درصد اسانس به عنوان متغیر وابسته با استفاده از روش سطح پاسخ بررسی شد. پس از جمع‌آوری بذرهای گیاه گلپر از منطقه آینالو (آذربایجان شرقی) در مرداد ماه ۱۳۹۴، اسانس به روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر استخراج شد و شناسایی ترکیبات اسانس با استفاده از دستگاه GC-MS صورت گرفت. نتایج تجزیه ANOVA و اشتباه آزمایشی برای مدل RSM نشان داد که مدل پیش‌بینی شده برای درصد اسانس به‌طور معنی‌داری دقیق است ($P < 0.01$). بیشترین درصد اسانس (۵/۳۳) در محدوده ۳۰ گرم ماده گیاهی، به مدت ۲ ساعت اسانس‌گیری و یک دقیقه آسیاب بذرها به‌دست آمد. در آنالیز با کروماتوگرافی گازی ۲۸ ترکیب در اسانس بذر گلپر شناسایی شد که ترکیبات عمده آن شامل هگزیل بوتیرات (۴۳/۲۷ درصد) و ان-اکتیل استات (۱۵/۷۸ درصد) بودند. با توجه به اینکه در بخش صنعت استخراج اسانس فرایندی زمان‌بر و مستلزم صرف انرژی و در نتیجه هزینه زیادی می‌باشد، لذا نتایج حاصل از این پژوهش پس از تایید در مقیاس صنعتی، می‌تواند در صنایع مربوطه مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: استخراج اسانس روغن، بهینه‌سازی (*Heracleum persicum* Desf. Ex Fischer)، روش سطح پاسخ

*نویسنده مسئول: mohamadfattahi@yahoo.com

مقدمه

می‌شود (Hemati et al., 2010; Hajhashemi et al., 2009). از ساقه‌های جوان گیاه نیز برای تهیه ترشی استفاده می‌شود (Mojab et al., 2002). در مطالعه داوری و عزیززی (Davari and Ezazi, 2017) ۱۵ ترکیب در اسانس گلپر شناسایی شد که هگزیل استر، اکتیل استر، پولگون و ان اکتیل استات ترکیبات عمده اسانس را تشکیل می‌داد. در پژوهش دیگری اسانس بذر گلپر که به روش تقطیر با آب استخراج شد، شامل ۳۲ ترکیب بود که هگزیل بوتیرات، اکتیل استات و هگزیل هگزانات به عنوان ترکیبات عمده اسانس گزارش شدند (Ebadollahi et al., 2014). از جمله روش‌های استخراج اسانس گیاهان روش تقطیر با آب می‌باشد که می‌تواند تحت تأثیر پارامترهای مختلفی از جمله نسبت گیاه به آب، مدت اسانس‌گیری، اندازه ذرات و اثر متقابل آنها قرار گیرد (Ebrahimnicketai and Golestan, 2015). بنابراین برای پیدا کردن شرایط بهینه، زمانی که بین متغیرها برهمکنش وجود دارد، روش معمولی بسیار زمان‌بر و دشوار خواهد بود. روش کلاسیک ممکن است منجر به عدم اطمینان در نتایج، نتایج نادرست و نیاز به صرف زمان و کار زیاد شود. علاوه بر این تعیین شرایط بهینه را تضمین نمی‌کند و اثر متقابل بین دو یا چند عامل را نمی‌تواند مشخص کند. یکی از روش‌های جایگزین یک رویکرد آماری مثل روش سطح پاسخ است که شامل حداقل تعداد آزمایش‌ها برای تعداد زیادی از عوامل تعیین‌کننده و هم‌زمان چند متغیر است که معادلات را تحلیل می‌کند (Walia et al., 2015). روش سطح پاسخ (RSM) مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضیات کاربردی برای ساخت مدل‌های تجربی است. RSM ابزاری قدرتمند برای کارهای بهینه‌سازی است که اولین بار در سال ۱۹۵۱ توسط باکس و ویلسون معرفی شده است که یک بسته آماری و تکنیک ریاضی برای توسعه، بهبود و بهینه‌کردن

اسانس‌ها ترکیبات پیچیده، طبیعی و فرار با بوی قوی هستند که توسط گیاهان سنتز می‌شوند و اولین بار به وسیله تقطیر با آب یا بخار در قرون وسطی بدست آمدند (Bakkali et al., 2008). اسانس‌ها یکی از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی، ادویه‌ای و به ویژه معطر محسوب می‌شوند که معمولاً به‌عنوان عامل عطر و طعم در محصولات غذایی، نوشیدنی‌ها، عطرها، داروها و لوازم آرایشی استفاده می‌شوند. آنالیز ترکیبات فیتوشیمیایی اسانس‌ها منجر به شناسایی اجزای آنها شده، هم‌چنین کاربرد روز افزون این ترکیبات به خصوص در صنایع آرایشی، بهداشتی و دارویی باعث افزایش تقاضا برای استفاده از آنها شده است (Raut and Karuppaiyl, 2014). در مطالعات فیتوشیمیایی گلپر با نام علمی *Heracleum persicum* Desf. Ex Fischer مانند فنل‌ها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، فورانوکومارین‌ها، آلکالوئیدها، تانن‌ها و استروئیدها گزارش شده است (Dehghan et al., 2017). فورانوکومارین‌های جداسازی شده گلپر دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده و اثر محافظتی بر پراکسیداسیون لیپید دارند (Hajhashjemi et al., 2014). هم‌چنین دانه این گیاه به دلیل داشتن فورانوکومارین دارای خاصیت ضد تشنجی است و برای درمان هیستریکاربرد دارد (Sayyah et al., 2005). خواص بیولوژیکی مختلفی از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدتومور، حشره‌کش، ضد میکروبی و ضدقارچی برای گلپر گزارش شده است (Walasek et al., 2015). علاوه بر این خواص ضدالتهاب، ضدسرطان، ضدانعقاد، ضددیابت و ضد درد برای گلپر بیان شده است (Dehghan et al., 2017). میوه گلپر در مصارف محلی به عنوان ادویه و افزودنی در انواع ترشی‌ها و در طب سنتینیز به عنوان ضدکرم، ضدنفخ، اشتها آور، مدر و مسکن استفاده

بذرهای رسیده گیاه از منطقه آینالو (آذربایجان شرقی) در مردادماه ۱۳۹۴ جمع‌آوری شد. این گیاه بومی ایران است و در مناطق مرطوب و نمناک کوهستانی در ارتفاعات بیش از ۱۵۰۰ متر رویش دارد. این منطقه داری آب و هوای نیمه خشک است که بارندگی عمده در پاییز و زمستان اتفاق می‌افتد و با یک دوره خشک در تابستان همراه است. برای بدست آوردن نمونه‌های یکدست همه‌ی بذرها از یک گیاه جمع‌آوری و با هم مخلوط شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در دمای اتاق و در سایه خشک شد.

آماده‌سازی بذرها برای اسانس‌گیری: برای استخراج اسانس بذرها، مقادیر مختلف گیاه (X_1)، زمان اسانس‌گیری (X_2) و اندازه ذرات بذر با مش (X_3) در سه سطح (۱، ۰، -۱) استفاده شد. برای این کار از مقادیر ۲۰، ۳۰ و ۴۰ گرم بذر (X_1) همراه با ۶۰۰ میلی‌لیتر آب به مدت ۱، ۲ و ۳ ساعت (X_2) به روش تقطیر با آب (دستگاه کلونجر)، استخراج اسانس انجام گرفت. به منظور یکنواخت بودن شرایط آزمایش، ۴۰ گرم بذر را برداشته و پس از صفر (بدون آسیاب)، یک و دو دقیقه آسیاب از مش‌های ۱۰، ۱۴ و ۱۸ عبور داده شد. پس از یک و دو دقیقه آسیاب به ترتیب ۱۴/۵، ۱۱، ۵ و ۹/۵ گرم و ۰، ۸ و ۲۴ گرم از مش‌های ۱۰، ۱۴، ۱۸ و همگی عبور کردند (جدول ۱). همچنین نحوه انجام آزمایش به طور کامل در شکل ۱ نمایش داده شده است.

فرایندهای مختلف می‌باشد، این روش می‌تواند به طور موثری تاثیر فاکتورهای چندگانه و اثر متقابل آنها بر یک یا چند سطح متقابل مختلف را ارزیابی کند و اغلب برای روش‌های بهینه‌سازی چند سطحی، شرایط مطلوب و تحلیل ارتباط آنها به کار برده می‌شود (Srivastava et al., 2017). مزیت استفاده از RSM به‌عنوان یک طرح آزمایشی اختصاصی، این است که با کاهش تعداد آزمایش‌ها، پارامترهای چندگانه و اثر متقابل آنها را ارزیابی می‌کند. در این روش برای به‌دست آوردن حداکثر بازده و حداکثر ضریب اطمینان صحت آزمون، تیمارهای کمتر و همچنین زمان کمتری مورد نیاز است. این روش به صورت گسترده‌ای در بهینه‌سازی استخراج پارامترهایی مثل پلی‌ساکاریدها (Kan et al., 2015)، آنتوسیانین‌ها (Yilmaz et al., 2016)، ترکیبات فنلی (Dey and Dora, 2014) و اسانس‌ها (Sodeifian et al., 2016; Larkeche et al., 2015) استفاده شده است. هدف از مطالعه حاضر بهینه‌سازی شرایط استخراج اسانس به روش تقطیر با آب از بذر گلپر با استفاده از روش RSM و تعیین اجزای اسانس آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

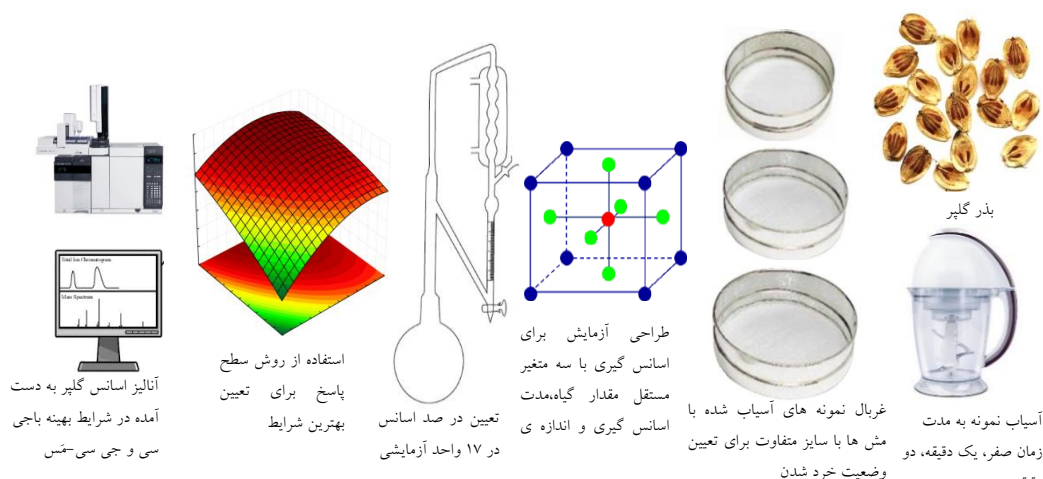
با استفاده از فلور قهرمان و مظفریان نمونه‌های گلپر شناسایی شدند و پس از تایید نام علمی توسط مرکز تحقیقات ارومیه (شماره هرباریوم ۹۶۹۴)،

جدول ۱: اندازه بذر در حالت بدون آسیاب، پس از یک و دو دقیقه آسیاب

توزیع محصول آسیاب شده بعد از عبور از سه مش استفاده شده (گرم)				اندازه ذرات	زمان آسیاب (دقیقه)
>۱۸	۱۸	۱۴	<۱۰		
۴۰	۰	۰	۰		۰
۹	۵/۵	۱۱	۱۴/۵		۱
۸	۰	۲۳	۸		۲

شناسایی ترکیبات با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل شاخص بازداری، مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه این طیف‌ها با ترکیبات استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه‌های کامپیوتری و مراجع معتبر (Adams, 1995 و NIST) صورت گرفت.

جداسازی و شناسایی ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس: شناسایی ترکیبات اسانس نمونه‌ها در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه انجام شد. برای آنالیز اسانس، از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) استفاده شد.



6

5

4

3

2

1

شکل ۱:

در ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. از گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی‌متر بر دقیقه و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترونولت استفاده گردید. RSM^2 : روش سطح پاسخ (RSM) مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضیات کاربردی برای ساخت مدل‌های تجربی است. RSM ابزاری قدرتمند برای کارهای بهینه‌سازی است که اولین بار در سال ۱۹۵۱ توسط باکس و ویلسون معرفی شده است که یک بسته آماری و تکنیک ریاضی برای توسعه، بهبود و بهینه‌کردن فرایندهای مختلف می‌باشد، این روش می‌تواند به طور موثری تاثیر فاکتورهای چندگانه و اثر

مشخصات دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی: برای آنالیز اسانس، از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) متصل به طیف سنج جرمی ThermoFinnigan Quest Trace Ms pulse مجهز به ستون HP-5ms به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و با ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. دمای آون از ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت و بعد از ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد به ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت و به مدت ۱۰ دقیقه

2. Response surface methodology

1. GC-MS

مستقل در سه سطح (۱، ۰، -۱) کدگذاری شدند و با طرح ۱۷ run آزمایشی انجام شد. به عبارت دیگر در تحقیق حاضر مقادیر درصد اسانس با تغییرات میزان بذر (۲۰، ۳۰، ۴۰ گرم)، زمان اسانس‌گیری (۱، ۲، ۳ ساعت) و میزان آسیاب بذرها (۰، ۱، ۲ دقیقه) در اسانس بذرها گلپر اندازه‌گیری شد. نحوه اجرای آزمایش و کدبندی‌های مربوطه در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس روش سطح پاسخ، مدل برازش برای برآورد درصد اسانس از معادله زیر بدست آمد.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2$$

که b_0 عرض از مبدأ، $b_1 - b_3$ ضرایب خطی، $b_{12} - b_{23}$ ضرایب اثرات متقابل، $b_{11} - b_{23}$ ضرایب مجذور متغیرهاست و Y نشان‌دهنده پاسخ متغیرها است (Xu et al., 2015) که می‌تواند درصد اسانس باشد.

متقابل آنها بر یک یا چند سطح متقابل مختلف را ارزیابی کند و اغلب برای روش‌های بهینه‌سازی چند سطحی، شرایط مطلوب و تحلیل ارتباط آنها به کار برده می‌شود (Srivastava et al., 2017). استفاده از RSM به‌عنوان یک طرح آزمایشی اختصاصی، با کاهش تعداد آزمایش‌ها، پارامترهای چندگانه و اثر متقابل آنها را ارزیابی می‌کند. در این روش برای به دست آوردن حداکثر بازده و حداکثر ضریب اطمینان صحت آزمون، تیمارهای کمتر و همچنین زمان کمتری مورد نیاز است (Ara et al., 2015). طرح باکس-بنکن با ۵ نقطه مرکزی به عنوان تکرار برای مطالعه‌ی اثرات سه متغیر مستقل شامل مقدار گیاه X_1 ، مدت اسانس‌گیری X_2 ، اندازه‌ی ذرات با مش X_3 در متغیر وابسته درصد اسانس، پایه‌ریزی شد، متغیرهای

جدول ۲: طراحی آزمایش و نتایج حاصل از روش پاسخ سطح در اسانس بذر گلپر

واحد آزمایشی Run	فاکتور ۱ X_1	فاکتور ۲ X_2	فاکتور ۳ X_3	% اسانس مشاهده شده	% اسانس پیش‌بینی شده
1	30 (0)	3 (+1)	0 (-1)	1.33	1.47
2	30 (0)	3 (+1)	2 (+1)	5	5.2
3	20 (-1)	1 (-1)	1 (0)	4.5	4.31
4	40 (+1)	2 (0)	2 (+1)	4.75	4.65
5	20 (+1)	2 (0)	0 (-1)	1.5	1.59
6	30 (0)	2 (0)	1 (0)	5	5.15
7	20 (-1)	2 (0)	2 (+1)	5	5.03
8	30 (0)	1 (-1)	0 (-1)	1.33	1.12
9	30 (0)	2 (0)	1 (0)	5.33	5.15
10	40 (+1)	1 (-1)	1 (0)	3.5	3.73
11	30 (0)	2 (0)	1 (0)	5.13	5.15
12	30 (0)	2 (0)	1 (0)	5.1	5.15
13	40 (+1)	3 (+1)	1 (0)	4.75	4.64
14	30 (0)	2 (0)	1 (0)	5.2	5.15
15	40 (+1)	2 (0)	0 (-1)	1	0.97
16	30 (0)	1 (-1)	2 (+1)	4.67	4.52
17	20 (-1)	3 (+1)	1 (0)	5	4.76

نتایج
مطابقت مدل سطح پاسخ در اسانس بذر گلپر:
نتایج تجزیه واریانس^۱ و اشتباه آزمایشی برای مدل

سطح پاسخ نشان داد که مدل پیش‌بینی شده برای درصد اسانس به‌طور معنی‌داری دقیق است ($P < 0.01$). نتایج تجزیه واریانس مدل درصد اسانس و p -value و سایر شاخص‌های مرتبط در جدول ۳ خلاصه شده است.

نتایج تجزیه واریانس^۱ و اشتباه آزمایشی برای مدل

ANOVA

جدول ۳. آنالیز واریانس مدل سطح پاسخ در بذر گلپر

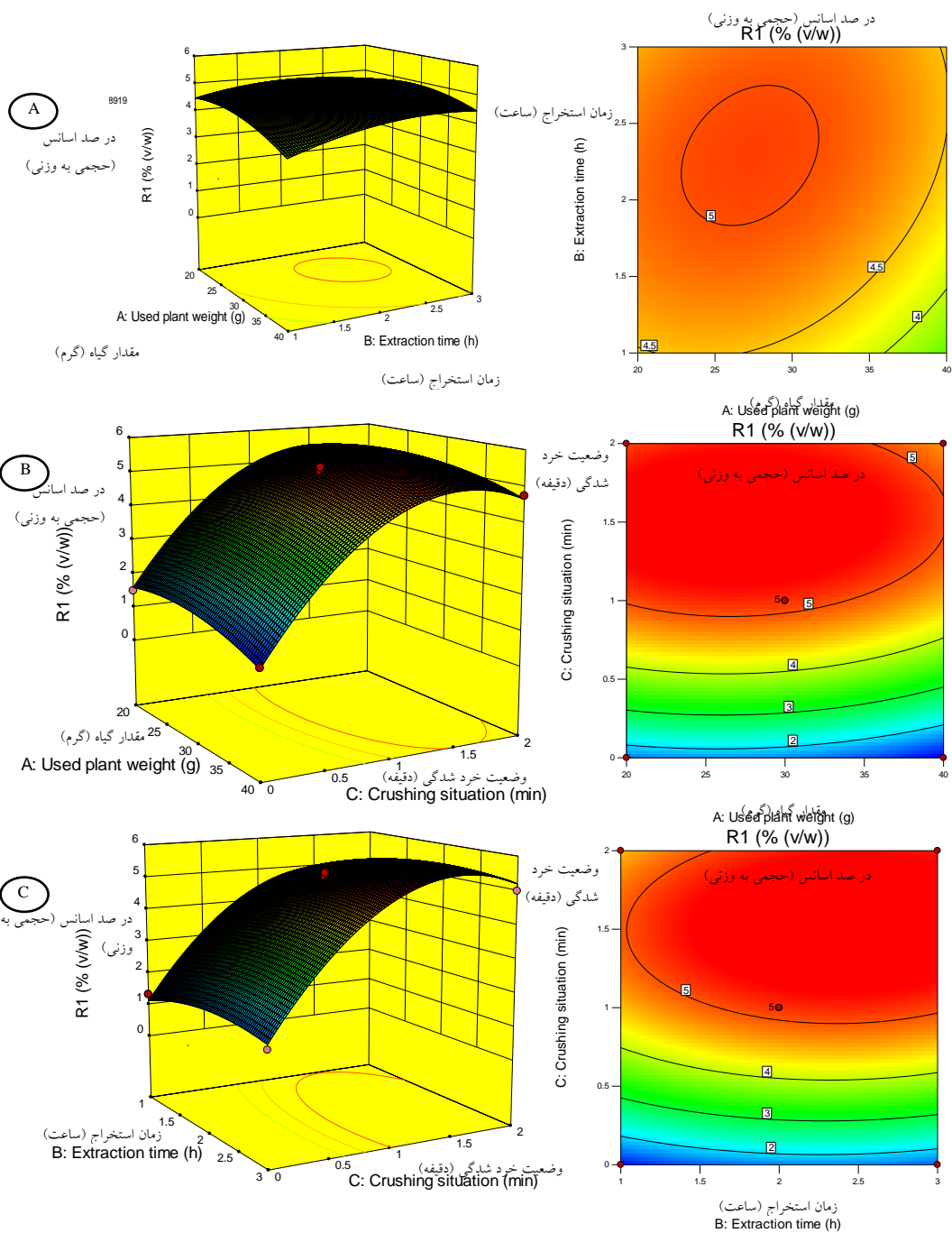
منابع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F-Value	p-value Prob> F	
Model	40.92624	9	4.54736	90.74498	< 0.0001	Significant
X ₁ : A-Used plant weight	0.5	1	0.5	9.977764	0.015956	
X ₂ : B-Extraction time	0.5408	1	0.5408	10.79195	0.013392	
X ₃ : C-Crushing situation	25.41845	1	25.41845	507.2386	< 0.0001	
X ₁ X ₂ : AB	0.140625	1	0.140625	2.806246	0.137807	
X ₁ X ₃ : AC	0.015625	1	0.015625	0.311805	0.593977	
X ₂ X ₃ : BC	0.027225	1	0.027225	0.543289	0.485039	
X ₁ X ₁ : A ²	0.567884	1	0.567884	11.33243	0.01198	
X ₁ X ₁ : B ²	0.507716	1	0.507716	10.13174	0.015425	
X ₁ X ₁ : C ²	12.48903	1	12.48903	249.2252	< 0.0001	
Residual	0.35078	7	0.050111			
Lack of Fit	0.2905	3	0.096833	6.42557	0.052089	not significant
Pure Error	0.06028	4	0.01507			
Cor Total	41.27702	16				
R-squares-adjusted R ²	0.99-0.98					

خطی، ضرایب درجه دوم و ضرایب مربوط به اثرات متقابل در سطح ۰/۰۵ معنی دار بوده است. بر این اساس مدل برازش شده برحسب داده‌های آزمایشی برای هر یک از پاسخ‌ها را می‌توان به صورت زیر نوشت.

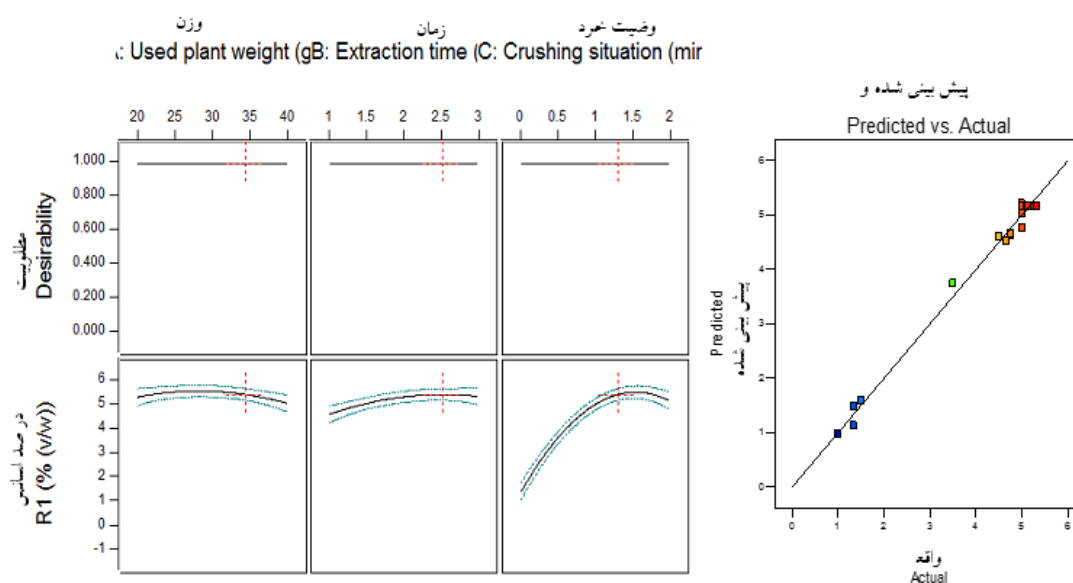
$$Y = 5.15 - 0.25X_1 + 0.26X_2 + 1.78X_3 + 0.19X_1X_2 + 0.063X_1X_3 + 0.082X_2X_3 - 0.37X_1^2 - 0.35X_2^2 - 1.72X_3^2$$

که Y پاسخ پیش‌بینی شده (درصد اسانس) و X₁، X₂ و X₃ به ترتیب مقدار گیاه، زمان اسانس‌گیری و حالت خرد شدگی می‌باشد. R² بالا نشان‌دهنده دقت بالای پیش‌بینی مدل است و طبق شکل ۳ درصد اسانس بدست آمده با نمودار پیش‌بینی شده همبستگی بالایی داشت. نمودار سه بعدی برای درصد اسانس بر اساس متغیرهای X₁، X₂ و X₃ در شکل ۲ نشان داده شده است.

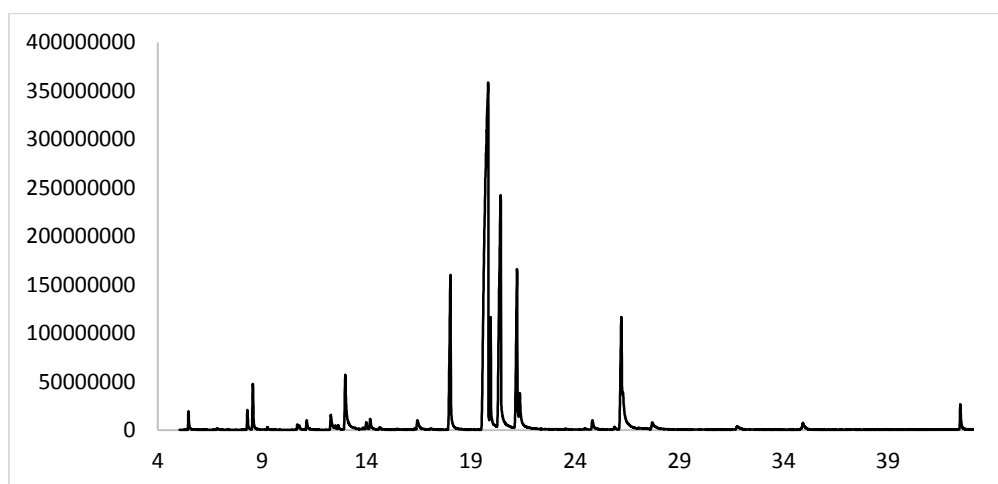
برآورد ضریب و مقدار F-Value و P-Value نشان می‌دهد که وضعیت خردشدگی بیشترین اثر را بر درصد اسانس دارد (P<0.0001) و (F-Value=507.23). داده‌های جدول ۳ نشان می‌دهد که میزان بذر و زمان اسانس‌گیری در مقایسه با وضعیت خردشدگی اهمیت کمتری دارند. علاوه بر این نتایج نشان می‌دهد که ضرایب برای درصد اسانس، در مقایسه با اثرات متقابل ضرایب معنی‌دارتر بود و اثرات متقابل ضرایب، برای هیچ یک از ضرایب معنی‌دار نبود (P=0.593977، P=0.137807، P=0.485039). همچنین مقدار F-Value و P-Value نشان می‌دهد که مجذور ضریب وضعیت خرد شدگی (P<0.0001) در مقایسه با مجذور میزان بذر و زمان اسانس‌گیری (به ترتیب P=0.01198 و P=0.015425) بسیار معنی‌دارتر است. عدد F بدست آمده از ضرایب پاسخ‌ها (متغیر وابسته) نشان داد که اغلب ضرایب



شکل ۲: نمودارهای سه بعدی مربوط اثرات متقابل فاکتورها در بهینه‌سازی روش‌های اسانس‌گیری در بذر گلپر



شکل ۳: همخوانی داده‌های پیش‌بینی شده و مشاهده شده (الف) بهترین موقعیت‌های اسانس‌گیری در اسانس بذر گیاه گلپر با سه مولفه وزن گیاه، زمان استخراج و وضعیت خرد شدگی (ب)



شکل ۴: کروماتوگرام مربوط به اسانس گلپر در حالت بهینه شده

برای دانه‌های تقریباً خرد شده ۵۰۰ تا ۶۵۰ کیلوگرم در متر مکعب استفاده می‌شود که برای دانه‌های گلپر مقداری بین ۲۵-۳۰ گرم بذر در ۶۰۰ میلی‌لیتر آب بدست آمد. با توجه به برهم‌کنش متغیرهای X_1 و X_2 که در شکل A-۲ نشان داده شده، با کاهش مدت زمان اسانس‌گیری (۲ تا ۲/۵ ساعت) مقدار یکسان اسانس در مقایسه با زمان طولانی‌تر بدست می‌آید لذا از این طریق می‌توان در هزینه‌ها نیز صرفه‌جویی کرد.

بیشترین مقدار هر نمودار در ارتباط با مقدار بهینه، اثرات متقابل دو فاکتور مستقل است. بر اساس برهم‌کنش متغیرهای X_1 و X_2 که در شکل A-۲ نشان داده شده است، بیشترین درصد اسانس (۵/۳۳-۵/۱۳) در محدوده متغیر X_1 بین ۱۲-۳۰ گرم ماده گیاهی و در متغیر X_2 بین ۱۲۰ تا ۱۹۲ دقیقه مدت زمان اسانس‌گیری مشاهده شد. به منظور تسریع حرکت بخار و استخراج بیشترین مقدار اسانس از مواد گیاهی

محدوده زمانی ۳-۱ ساعت در یک محدوده بوده و این شرایط در شرایط خرد شدگی بین ۱/۲ تا ۱/۸ دقیقه آسیاب برای متغیرهای X_2 و X_3 بدست آمد. نتایج نشان داد درجات بالاتر از خرد شدگی نیز منجر به کاهش اسانس می‌شود.

شناسایی ترکیبات اسانس به روش GC-MS در گیاه گلپر: طی آنالیز به وسیله کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی ۲۸ ترکیب در اسانس بذر گلپر شناسایی شد (شکل ۴) که بیشترین ترکیبات مربوط به هگزیل بوتیرات، ان-اکتیل استات، هگزیل متیل بوتیرات و ان-هگزیل هگزانات بودند سایر ترکیبات اسانس در جدول ۴ آمده است. همچنین محتوای اسانس در نمونه‌های مورد مطالعه بین ۱ تا ۵/۳۳ درصد متفاوت بود که در جدول ۲ آمده است.

نمودار سه‌بعدی اثرات متقابل X_1 و X_3 در شکل ۲-B نشان داده شده است. با افزایش میزان خرد شدگی بذرها درصد اسانس افزایش یافت و با کاهش میزان آسیاب و حالت بدون آسیاب مقدار اسانس کاهش یافت. بیشترین درصد اسانس در محدوده X_1 بین ۲۶ تا ۳۲ گرم بذر و حالت ($>1/1$) دقیقه آسیاب مشاهده شد. نمودار سه‌بعدی اثرات متقابل X_2 و X_3 بر درصد اسانس در شکل ۲-C نشان داده شده است. در این شکل مشخص است که با خرد شدگی بیشتر زمان رسیدن به بیشینه اسانس کاهش می‌یابد به طوری که در درجه خرد شدگی بیش از یک دقیقه با آسیاب، درصد اسانس در زمان یک ساعت با درصد اسانس با مدت زمان ۳ ساعت تقریباً برابر می‌شود. به عبارت دیگر درصد اسانس در

جدول ۴: ترکیبات شناسایی شده در اسانس بذر گلپر

ردیف	ترکیبات	فرمول تجربی	شاخص بازداری ستون	شاخص بازداری منابع دیگر	درصد
			RI ^b	RI ^c	
1	Isobutyric acid, isopropyl ester	C ₇ H ₁₄ O ₂	655	650	0.62
2	Butyric acid, isopropyl ester	C ₇ H ₁₄ O ₂	670	662	0.08
3	Butanoic acid, 2-methyl-, 1-	C ₈ H ₁₆ O ₂	870	870	0.69
4	Butanoic acid, 3-methyl-, 1-	C ₈ H ₁₆ O ₂	903	905	1.61
5	Propanoic acid, 2-methyl-, butyl ester	C ₈ H ₁₆ O ₂	959	955	0.19
6	Butyric acid, 2-methyl-, isobutyl ester	C ₉ H ₁₈ O ₂	989	990	0.12
7	Isovaleric acid, isobutyl ester	C ₉ H ₁₈ O ₂	1000	998	0.13
8	n-Hexyl acetate	C ₈ H ₁₆ O ₂	1006	1003	3.01
9	isopropyl hexanoate	C ₉ H ₁₈ O ₂	1027	1028	0.06
10	Butyl 2-methylbutanoate	C ₉ H ₁₈ O ₂	1050	1045	0.3
11	2-methyl butyl butyrate	C ₉ H ₁₈ O ₂	1069	-	0.12
12	1-Octanol	C ₈ H ₁₈ O	1079	1075	0.03
13	Butyric acid, 2-methyl-, 2-methylbutyl	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1111	1105	0.05
14	Isovaleric acid, 2-methylbutyl ester	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1114	1109	0.67
15	Propyl tiglate	C ₈ H ₁₄ O ₂	1131	-	8
16	Isobutyric acid, hexyl ester	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1158	1150	7.75
17	Hexyl butyrate	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1237	-	43.27
18	(Z)-3-Octen-1-ol acetate	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	1246	-	3.27
19	n-Octyl acetate	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1265	-	15.78
20	hexyl methylbutyrate	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	1292	-	8.01
21	hexyl valerate	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	1298	1298	1.78
22	octyl propionate	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	1310	-	0.03

23	octylisobutyrate	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	1345	1344	0.61
24	Amylvinylcarbonyl butyrate	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	1370	-	0.05
25	n-Hexyl hexanoate	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	1386	1385	6.97
26	Hexanoic acid, 10-undecen-1-yl ester	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	1604	-	0.29
27	n-Octylcaprylate	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1790	-	0.56
28	Diisooctyl phthalate	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	2550	2545	1.05
	Monoterpene hydrocarbons	-	-	-	-
	Oxygenated monoterpene	-	-	-	70.84
	Others	-	-	-	26.34
	Total	-	-	-	97.18

RI^b شاخص بازداری با ستون HP-5ms؛ RI^c شاخص بازداری با همان ستون در منابع (Adams, 1995) و سایر (NIST)؛ Ref. رفرنس‌هایی که در منابع آمده است.

بحث

داده می‌شود. نتایج تجزیه ANOVA و اشتباه آزمایشی برای مدل RSM نشان داد که مدل پیش‌بینی شده برای درصد اسانس به‌طور معنی‌داری دقیق است ($P < 0.01$). R^2 و R^2 تصحیح شده (R^2 -adj) نشانگر برازش مناسب مدل سطح پاسخ است. یک برازش مناسب با R^2 و ارزش p بالا و عدم معنی‌داری نقص برازش (Lack of fit) تعیین می‌شود که دو شاخص اول نشانگر معنی‌داری مدل و عدم معنی‌داری شاخص سوم نشانگر این است که تغییرات در نمونه‌ها فقط به دلیل فاکتورهای انتخاب شده مدل و خطای خالص می‌باشد (Puértolas et al., 2011). مقدار F -Value ۶/۴۲ برای lack of fit نشان می‌دهد که مدل به اندازه کافی داده‌های آزمایشی بدست آمده را توصیف می‌کند. همچنین F -Value و P -Value می‌تواند به‌عنوان یک ابزار برای بررسی اهمیت هر ضریب استفاده شود. مقادیر بزرگتر F -Value و کوچکتر P -Value معنی‌دارتر از ضریب مربوطه است. مقدار زیاد F -Value و کم P -Value که برای هر ضریب بدست آمده، نشان‌دهنده اهمیت مدلسازی است (Noorimotlagh et al., 2016). با توجه به محدود بودن منابع ذخایر فسیلی و همچنین اختصاص درصد مهمی از هزینه‌ها (۴۰ درصد) در صنعت به

استفاده از ANOVA برای ارزیابی قابلیت و اهمیت مدل مورد مطالعه مفید است (Darvishi, Cheshmeh Soltani et al., 2014). تجزیه واریانس برای تعیین عوامل اصلی و اثر متقابل آنها استفاده شد. نتایج تجزیه ANOVA برای مدل RSM یک عملکرد خوب با R^2 و R^2 تصحیح شده (R^2 -adj) به ترتیب ۰/۹۹ و ۰/۹۸ نشان داد. ضریب همبستگی (R^2) نشان می‌دهد که چه مقدار از تغییرات مشاهده شده در داده‌های بدست آمده، برای مدل محاسبه شده است. برای یک مدل آماری خوب باید مقدار R^2 بین ۰-۱ باشد و مقادیر نزدیک به ۱ بهتر است که نشان‌دهنده مناسب بودن مدل می‌باشد (Darvishi, Cheshmeh Soltani et al., 2014). مقدار R^2 تصحیح شده یکی از معیارهای مناسب برای سنجش مدل‌های با تعداد متغیر مستقل مختلف است و حتی از R^2 هم مناسب‌تر است (Ara et al., 2015). همچنین مقدار R^2 تصحیح شده (R^2 -adj) اهمیت مدل را نشان می‌دهد (Amini et al., 2008). مقدار ۰/۹۸ برای R^2 تصحیح شده (R^2 -adj) نشان می‌دهد که ۹۸ درصد از تغییرات عملکرد اسانس به متغیرهای مستقل (میزان بذر، زمان اسانس‌گیری و میزان آسیاب بذرها) نسبت

داشته باشد. نتیجه مشابهی در استخراج اسانس از *Juniperu scommunis* بدست آمد و مشخص شد که با افزایش میزان خردشدگی درصد اسانس افزایش یافت (Larkeche et al., 2015). با توجه به اینکه میزان اسانس به درجه‌ای از خرد شدگی نیاز دارد لذا می‌توان با انتخاب زمان مناسب برای آسیاب به همان مقدار اسانس در مدت زمان کوتاه‌تری بدست آورد که به این طریق نیز در مصرف انرژی صرفه‌جویی کرد. ترکیبات اسانس بذر گلپر و درصد اسانس آن که از مناطق مختلف جمع‌آوری شده نیز نتایج مشابهی گزارش شده است. طی مطالعه‌ای، عملکرد اسانس گلپر که از ۱۷ جمعیت وحشی از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شده بود ۱/۶ تا ۴/۹ از ماده خشک گیاهی بود. در اسانس ۳۶ ترکیب شناسایی شد که عمده اجزای اسانس شامل: اکتیل استات (۷/۵ تا ۴۰/۸ درصد)، هگزیل بوتیرات (۱۳/۳ تا ۴۳/۸ درصد) و هگزیل ایزوبوتیرات (۲/۹ تا ۷/۲ درصد) بودند. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که برخی از اثرات درمانی این گیاه (ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدقارچی) می‌تواند به این ترکیبات نسبت داده شود (Radjabian et al., 2013). نتایج پژوهشی نشان داد که عمده اجزای تشکیل دهنده‌ی اسانس بذر گلپر شامل: هگزیل ایزو بوتیرات (۴/۳ درصد)، هگزیل ۲-متیل بوتانات (۲/۵ درصد)، اکتیل استات (۵/۱۶ درصد) و هگزیل بوتیرات (۵/۵۶ درصد) است (Hemati et al., 2010). در مطالعه دیگری، در اسانس نمونه‌های گلپر که از جاده چالوس جمع‌آوری شده بود ۳۲ ترکیب شناسایی شد که عمده اجزای اسانس را هگزیل بوتیرات و اکتیل استات تشکیل می‌داد (Saeidnia et al., 2005). بر اساس مطالعات اخیر، ترپن‌ها یکی از اجزاء عمده اسانس بذر گلپر هستند که اثر ضدتشنجی گلپر را به این ترکیبات نسبت می‌دهند (Majidi and Lamardi, 2018).

انرژی، به منظور صرفه‌جویی در سوخت‌های فسیلی بایستی از روش‌های سازگار با مصرف انرژی استفاده شود (Fatahi et al., 2010). مدت زمان اسانس‌گیری به عوامل متعددی نظیر نوع اندام و سرعت بخار آب بستگی دارد. استخراج اسانس‌هایی که حالت آگروژن هستند به دلیل سطحی بودن سریع‌تر بوده و به مقدار و سرعت بخار کمتری نیاز دارند و بلعکس اندام‌های آندوژن از لحاظ اسانس، مدت زمان طولانی‌تری را نیاز دارند. اگرچه افزایش زمان استخراج میزان اسانس را در بسیاری از گیاهان دارویی افزایش می‌دهد، ولی زمان طولانی‌تر به دلیل انجام واکنش‌های شیمیایی غیر قابل اجتناب همچون هیدرولیز ترکیبات اسانس و تولید ترکیبات نامطلوب از جمله تبدیل استرها به الکل و اسیدهای اولیه (خصوصاً فراهم بودن شرایط در روش تقطیر با آب به دلیل حضور آب) باعث افت کیفیت اسانس می‌شود (Ara et al., 2015). از نظر انرژی نیز بخش اعظم فراوری اسانس (حدود ۴۰ درصد) را فرایندهای پس از برداشت تشکیل می‌دهد (Fatahi et al., 2010). اسانس در بذور تیره چتریان در کانال‌های حاوی اسانس موسوم به مجاری ویتا قرار دارد و اگر گیاه به صورت سالم و خرد نشده استفاده شود، اسانس تنها زمانی از بذر استخراج می‌شود که بخار به داخل بافت نفوذ کرده و اسانس را با خود منتقل کند، که این فقط با انتشار آب صورت می‌گیرد و چون انتشار فرایندی آهسته می‌باشد لذا مستلزم صرف زمان و انرژی بیشتری است. لذا بهتر است که به صورت خرد شده استفاده شود. نتایج نشان داد درجات بالاتر از خرد شدگی نیز منجر به کاهش اسانس می‌شود که در این شرایط به نظر می‌رسد گیاه به طور کامل پودر شده و لذا عبور بخار آب از میان مواد پودر شده مشکل‌ساز شود. لذا در فرایندهای استخراج اسانس بخار آب باید فضای کافی برای عبور از تمام قسمت‌های مواد گیاهی را به طور یکسان

برای درصد اسانس به طور معنی داری دقیق است ($P < 0.01$). بیشترین درصد اسانس (۵/۳۳) در محدوده ۳۰ گرم ماده گیاهی، ۲ ساعت اسانس گیری و یک دقیقه آسیاب بذرها مشاهده شد. همچنین طی آنالیز به وسیله کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی ۲۸ ترکیب در اسانس بذر گلپر شناسایی شد که بیشترین ترکیبات مربوط به هگزیل بوتیرات، ان-اکتیل استات، هگزیل متیل بوتیرات و ان-هگزیل هگزانات بودند.

نتیجه گیری نهایی

در این مطالعه اسانس بذر گلپر که به روش تقطیر با آب استخراج گردید، به وسیله روش سطح پاسخ بهینه سازی شد. نتایج تجزیه واریانس و اشتباه آزمایشی برای RSM نشان داد که مدل پیش بینی شده

References

1. Amini, M., Younesi, H., Bahramifar, N., Lorestani, A.A.Z., Ghorbani, F., Daneshi, A. and Sharifzadeh, M. 2008. Application of response surface methodology for optimization of lead biosorption in an aqueous solution by *Aspergillus niger*. Journal of hazardous materials, 154(1-3): 694-702.
2. Ara, K.M., Jowkarderis, M. and Raofie, F. 2015. Optimization of supercritical fluid extraction of essential oils and fatty acids from flixweed (*Descurainia Sophia* L.) seed using response surface methodology and central composite design. Journal of food science and technology, 52(7):4450-4458.
3. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils—a review. Food and Chemical Toxicology, 46(2): 446-475.
4. Darvishi Cheshmeh Soltani, R., Rezaee, A., Khataee, A.R. and Godini, H. 2014. Optimisation of the operational parameters during a biological nitrification process using response surface methodology. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 92(1): 13-22.
5. Davari, M. and Ezazi, R. 2017. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Zhumeriamajdae*, *Heracleum persicum* and *Eucalyptus* sp. against some important phytopathogenic fungi. Journal de mycologiemedicale, 27(4): 463-468.
6. Dehghan, H., Sarrafi, Y., Salehi, P. and Ebrahimi, S.N. 2017. α -Glucosidase inhibitory and antioxidant activity of furanocoumarins from *Heracleum persicum*. Medicinal Chemistry Research, 26(4): 849-855.
7. Dey, S.S. and Dora, K.C. 2014. Optimization of the production of shrimp waste protein hydrolysate using microbial proteases adopting response surface methodology. Journal of food science and technology, 51(1): 16-24.
8. Ebrahimniaketai, SH. and Golestan, L. 2015. the factors affecting the extraction of essential oils using supercritical fluids, Twenty-third National Congress of Food Science and Technology, Quchan, Islamic Azad University, Quchan.
9. Ebadollahi, A., Zavieh, E.A., Nazifi, A., Sendi, J.J., Farjaminezhad, M., Samadzadeh, A. and Tajmiri, P. 2014. Chemical composition and bio-pesticidal values of essential oil isolated from the seed of *Heracleum persicum* Desf. ex Fischer (Apiaceae). Spanish Journal of Agricultural Research, 12(4): 1166-1174.
10. Fattahi, M. and Fattahi, B. 2010. Principles of medicinal plants. First Edition. Publications of Tehran University Jihad-e Daneshgahi publication. 473 p.
11. Ghahraman, A. 1996. The Scientific Names of 2000 Plants in Iranian Color Flora. First Edition. Forestry and Rangeland Research Institute, 347p.
12. Hajhashemi, V., Sajjadi, S.E. and Heshmati, M. 2009. Anti-inflammatory and analgesic properties of *Heracleum persicum* essential oil and hydroalcoholic extract in animal models. Journal of Ethnopharmacology, 124(3): 475-480.

13. Hajhashemi, V., Dashti, G., Saberi, S. and Malekjamshidi, P. 2014. The effect of hydroalcoholic extract and essential oil of *Heracleum persicum* on lipid profile in cholesterol-fed rabbits. *Avicenna Journal of phytomedicine*, 4(3): p.144.
14. Hemati, A., Azarnia, M. and Angaji, A.H. 2010. Medicinal effects of *Heracleum persicum* (Golpar). *Middle-East Journal of Scientific Research*, 5(3): 174-176.
15. Kan, Y., Chen, T., Wu, Y. and Wu, J., 2015. Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. *International journal of biological macromolecules*, 72: 151-157.
16. Khazaei, K.M., Jafari, S.M., Ghorbani, M., Kakhki, A.H. and Sarfarazi, M. 2016. Optimization of anthocyanin extraction from saffron petals with response surface methodology. *Food Analytical Methods*, 9(7): 1993-2001.
17. Larkeche, O., Zermane, A., Meniai, A.H., Crampon, C. and Badens, E. 2015. Supercritical extraction of essential oil from *Juniperus communis* L. needles: Application of response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 99: 8-14.
18. Majidi, Z. and Lamardi, S.N.S. 2018. Phytochemistry and biological activities of *Heracleum persicum*: a review. *Journal of integrative medicine*, 3: 34-51.
19. Mozaffarian, V. 2007. *Iran Flora Apiaceae family*. Research Institute forests and rangelands, 580p.
20. Mojab, F., Rustaiyan, A.H. and Jasbi, A.R. 2002. Essential oils of *Heracleum persicum* Desf.ex Fischer leaves. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1): 6-10.
21. Noorimotlagh, Z., Shahriyar, S., Darvishi CheshmehSoltani, R. and Tajik, R. 2016. Optimized adsorption of 4-chlorophenol onto activated carbon derived from milk vetch utilizing response surface methodology. *Desalination and Water Treatment*, 57(30): 14213-14226.
22. Puértolas, E., Saldaña, G., Álvarez, I. and Raso, J. 2011. Experimental design approach for the evaluation of anthocyanin content of rosé wines obtained by pulsed electric fields. Influence of temperature and time of maceration. *Food Chemistry*, 126(3): 1482-1487.
23. Radjabian, T., Salimi, A., Rahmani, N., Shokravi, A. and Mozaffarian, V. 2013. Essential oil composition of some wild populations of *Heracleum persicum* Desf.Ex Fischer growing in Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(6): 841-849.
24. Raut, J.S. and Karuppayil, S.M. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62: 250-264.
25. Saeidnia, S., Gohari, A.R., Hadjiakhoondi, A., Afrapoli, F.M. and Shafiee, A. 2005. Cytotoxicity and chemical constituents of the volatile oil of golpar (*Heracleum persicum* Desf.Ex Fischer). *Bioscience Research*, 2:107-10.
26. Sayyah, M., Moaied, S. and Kamalinejad, M. 2005. Anticonvulsant activity of *Heracleum persicum* seed. *Journal of Ethno pharmacology*, 98(1): 209-211.
27. Sodeifian, G., Ardestani, N.S., Sajadian, S.A. and Ghorbandoost, S. 2016. Application of supercritical carbon dioxide to extract essential oil from *Cleome coluteoides* Boiss.: experimental, response surface and grey wolf optimization methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 114: 55-63.
28. Srivastava, M., Maheshwari, S., Kundra, T.K. and Rathee, S. 2017. Multi-response optimization of fused deposition modelling process parameters of ABS using response surface methodology (RSM)-based desirability analysis. *Materials Today: Proceedings*, 4(2):1972-1977.
29. Walasek, M., Grzegorzczak, A., Malm, A. and Skalicka-Woźniak, K. 2015. Bioactivity-guided isolation of antimicrobial coumarins from *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier (Apiaceae) fruits by high-performance counter-current chromatography. *Food chemistry*, 186: 133-138.
30. Walia, A., Mehta, P., Guleria, S. and Shirkot, C.K. 2015. Improvement for enhanced xylanase production by *Cellulosimicrobium cellulans* CKMX1

- using central composite design of response surface methodology. 3 Biotech, 5(6): 1053-1066.
31. Xu, H., Xu, X., Tao, Y., Yuan, F. and Gao, Y. 2015. Optimization by response surface methodology of supercritical carbon dioxide extraction of flavour compounds from Chinese liquor vinasse. Flavour and fragrance journal, 30(4): 275-281.
32. Yılmaz, F.M., Karaaslan, M. and Vardin, H. 2015. Optimization of extraction parameters on the isolation of phenolic compounds from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) pomace. Journal of Food Science and Technology, 52(5): 2851-2859.

Optimization of Effective Parameters in Essential Oil Extraction of *Heracleum persicum* Desf. Ex Fischer Seed Using Response Surface Methodology

Rezapour, M.¹, Fattahi, M.^{2*}

¹Ph.D. student., Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

²Associate Prof., Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 2018-4-28 ; Accepted: 2020-1-14

Abstract

In the recent years use of plant essential oils (EOs) in the food and medicine industry is increasing. So, the aim of this study was to optimize effective factors for maximizing essential oil yield and evaluation of its composition under the optimal conditions. The effect of different parameters including different amounts of plant (X1), extraction time of essential oils (X2) and particle size of seeds obtained with mesh (X3) on three levels (1, 0, 1-) as independent variable to optimize essential oil percentage as dependent variables were evaluated using response surface methodology. The seeds of *Heracleum persicum* Desf. Ex Fischer were collected from Ayalono area (East Azerbaijan) in August 2015. The essential oil was extracted by Clevenger apparatus and were identified by GC/MS. ANOVA analysis results and experimental error for the RSM model were showed that the predicted model for the essential oil percentage was significantly accurate ($P < 0.01$). The highest percentage of essential oil (5.33) was obtained in 30 g of plant material for 2 hours of extraction and 1 minute of grinding of seeds. In gas chromatographic analysis, 28 compounds were identified in essential oil of plant seed, the major components of which included hexyl butyrate (43.27%) and n- acetoacetate (15.78%). Since extraction of essential oils on industry scale is a time and energy consuming process, so the results of this study may be used in the industrial scale after further studies.

Keywords: Essential oil extraction, *Heracleum persicum* Desf. Ex Fischer., Optimization, Response surface methodology

*Corresponding author; mohamadfattahi@yahoo.com