

## بهینه‌سازی استخراج اسانس کرفس و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن با استفاده از روش سطح پاسخ و امواج التراسونیک

فاطمه سلیمی<sup>\*۱</sup> - محمد فتاحی<sup>۲</sup> - جواد حمزه ئی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۰۷

### چکیده

گیاهان دارویی به موجب داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدان در حفظ سلامت بشر بسیار مفید بوده و کرفس به عنوان یک گیاه دارویی، غنی از این ترکیبات است. بذر کرفس دارای اسانس قابل توجهی است و در تهیه عطر، ادویه و درمان بیماری‌ها کاربرد دارد. در این تحقیق، اثر نسبت آب به بذر (۳۷۵، ۵۰۰ و ۶۲۵ میلی‌لیتر به ۳۵ گرم بذر)، زمان التراسونیک (۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه) و زمان استخراج با کلونجر (۱، ۲ و ۳ ساعت) بر استخراج اسانس (درصد حجمی/وزنی) از بذر کرفس و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس به دو روش فرپ (FRAP) و درصد DPPH<sub>30min</sub> بررسی و برای بهینه‌سازی از روش سطح پاسخ (RSM) استفاده شد. براساس نتایج، بهترین نسبت تیمارها مربوط به نسبت ۶۲۵ میلی‌لیتر آب به ۳۵ گرم بذر، اعمال امواج التراسونیک ۲۰ دقیقه و اسانس‌گیری با کلونجر در مدت زمان ۳ ساعت بود. در همین شرایط بهینه، نسبت ۶۲۵ میلی‌لیتر آب به ۳۵ گرم بذر، عدم اعمال امواج التراسونیک و اسانس‌گیری در مدت زمان ۳ ساعت به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. در شرایط بهینه، میزان اسانس، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس در روش فرپ و روش درصد DPPH<sub>30min</sub> به ترتیب ۲/۳۳ درصد حجمی/وزنی، ۱۵۱۳/۶ میکرومولار Fe<sup>+2</sup> در ۵۰ میکرولیتر اسانس و ۴۸/۵۲ درصد بدست آمد. در تیمار شاهد نیز میزان اسانس، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس در روش فرپ و روش درصد DPPH<sub>30min</sub> به ترتیب ۱/۴۵ درصد حجمی/وزنی، ۱۰۶۴ میکرومولار Fe<sup>+2</sup> در ۵۰ میکرولیتر اسانس و ۲۹/۳۰ درصد حاصل شد. مقادیر داده‌های حاصل از آزمایش با مدل پیش بینی شده توسط RSM تطابق داشت و این نشان می‌دهد که استفاده از این روش در بهینه‌سازی شرایط اسانس‌گیری، مناسب است. علاوه بر این، کاربرد التراسونیک میزان استخراج اسانس و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن را افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: امواج فراصوت، دی پی پی اچ، روغن فرار، فرپ، گیاه دارویی

### مقدمه

اسانس‌ها بطور نامنظم در اندام‌های گیاهان سنتز می‌شوند. برخی گیاهان هیچ اسانسی ندارند، در حالیکه برخی دیگر (مانند خانواده چتریان، نعناعیان، تیره کاسنی و غیره) در بسیاری از گونه‌هایشان کم و بیش مقادیر زیادی اسانس دارند. روغن‌های فرار غالباً در برخی از غده‌های مخصوص یا در داخل بافت یا در سطح روپوست (اپیدرم) گیاه یافت می‌شوند. خاصیت دارویی اسانس‌ها بسیار متفاوت است. برخی روی دستگاه عصبی اثر می‌گذارند مانند روغن رازیانه (بادشکن) یا روغن افسنتین (محرک)، بسیاری از آن‌ها ترشح شیره معده را افزایش می‌دهند (غدد بزاقی، شیره روده و معده، صفرا) و بنابراین اشتها را زیاد می‌کنند مانند افسنتین، جنتیانا، علف چای و زیره و بسیاری اثرات درمانی دیگر که اسانس‌ها می‌توانند انجام دهند (۸).

معمولترین روش در بدست‌آوردن اسانس از مواد گیاهی تقطیر با آب، تقطیر با بخار و تقطیر با آب و بخار است (۲۲). استخراج ترکیبات، مرحله مهمی برای جداسازی و شناسایی این ترکیبات در گیاهان دارویی است. به منظور دستیابی به روش‌های کارآمدتر،

طی سالیان متمادی داروهای طبیعی خصوصاً گیاهان دارویی اساس و حتی در برخی موارد تنها طریق درمان محسوب می‌شدند و مواد موثره موجود در آن‌ها در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می‌گرفت (۱۹ و ۲۰). از مواد موثره موجود در گیاهان دارویی، روغن‌های فرار یا اسانس‌ها هستند که از پر مصرف‌ترین فرآورده‌های گیاهی در طب خانگی به شمار می‌روند. اسانس‌ها عامل اصلی بوی خوش برخی گیاهان نظیر گشنیز، رازیانه، زیره و آویشن هستند.

۱ و ۲- به ترتیب دانش آموخته دکتری گیاهان دارویی و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

(\*- نویسنده مسئول: Email: fatemesalimi18@yahoo.com)

۳- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

DOI: 10.22067/jhorts4.v32i1.65721

موفقیت آمیزی برای توسعه، پیشرفت و بهینه سازی فرآیندها استفاده می شود (۳، ۱۷ و ۲۸).

کرفس از قدیم مورد توجه بشر بوده است. مصریان، یونانیان، رومی ها و چینی ها از این گیاه به عنوان دارو استفاده می کردند. کرفس دمبرگی با نام علمی *Apium graveolens. var. dulce* متعلق به تیره چتریان است. بخش سبزی و میوه های کرفس منبع ترکیبات اصلی می باشند. گل های کرفس کوچک و سفید رنگ هستند که به صورت چتر مرکب ظاهر می شود و در انتهای ساقه گل دهنده به ارتفاع ۹۰-۶۰ سانتی متر قرار می گیرد. مقدار اسانس بذر کرفس حدود ۱/۵ الی ۳ درصد گزارش شده است. میوه کرفس (تخم کرفس) مدر بوده و رفع کننده نفخ شکم و دردهای آفلونزا است (۷). سبزیجات برگی علاوه بر مواد معدنی، دارای ارزش درمانی و ویتامین های آنتی اکسیدانی و رنگدانه ها هستند (۲۵). بنابراین، هدف این پژوهش بکارگیری روش سطح پاسخ به منظور دستیابی به حداکثر بازده، به کمک امواج التراسونیک در گیاه کرفس بود. همچنین، شرایط بهینه استخراج اسانس تعیین و فعالیت آنتی اکسیدانی آن با اعمال امواج التراسونیک مطالعه شد.

### مواد و روش ها

در این آزمایش از طرح Box-Behnken به منظور بررسی تأثیر تیمارهای نسبت آب به بذر در سه سطح (۳۷۵، ۵۰۰ و ۶۲۵ میلی لیتر آب به ۳۵ گرم بذر)، زمان اعمال التراسونیک در سه سطح (۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه) و مدت زمان استخراج اسانس با کلونجر در سه سطح (۱، ۲ و ۳ ساعت) بر میزان استخراج اسانس از بذر کرفس استفاده شد. روش سطح پاسخ (RSM) نیز به منظور تعیین نقاط بهینه فرایند استخراج اسانس به کمک امواج التراسونیک جهت دستیابی به حداکثر راندمان استخراج اسانس از بذر کرفس مورد استفاده قرار گرفت. برای اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس کرفس به روش FRAP و DPPH نیز معرف DPPH و TPTZ از شرکت سیگما الدریج خریداری شد. در این تحقیق از بذر کرفس جمع آوری شده از اهواز استفاده شد. بذر کرفس مورد استفاده از بذور توده محلی اهواز بوده و از کشاورزان منطقه تهیه گردید. بذر مورد نظر در سال زراعی ۱۳۹۴ تولید شده بود. در تمام آزمایش ها (۱۵ واحد آزمایشی) از ۳۵ گرم بذر رسیده و خشک کرفس استفاده شد. جهت اعمال سطوح التراسونیک ابتدا مقدار ۳۵ گرم بذر کرفس به وسیله ترازو با دقت ۰/۰۰۱ توزین شد و بسته به تیمار هر ۳۵ گرم بذر کرفس با مقادیر ۳۷۵، ۵۰۰ و ۶۲۵ میلی لیتر آب مخلوط گردید. به منظور ایجاد امواج فراصوت در این پژوهش از دستگاه مولد فراصوت Elma مدل E120H با توان دمایی ۶۰۰ وات و فرکانس ۳۷ کیلو هرتز، استفاده گردید. زمان های التراسونیک برای واحدهای آزمایشی تنظیم شد و

بایستی مصرف حلال و زمان استخراج، کاهش و عملکرد بالا رود. روش های متنوع و جدید برای استخراج برخی ترکیبات فعال از گیاهان نظیر استخراج به کمک التراسونیک (UAE)، استخراج با حلال فوق بحرانی، استخراج آنزیمی و استخراج با دستگاه سوکسله توسعه پیدا کردند (۱۱ و ۲۹). از بین روش ها، استخراج به کمک التراسونیک ساده و بسیار سودمند است. افزایش در استخراج به کمک امواج التراسونیک عمدتاً به حفره سازی در مولکول بر اثر ارتعاش صوتی ایجاد شده از طریق عبور امواج التراسوند، نسبت داده می شود. مراحل فرآیند استخراج ترکیبات گیاهی، از طریق امواج فراصوت، شامل تورم بافت برای جذب حلال و خروج ترکیبات از بافت به حلال با ایجاد تخلخل و منافذ در دیواره سلولی است که این عمل انتقال جرم را ساده و سریع می نماید (۱۰). اخیراً از روش التراسوند برای بهبود استخراج پلی ساکاریدها و اسانس ها از مواد گیاهی، استفاده بیشتری می شود. اعتقاد بر این است که اثر مکانیکی اولتراسوند در آزاد شدن ترکیبات آلی موجود در مواد گیاهی به علت ایجاد اختلال در دیواره سلولی، تشدید انتقال جرم و دسترسی آسان تر حلال به محتوای سلول است. استفاده از این روش موجب صرفه جویی در وقت و انرژی می شود. در محیط مایع امواج صوتی باعث ایجاد کاویتاسیون می شود. کاویتاسیون عبارت از تشکیل و فروپاشی حباب در محیط مایع می باشد. سرعت کاویتاسیون، انقباض و انبساط های متوالی بستگی به فرکانس التراسوند دارد و سبب دفرمه شدن مواد جامد متخلخل و افزایش انتقال جرم در میوه ها و دانه ها می شود. تحقیقات صورت گرفته در مورد استفاده از التراسونیک در استخراج اسانس و ترکیبات آن از گیاهان دارویی نظیر مریم گلی (۲۸) و زیره سیاه (۱) حاکی از افزایش راندمان و کیفیت بهتر آن نسبت به روش های معمولی است. بر خلاف شیوه های مرسوم، امواج التراسوند با تخریب در دیواره سلولی در زمان کم، عصاره گیاهی را در طول دیواره سلولی انتشار می دهد. عواملی نظیر میزان رطوبت، اندازه ذرات در گیاه مورد نظر و نوع حلال مورد استفاده در استخراج کارآمد، مهم هستند. علاوه بر این، فاکتورهای مربوط به ویژگی های دستگاه تولید کننده امواج مانند فرکانس، فشار، دما و زمان، در کارکرد امواج صوتی موثر می باشند (۲۷). بنابراین، از روش سطح پاسخ برای تعیین مقادیر بهینه فاکتورهای مورد بررسی استفاده می شود. زیرا در این روش جهت حصول حداکثر بازده و حداکثر ضریب اطمینان صحت آزمایش، تیمارهای کمتر و همچنین زمان کمتری مورد نیاز است (۲۱). در واقع، هدف در طرح های رویه پاسخ، بهینه سازی پاسخ (متغیر خروجی) است که متأثر از چندین متغیر مستقل (متغیرهای ورودی) می باشد (۱۴). از روش سطح پاسخ به عنوان یک نرم افزار کارآمد نام برده اند. به این علت که برای بهینه سازی یک فرآیند، متغیرهای مستقل، اثر ترکیبی روی پاسخ مطلوب دارند. در واقع، روش سطح پاسخ مجموعه ای از سیستم های ریاضی و آماری است که به طور

اسانس به صورت درصد حجمی/وزنی با نرم افزار اکسل تعیین شد. قابل ذکر است که تیمار شاهد یعنی استفاده از شرایط بهینه تعیین شده از طریق روش سطح پاسخ (کاربرد فاکتورهای اول و سوم (X<sub>1</sub>, X<sub>3</sub>) و بدون اعمال فاکتور دوم (X<sub>2</sub>))، برای مقایسه نتایج در نظر گرفته شد. ظرفیت آنتی اکسیدانی DPPH بر اساس بوریتر و بوکار (۴) اندازه گیری شد. ابتدا به ۵۰ میکرولیتر اسانس، ۵ میلی لیتر محلول ۰/۰۰۴ درصد DPPH در متانول اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت و با استفاده از رابطه  $I\% = (A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}) \times 100$  مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی محاسبه گردید که در این فرمول: A<sub>blank</sub>: جذب نوری کنترل منفی، فاقد اسانس و A<sub>sample</sub>: جذب نوری غلظت‌های مختلف اسانس است. فعالیت آنتی اکسیدانی FRAP نیز بر اساس بنزی و استرین (۲) با اندکی تغییر و با استفاده از نمودار استاندارد محاسبه شد. برای این کار ۲/۸۵ میلی لیتر محلول فرپ بعلاوه ۵۰ میکرولیتر اسانس برای هر نمونه استفاده شد و پس از ۱۰ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۳ نانومتر قرائت گردید.

دما یکسان بود. پس از اعمال دو تیمار اول (نسبت آب به بذر و امواج التراسونیک)، استخراج اسانس از بذر برای هر واحد آزمایشی با استفاده از دستگاه کلونجر صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: اثرات اصلی و متقابل فاکتورهای آزمایشی بر مقدار اسانس (درصد حجمی/وزنی) و فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس با استفاده از طرح آماری RSM مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در روش RSM برای هر متغیر وابسته، مدلی تعریف شده که اثرات اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می‌کند. مدل چند متغیره به صورت معادله شماره ۱ می‌باشد. در مدل مذکور، Y پاسخ پیش‌بینی شده، b<sub>0</sub> ضریب ثابت، b<sub>i</sub> اثرات خطی، b<sub>ii</sub> اثر مربعات و b<sub>ij</sub> اثر متقابل است.

$$Y_n = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_{ij} + \sum_{i \neq j=1}^3 b_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

در روش RSM از طرح باکس بنکن (BBD) برای تعیین کد استفاده شد. بر اساس طرح باکس بنکن کدهای اختصاص یافته برای متغیرهای مستقل در آزمایش حاضر به شرح جدول ۱ می‌باشد. پس از اجرای روش RSM و استخراج اسانس از تیمارهای آزمایشی، مقدار

جدول ۱- متغیرهای مستقل و مقادیر آنها  
Table 1- Independent variables and their values

متغیر مستقل Independent variables	نماد ریاضی Symbols	سطوح متغیر Coded levels		
		+1	0	-1
نسبت آب به بذر Water to seed ratio	X <sub>1</sub>	625	500	375
زمان التراسونیک Ultrasonic time	X <sub>2</sub>	30	20	10
زمان کلونجر Extraction time	X <sub>3</sub>	3	2	1

(درصد DPPH<sub>30min</sub>) (معادله ۳) و فرپ (معادله ۴)) به شرح ذیل است:

$$EO (\%v/w) = 1.20000 + 0.075000 X_1 - 0.300000 X_2 + 0.875000 X_3 + 0.725000 X_{12} - 0.825000 X_{22} + 0.725000 X_{32} + 0.300000 X_1 X_2 - 0.150000 X_1 X_3 + 0.300000 X_2 X_3 \quad (2)$$

$$DPPH \% (30min) = 60.4136 + 6.3782 X_1 - 22.7935 X_2 + 3.7569 X_3 - 8.0662 X_1^2 - 45.5443 X_2^2 - 13.5193 X_3^2 - 6.6459 X_1 X_2 - 5.8430 X_1 X_3 + 21.7333 X_2 X_3 \quad (3)$$

$$FRAP (\mu MFe^{+2}/100\mu l EO) = 1432.94 + 166.65 X_1 + 166.22 X_2 + 126.29 X_3 - 384.48 X_{12} - 1215.25 X_{22} - 322.43 X_{32} - 87.85 X_1 X_2 + 575.35 X_1 X_3 - 219.80 X_2 X_3 \quad (4)$$

## نتایج و بحث

دستیابی به R<sup>2</sup>-Adjusted R<sup>2</sup> و P-value بالا در برازش مدل‌ها، بیانگر ایده‌آل بودن مدل‌های RSM ترسیم شده می‌باشد. به عبارت دیگر، بالا بودن این پارامترها نشانگر وجود همبستگی بالای بین مقادیر مشاهده شده و مقادیر پیش‌بینی شده است (۳۰). F-value حاصل از ضرایب پاسخها (متغیرهای وابسته) نشان داد که بیشتر ضرایب خطی، درجه دوم و اثرات متقابل در سطح احتمال پنج و یک درصد معنی‌دار بودند. در واقع، نتایج تجزیه واریانس با مدل‌های پیش‌بینی شده از طریق روش سطح پاسخ نشان داد که این مدل‌ها، برای هر چهار پاسخ معنی‌دار بودند (جدول ۲-۵). بر این اساس، مدل‌های برازش شده برای هر یک از پاسخها (مقدار اسانس به صورت درصد حجمی/وزنی (معادله ۲)، درصد DPPH در ۳۰ دقیقه

بود. در مورد درصد DPPH<sub>30min</sub> تنها فاکتور زمان التراسونیک (X<sub>2</sub>) در حالت خطی و درجه دوم در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. از میان اثرات متقابل فاکتورهای مورد بررسی نیز فقط اثر متقابل X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> از نظر آماری در سطح احتمال پنج درصد بر درصد DPPH<sub>30min</sub> معنی دار شد (جدول ۲). نتایج حاصل از تجزیه واریانس بیانگر تأثیر معنی دار هر سه فاکتور X<sub>1</sub>، X<sub>2</sub>، X<sub>3</sub> و اثرات درجه دوم برای سه فاکتور X<sub>1</sub><sup>2</sup>، X<sub>2</sub><sup>2</sup>، X<sub>3</sub><sup>2</sup> در سطح احتمال یک درصد بر فعالیت آنتی اکسیدانی اندازه گیری شده به روش فرپ بود. همچنین برهمکنش فاکتور X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> در سطح احتمال پنج درصد و برهمکنش فاکتورهای X<sub>1</sub>X<sub>3</sub> و X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> در سطح احتمال یک درصد بر فعالیت آنتی اکسیدانی اندازه گیری شده به روش فرپ معنی دار بود (جدول ۲).

### اثرات متقابل متغیرهای مستقل نسبت آب به بذر، زمان التراسونیک و زمان کلونجر بر مقدار اسانس، درصد DPPH و فعالیت آنتی اکسیدانی فرپ

زمان کلونجر (X<sub>3</sub>) در سطح احتمال یک درصد بر درصد اسانس معنی دار شد. همچنین، اثرات درجه دوم فاکتورهای نسبت آب به بذر (X<sub>1</sub><sup>2</sup>)، زمان التراسونیک (X<sub>2</sub><sup>2</sup>) و زمان کلونجر (X<sub>3</sub><sup>2</sup>) بر درصد اسانس در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود (جدول ۲). این نتایج بیانگر وجود رابطه خطی بین فاکتور زمان استخراج و افزایش درصد اسانس است. با وجود اینکه رابطه درجه دوم هر سه فاکتور X<sub>1</sub>، X<sub>2</sub> و X<sub>3</sub> روی درصد اسانس موثر بودند ولی اثر متقابل فاکتورهای مورد بررسی از نظر آماری بر درصد اسانس معنی دار نشد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس بیانگر تأثیر معنی دار زمان التراسونیک (X<sub>2</sub>) در سطح احتمال یک درصد بر درصد DPPH<sub>30min</sub>

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر متغیرهای مستقل بر درصد اسانس، ظرفیت آنتی اکسیدانی دی پی پی اچ و فرپ بذر کرفس  
Table 2-Analysis of variance (ANOVA) for the effect of independent variables on %EO, %DPPH<sub>30min</sub>, and FRAP of Celery seed

مدل Model	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of Squares	درصد اسانس Essential oil percentage (v/w)	%DPPH <sub>30min</sub>	FRAP
خطی	4	-	-	-	-
X <sub>1</sub>	1	0.011250 <sup>ns</sup>	81.364 <sup>ns</sup>	55544 <sup>**</sup>	55258 <sup>**</sup>
X <sub>2</sub>	1	0.180000 <sup>ns</sup>	1039.086 <sup>**</sup>	28.229 <sup>ns</sup>	31898 <sup>**</sup>
X <sub>3</sub>	1	1.531250 <sup>**</sup>	-	-	-
نمای دوم	4	-	-	-	-
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	0.485192 <sup>*</sup>	60.058 <sup>ns</sup>	136451 <sup>**</sup>	1363222 <sup>**</sup>
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	0.628269 <sup>*</sup>	1914.724 <sup>**</sup>	168.713 <sup>ns</sup>	95967 <sup>**</sup>
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	0.485192 <sup>*</sup>	-	-	-
برهمکنش	6	-	-	-	-
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	0.090000 <sup>ns</sup>	44.167 <sup>ns</sup>	7717 <sup>*</sup>	331022 <sup>**</sup>
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1	0.022500 <sup>ns</sup>	34.141 <sup>ns</sup>	472.335 <sup>*</sup>	48314 <sup>**</sup>
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1	0.090000 <sup>ns</sup>	0.040500	31.176	5635
خطا	5	-	-	-	-
R <sup>2</sup> -Adjusted R <sup>2</sup>		0.9472-0.8521	0.9598-0.8874	0.9972-0.9922	

ns، \* و \*\*: به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

ns، \* and \*\*: non-significant and significant at 5 and 1% probability level, respectively

بوده است (شکل ۱-۱). بررسی اثر دو عامل مستقل اول (X<sub>1</sub>) و سوم (X<sub>3</sub>) بر درصد اسانس نشان داد که با افزایش زمان استخراج اسانس با کلونجر، درصد اسانس افزایش یافت و میزان بهینه مقدار آب در بیشترین مقدار اسانس ۶۲۵ میلی لیتر بود (شکل ۱-۱). بررسی همزمان دو عامل زمان التراسونیک و زمان کلونجر بر مقدار اسانس نیز نشان داد که بیشترین مقدار اسانس با ۳ ساعت زمان کلونجر در

نمودار سه بعدی مقدار اسانس براساس متغیرهای X<sub>1</sub>-X<sub>3</sub> در شکل ۱ نشان داده شده است. در هر نمودار، اثر متقابل دو فاکتور مستقل بر روی صفت اندازه گیری شده، مشخص است. بنابراین، بیشترین مقدار هر نمودار در ارتباط با بهینه اثرات متقابل دو فاکتور مستقل بر پارامتر مربوطه می باشد. مقدار اسانس در مقدار آب ۶۲۵ میلی لیتر و ۱۸ تا ۲۰ دقیقه مدت زمان اعمال التراسونیک، بیشترین

مقادیر بالای  $R^2$  (۰/۹۴۷، ۰/۹۶ و ۰/۹۹۷ برای مدل‌های سطح پاسخ (جدل ۲) نشان داد که مدل‌ها، قادر به پیش‌بینی مناسب پاسخ متغیرها هستند.

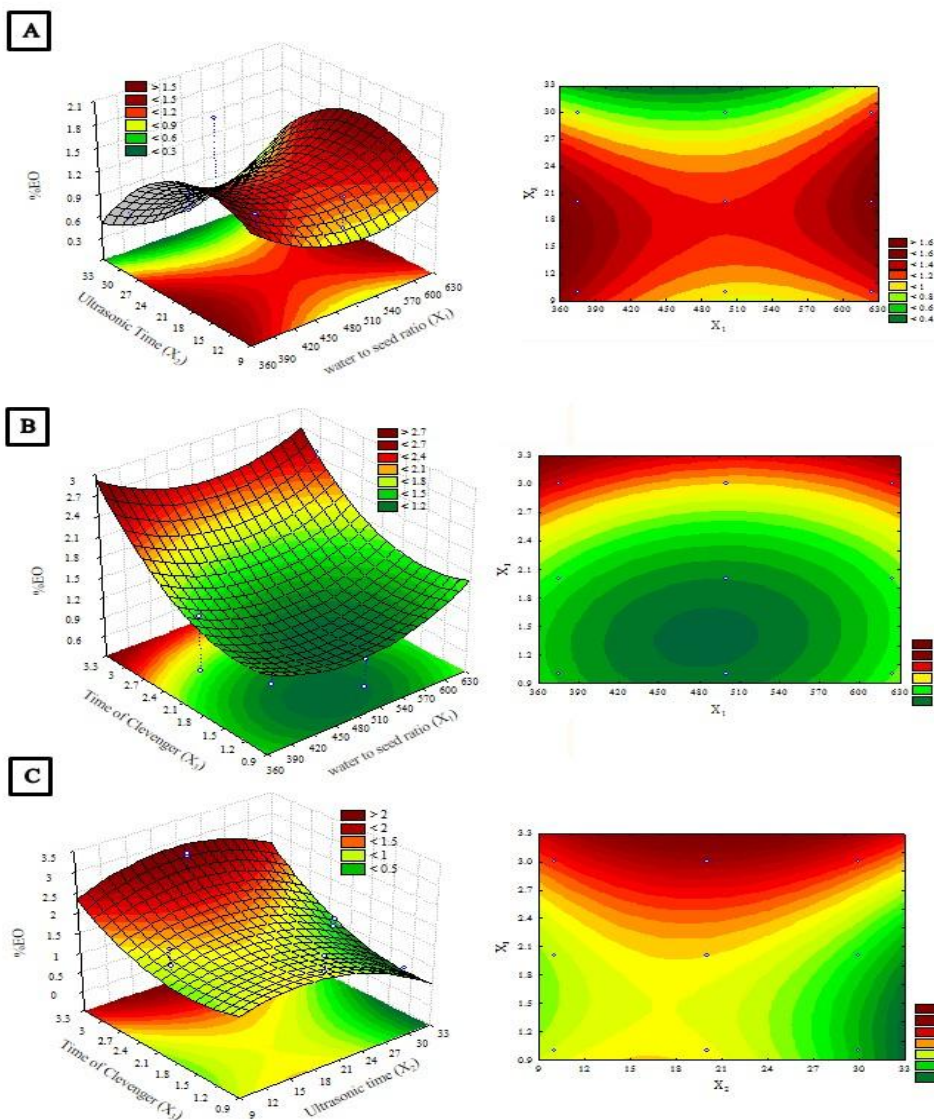
در بهینه‌سازی همزمان با ارزش مطلوبیت در اسانس کرفس، بهترین نسبت تیمارها، مربوط به نسبت ۶۲۵ میلی‌لیتر آب به ۳۵ گرم بذر، اعمال امواج التراسونیک ۲۰ دقیقه و اسانس‌گیری با کلونجر در مدت زمان ۳ ساعت بود. در توجیه افزایش نسبت آب به بذر تا یک بازه مشخص در بروز بالاترین بازده، می‌توان گفت این نتیجه ممکن است به علت ایجاد کایتاسیون، دفرمه شدن و در نتیجه افزایش پدیده انتشار اسانس از بذور به کمک امواج فراصوت بوده باشد. شایان ذکر است که افزایش مقدار آب از بازه بهینه به جز مقدار اسانس در افزایش دیگر صفات اندازه‌گیری شده، موثر نبود. در آزمایشی که بر روی باب‌آدم (*Arctium lapa L.*) انجام گرفت، استخراج اینولین با افزایش میزان حلال، افزایش یافت (۱۸). شرایط بهینه استخراج اسانس اکالیپتوس با روش تقطیر با بخار و متدولوژی سطح پاسخ، ۱۰۵ دقیقه زمان استخراج و سرعت بخار ۰/۰۳۲ کیلوگرم بر هکتار بود و بر اساس  $R^2$  بالا (۰/۹۸۴۴)، مدل‌های پیش‌بینی شده توسط روش سطح پاسخ مناسب تشخیص داده شدند. در شرایط مذکور میزان اسانس پیش‌بینی شده (۱/۸۷ درصد) توسط روش سطح پاسخ به مقدار بدست آمده (۲/۰۵ درصد) نزدیک بود (۹). اثر زمان تقطیر، دما و نسبت آب به پوست بر مقدار اسانس استخراج شده از پوست لیمو (*Citrus latifolia*) با استفاده از روش سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج، شرایط بهینه را نسبت آب به پوست ۱:۶، زمان تقطیر ۲۰ دقیقه و دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد و در این شرایط یک میلی‌لیتر اسانس از ۵۰ گرم پوست لیمو بدست آمد (۲۴). در بهینه‌سازی آنتی‌اکسیدان‌های فنولیک عصاره برگ کبر (*Capparis spinosa*)، روش سطح پاسخ بهترین ترکیب تیماری را اتانول ۴۹ درصد، دمای ۵۱/۸ درجه سانتی‌گراد و نسبت حجمی/وزنی ۵۰ حلال به ماده نشان داد (۶). ارزیابی بهینه‌سازی عصاره‌گیری با حلال تسریع‌کننده (accelerated solvent extraction) ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از رزماری (*Rosmarinus officinalis L.*) و مرزنگوش بستانی (*Origanum majorana L.*) با استفاده از روش سطح پاسخ نشان داد که غلظت‌های بهینه متانول برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی در رزماری و مرزنگوش بستانی به ترتیب ۵۶ و ۵۷ درصد بود. عملکرد فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب عصاره‌های ASE بطور قابل توجه بالاتر از عصاره‌های مایع/جامد بود و مدل‌های پیش‌بینی شده برای فنول کل و مقادیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش فرپ، با ضرایب رگرسیون بالا در دامنه ۰/۹۵۲-۰/۹۹۹، بسیار قابل توجه بود (۱۳).

۲۰ دقیقه اعمال امواج فراصوت حاصل شد (شکل ۱-C). استفاده از امواج التراسونیک ابتدا اثر محسوس ظاهر نکرد و در محدوده ۲۱-۱۸ دقیقه میزان اسانس افزایش و در بالاتر از ۲۱ دقیقه کاهش یافت. ولی، با افزایش مقدار آب و زمان استخراج با کلونجر، میزان اسانس افزایش یافت.

نمودار سه بعدی درصد DPPH<sub>30min</sub> براساس متغیرهای X1-X3 در شکل ۲ نشان داده شده است. بیشترین درصد DPPH<sub>30min</sub> تقریباً در مقدار آب بیشتر از ۵۰۰ میلی‌لیتر و ۱۵ تا ۱۸ دقیقه مدت زمان اعمال التراسونیک حاصل شد (شکل ۲-A). بررسی اثر دو عامل مستقل اول و سوم بر درصد DPPH<sub>30min</sub> نشان داد که استخراج اسانس با کلونجر در مدت زمان حدود ۲ ساعت و استفاده از میزان آب ۵۱۰ الی ۶۰۰ میلی‌لیتر، بیشترین درصد DPPH<sub>30min</sub> را داشت (شکل ۲-B). همچنین، ارزیابی اثر توأم دو عامل زمان التراسونیک و زمان کلونجر بر درصد DPPH<sub>30min</sub> نشان داد که بیشترین مقدار این صفات با اسانس‌گیری (۲ ساعت) در ۱۵ دقیقه اعمال امواج فراصوت حاصل شد (شکل ۲-C). با توجه به شکل ۲ می‌توان اظهار داشت که با افزایش مقدار آب، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده با روش درصد DPPH<sub>30min</sub> افزایش یافت. ولی، زمان التراسونیک و زمان استخراج با کلونجر در شروع، روند افزایشی تا سطوح میانی تعریف شده برای هر یک از فاکتورها ( $X_1$ ،  $X_2$ ،  $X_3$ ) از خود نشان دادند و پس از آن با کاهش روبرو بودند. در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی فرپ (شکل ۳) نیز نتایج حاکی از این بود که فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقدار آب ۵۰۰ الی ۵۷۰ میلی‌لیتر و ۲۰ دقیقه مدت زمان اعمال التراسونیک، بیشترین مقدار بود (شکل ۳-A). بررسی اثر دو عامل مستقل اول و سوم بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی فرپ نشان داد که جهت دستیابی به بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی، به اسانس‌گیری در مدت زمان ۲/۷ ساعت و مقدار آب ۵۷۰ میلی‌لیتر نیاز است (شکل ۳-B). افزون بر این، مطالعه اثر توأم دو عامل زمان التراسونیک و زمان کلونجر بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی فرپ نشان داد که بیشترین میزان این صفت با ۲/۴ ساعت اسانس‌گیری و با اعمال ۲۱ دقیقه امواج فراصوت بدست آمد (شکل ۳-C). در مورد این صفت، بیشترین مقادیر در بالاتر از سطح میانه هر فاکتور ( $X_1$ ،  $X_2$ ،  $X_3$ ) و کمتر از بیشترین سطح تعریف شده در این فاکتورها مشاهده گردید.

### بهبودسازی همزمان با ارزش مطلوبیت در اسانس کرفس

بر اساس روش RSM نسبت ۶۲۵ میلی‌لیتر آب به ۳۵ گرم بذر، اعمال امواج التراسونیک ۲۰ دقیقه و اسانس‌گیری با کلونجر در مدت زمان ۳ ساعت بهترین نسبت تیمارها بود. همچنین، تحت شرایط بهینه، میزان اسانس ۲/۳۳ درصد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس در روش درصد PPH<sub>30min</sub> ۴۸/۵۲ درصد و در روش فرپ ۱۵۱۳/۶ میکرومولار  $Fe^{+2}$  در ۵۰ میکرولیتر اسانس، بدست آمد (شکل ۴).



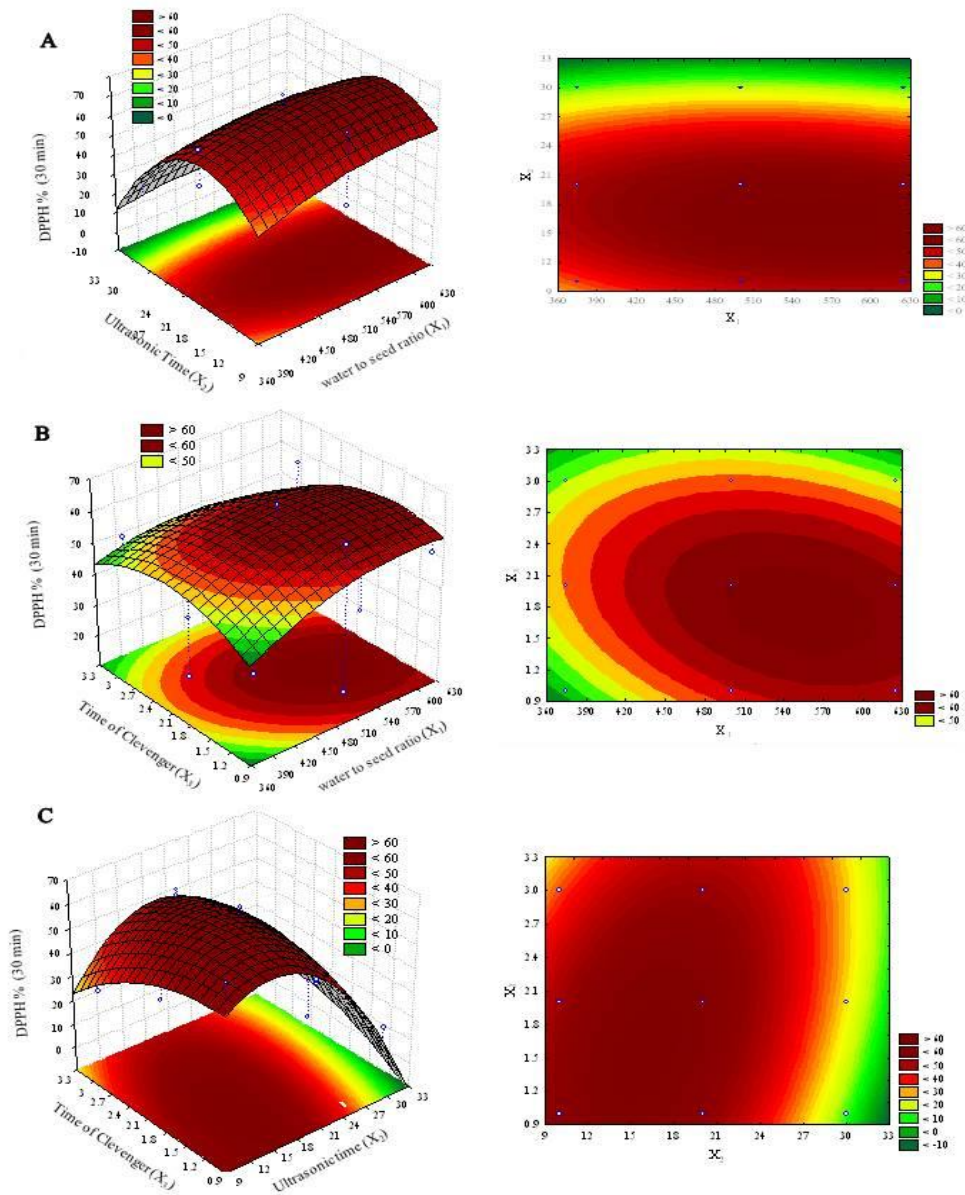
شکل ۱- اثر متقابل متغیرهای مستقل (نسبت آب به بذر ( $X_1$ )، زمان التراسونیک ( $X_2$ )، زمان کلونجر ( $X_3$ )) بر مقدار اسانس بذر کرفس  
 Figure 1- The interaction effect of independent variables (Water to seed ratio ( $X_1$ ), Ultrasonic time ( $X_2$ ), Extraction time ( $X_3$ )) on essential oil (EO) value of Celery seed

طولانی نیاز دارد، از مزایای کاربرد التراسوند این است که در دمای اتاق قابل انجام بوده و زمان استخراج اسانس را نیز کوتاه می‌کند (۲۶). در مقایسه دو روش تقطیر و امواج التراسونیک روی جداسازی ترکیبات آروماتیک سیر (*Allium sativum*) مشخص شد که بکارگیری امواج التراسونیک برای استخراج اسانس بهتر است زیرا آسیب کمتری در مولکول‌های حساس به حرارت ایجاد کرده و مواد معطر بهتر استخراج می‌شوند (۱۶). در آزمایشی، بیشترین استخراج اسانس از گیاه مریم‌گلی (*Salvia* sp.) پس از ۳۰-۲۰ دقیقه اعمال

التراسونیک به عنوان روشی جدید در استخراج اسانس به شمار می‌رود (۵). امواج التراسوند با یکسری اثرات مکانیکی، منافذ بزرگتری در بافت ایجاد کرده و باعث بهبود نفوذ حلال به آن می‌شود و در نتیجه افزایش سطح تماس فاز جامد با مایع، میزان استخراج اسانس افزایش می‌یابد. همچنین، امواج التراسوند از طریق گسستگی سلولی و شکستن بیولوژیکی دیواره سلول‌ها به آزادسازی بهتر و استخراج ترکیبات موثر در آن، منجر می‌شود. برخلاف روش تقطیر که برای اسانس‌گیری دمایی نزدیک به ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان

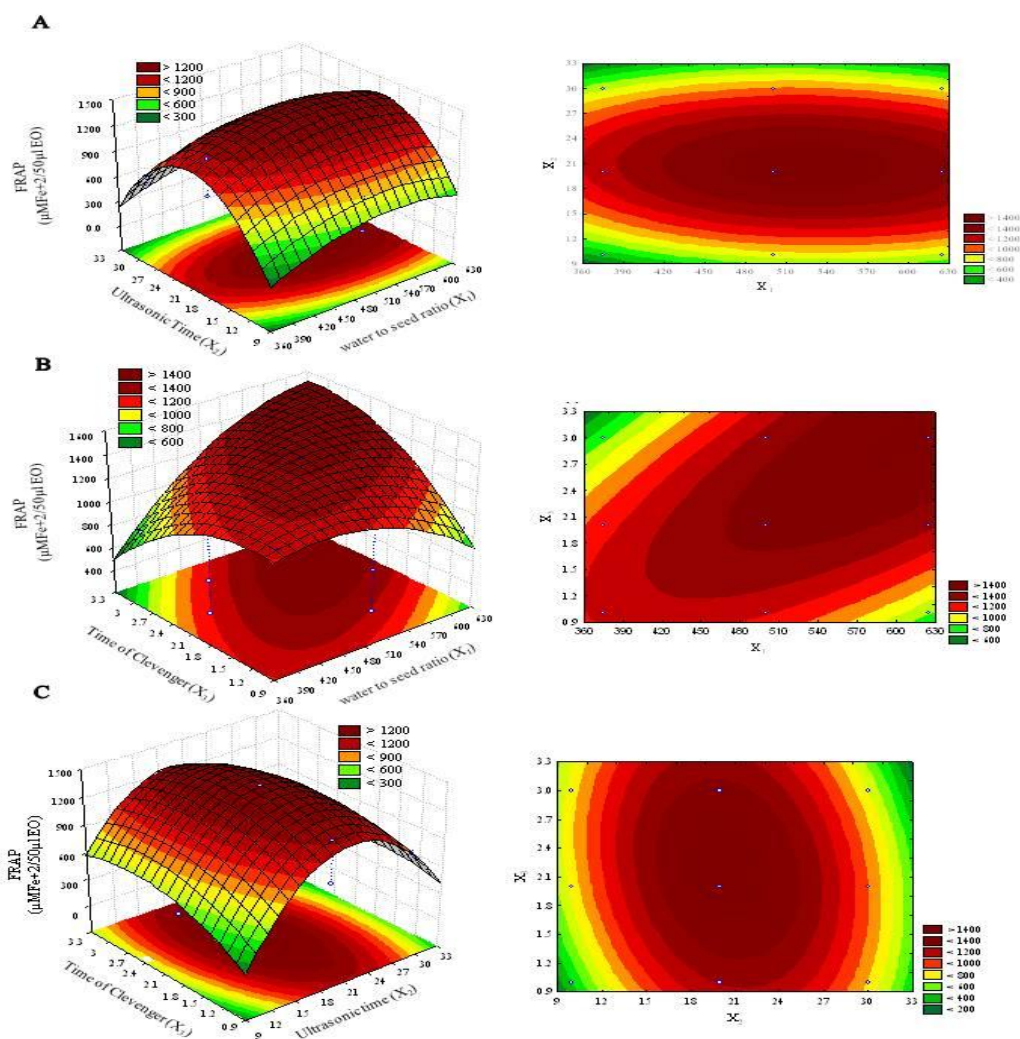
بهترین ترکیب تیماری برای دستیابی به حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی با روش TP و Frap و بالاترین مقادیر رزمارینیک اسید، لوتولین-۷-0-گلوکزید، آپیجنین-۷-0-گلوکزید، کافئیک اسید و کارنوسول، میدان نوسان سونیکیشن در  $61\mu\text{m}$  دمای  $35^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد و زمان ۱۵ دقیقه بود.

امواج سونیکیشن، حاصل شد. در مطالعه‌ای، امواج التراسوند باعث افزایش استخراج اسانس زیره سیاه (*Carum carvi L.*) گردید. به طوریکه، بذور تیمار شده با امواج التراسوند به مدت ۹۰ دقیقه، به سرعت (در طی ۳۰ دقیقه) ۸۰ درصد اسانس خود آزاد کردند (۱). همچنین، بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی عصاره از گیاه مرزنجوش بستانی (*Origanum majorana L.*) به کمک امواج التراسونیک با بکارگیری روش سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت و



شکل ۲- اثر متقابل متغیرهای مستقل (نسبت آب به بذر  $(X_1)$ ، زمان التراسونیک  $(X_2)$ ، زمان کلونجر  $(X_3)$ ) بر  $\text{DPPH}_{30\text{min}}$  بذر کرفس  
 Figure 2- The interaction effect of independent variables (Water to seed ratio  $(X_1)$ , Ultrasonic time  $(X_2)$ , Extraction time  $(X_3)$ ) on  $\text{DPPH}_{30\text{min}}$  of Celery seed  
 (DPPH; 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)





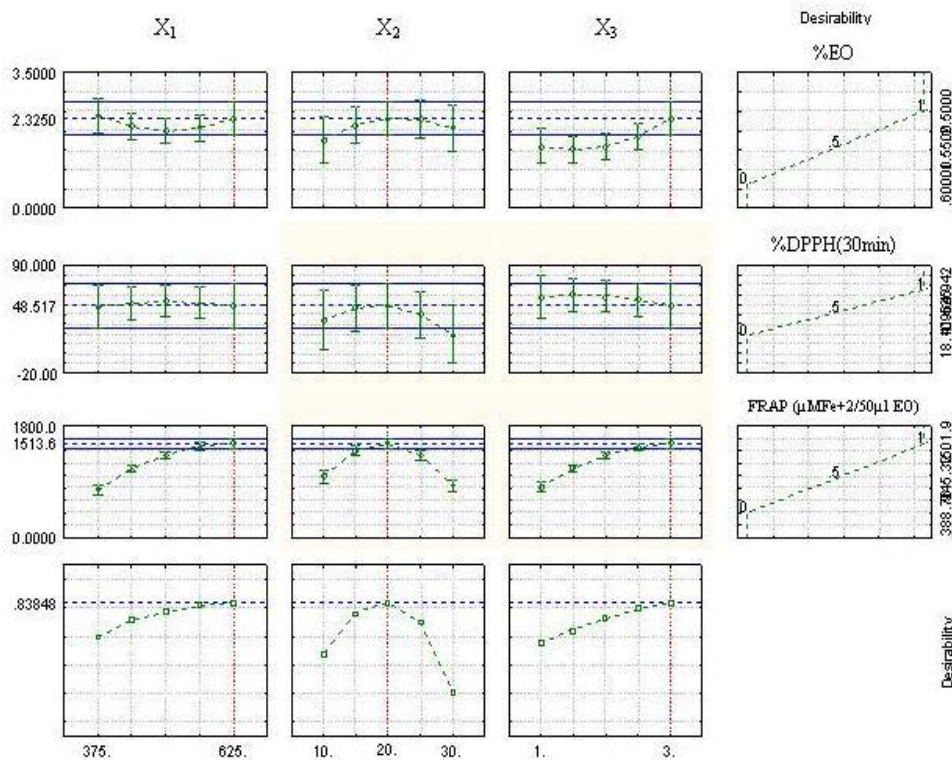
شکل ۳- اثر متقابل متغیرهای مستقل (نسبت آب به بذر ( $X_1$ )، زمان التراسونیک ( $X_2$ ، زمان کلونجر ( $X_3$ )) بر فعالیت آنتی اکسیدانی فرپ بذر کرفس

Figure 3- The interaction effect of independent variables (Water to seed ratio ( $X_1$ ), Ultrasonic time ( $X_2$ ), Extraction time ( $X_3$ )) on FRAP of Celery seed (FRAP; ferric reducing ability of plasma)

دستیابی به حداکثر عملکرد ( $64/7 \pm 0/45$  میلی گرم/گرم) و برخی ترکیبات فعال،  $63/8$  درصد متانول همراه  $1$  درصد تری فلئوئورو استیک اسید (حجمی /وزنی)، دمای  $43/2$  درجه سانتی گراد، نسبت ماده خشک به حلال  $23/8$  (وزنی /حجمی) و زمان  $40$  دقیقه بود (۳۰).

مقادیر پیش بینی شده از معادله چند جمله‌ای با مقادیر بدست آمده از این آزمایش، همخوانی داشت. عملکرد عصاره‌های بهینه حاصل از بکارگیری امواج التراسونیک به طور قابل توجه بیشتر از روش عصاره‌های مایع/جامد (solid/liquid extracts) بود. مدل‌های پیش بینی شده برای تمام صفات مناسب و دارای ضرایب رگرسیونی بالا بودند (۱۲). بهینه‌سازی استخراج آنتوسیانین‌های توت به کمک التراسونیک و روش سطح پاسخ بررسی و بهترین ترکیب تیماری برای





شکل ۴- بهینه‌سازی همزمان با ارزش مطلوبیت در اسانس بذر کرفس  
Figure 4- Profiles for predicted values and desirability of process parameters in celery seed essential oil (EO)

### نتیجه‌گیری کلی

زمان کلونجر در کرفس نشان داد که این تیمارها راندمان استخراج اسانس را تحت تأثیر قرار دادند. تیمار نسبت ۶۲۵ میلی‌لیتر آب به ۳۵ گرم بذر، اعمال امواج التراسونیک ۲۰ دقیقه و اسانس‌گیری با کلونجر در ۳ ساعت، بهترین تیمار (شرایط بهینه) بود. در شرایط بهینه، میزان اسانس، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس در روش فرپ و روش درصد DPPH<sub>30min</sub> در مقایسه با تیمار شاهد (نسبت ۶۲۵ میلی‌لیتر آب به ۳۵ گرم بذر، عدم اعمال امواج التراسونیک و اسانس‌گیری در مدت زمان ۳ ساعت) به ترتیب ۳۷/۷۶، ۲۹/۷۰ و ۳۹/۶۱ درصد افزایش داشتند. مقادیر بالای  $R^2$  برای مدل‌های سطح پاسخ نشان داد که مدل‌ها، قادر به پیش‌بینی مناسب پاسخ متغیرها هستند و این امر بیانگر این است که استفاده از روش RSM به همراه التراسونیک در بهینه‌سازی شرایط اسانس‌گیری، مناسب است.

با استناد به تحقیقات صورت گرفته، استفاده از روش‌های نوین استخراج مواد موثره (اعمال امواج التراسونیک، مایکروویو و ...) توام با روش‌های معمول (خیساندن، کلونجر و ...) میزان استخراج عصاره و اسانس از گیاه را افزایش داده و روی خواص ترکیبات استخراجی اثر متفاوتی داشته‌اند. ضمن اینکه تجزیه با روش سطح پاسخ، بهترین شرایط بررسی فاکتورهای مورد نظر با کمترین تکرار در دستیابی به ایده‌آلترین بازده را فراهم می‌کند. کاربرد همزمان یکی از روش‌های کمکی (منظور استفاده از امواج فراصوت) اسانس‌گیری و اپتیمایز کردن با استفاده از روش سطح پاسخ در نتایج تحقیق حاضر، موید این مطالب است که با اکثریت نتایج دیگر تحقیقات هماهنگی دارد. در کل، شرایط متفاوت از جمله نسبت آب به بذر، زمان التراسونیک و

### منابع

- 1- Assami K., Pingre D., Chemat S., Meklatia B.Y., and Chemat F. 2012. Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds. Chemical Engineering and Processing, 62: 99–105.
- 2- Benzie I. F., and Strain J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239: 70–76.
- 3- Bostan A., Razavi S. M. A., and Farhoosh R. 2008. Optimization of extraction process of crude hydrocolloid from wild sage seed (*Salvia macrosiphon*) and evaluation of its time-independent rheological properties. MSc thesis,

- Ferdowsi University of Mashhad, Iran. (In Persian with English abstract)
- 4- Burits M., and Bucar F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14:323–328.
  - 5- Cravotto G., Boffa L., Mantegna S., Perego P., Avogadro M., and Cintas P. 2008. Improved extraction of vegetable oils under high intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15: 202–898.
  - 6- Fattahi M., and Rahimi R. 2016. Optimization of extraction parameters of phenolic antioxidants from leaves of *Capparis spinosa* using response surface methodology. *Food Analytical Methods*, 9 (8): 2321–2334.
  - 7- Fazal S. S., and Singla R. K. 2012. Review on the Pharmacognostical and pharmacological characterization of *Apium graveolens* L. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2 (1): 36–42.
  - 8- Flock H. 2005. *Medicinal Plants*. PP: 264.
  - 9- Galadima M. S., Ahmed A. S., Olawale A. S., and Bugaje I. M. 2012. Optimization of steam distillation of essential oil of *Eucalyptus tereticornis* by response surface methodology. *Nigerian Journal of Basic and Applied Science*, 20 (4): 368–372.
  - 10- Ghafoor K., Choi Y. H., Jeon J. Y., and Jo I. H. 2009. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 57: 4988–4994.
  - 11- Hardlei T. F., Morkbak A. L., and Nexø E. 2007. Enzymatic extraction of cobalamin from monoclonal antibody captured haptocorrin and transcobalamin. *Clinical Biochemistry*, 40: 1392–1397.
  - 12- Hossain M. B., Brunton N. P., Patras A., Tiwari B., O'Donnell C. P., Martin-Diana A. B., and Barry-Ryan C. 2012. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19: 582–590.
  - 13- Hossain M. B., Barry-Ryan C., Martin-Diana A. B., and Brunton N. P. 2011. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chemistry*, 126: 339–346.
  - 14- Jabarouty A., and Ghofrani A. 2015. Introduction to response surface methodology. Fourth National Conference on Innovative Technologies Chemistry and Chemical Engineering, December 15, Iran, Tehran.
  - 15- Kaneko T., Tahara S., and Takayabashi F. 2007. Inhibitory effect of natural coumarin compounds, esculetin and esculin, on oxidative DNA damage and formation of aberrant crypt foci and tumors induced by 1, 2-dimethylhydrazine in rat colons. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30: 2052–2057.
  - 16- Kimbaris A. C., Siatis N. G., Daferera D. J., Tarantilis P. A., Pappas C. S., and Polissiou M. G. 2006. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 13: 54–60.
  - 17- Koocheki A., Mortazavi S. A., Shahidi F., Razavi S. M. A., Kadkhodae R., and Mohamadzadeh Milani J. 2010. Optimization of mucilage extraction from Qodume Shirazi seed (*Alyssum homolocarpum*) using response surface methodology. *Journal of Food Process Engineering*, 33: 861–882.
  - 18- Milani E., Hosseini F., Zaerzadeh E., Golimovahhed Q. A., and Tavakkoli A. 2012. Optimization of inulin extraction from burdock tuber by using response surface methodology (RSM). *Journal of Medicinal Plants*, 1 (41): 149–158.
  - 19- Modaresi M. 2012. A comparative analysis of the effects of garlic, elderberry, and black seed extract on the immune system in mice. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11 (4): 458–461.
  - 20- Premkumar G., Sankaranarayanan R., Jeeva S., and Rajarathinam K. 2011. Cytokinin induced shoot regeneration and flowering of *Scoparia dulcis* L. (Scrophulariaceae)—an ethnomedicinal herb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1 (3): 169–172.
  - 21- Salar Bashi D., Mortazavi S. A., Rezaei K., Rajaei A., and Karimkhani M. M. 2012. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Yarrow (*Achillea beibrestinii*) by response surface methodology, *Food Science Biotechnology*, 21 (4): 1005–1011.
  - 22- Stahl-Biskup E., and Saez, F. 2002. *Thyme the genus thymus*. NY, NJ: Taylor & Francis.
  - 23- Subhashini N., Thangathirupathi A., and Lavanya N. 2011. Antioxidant activity of *Trigonella foenum-graecum* using various *in vitro* and *ex vitro* models. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (2): 96–102.
  - 24- Tan Q. L. P., Kieu X.N.T., Kim N. H. T., and Hong X. N. T. 2012. Application of response surface methodology (RSM) in condition optimization for essential oil production from *Citrus latifolia*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24 (1): 25–30
  - 25- Tyagi S., Dhruv M., Ishita M., Gupta A.K., Usman M.R.M., Nimbiwal B., and Maheshwar R.K. 2013. Medical benefits of *Apium graveolens* (celery herb). *Journal of Drug Discovery and Therapeutics*, 1 (5): 36-38.
  - 26- Velickovic D. T., Milenovic D. M., Ristic M. S., and Veljkovic V. B. 2008. Ultrasonic extraction of waste solid residues from the *Salvia* sp. essential oil hydrodistillation. *Biochemical Engineering Journal*, 42: 97–104.
  - 27- Wang L., and Weller C. L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food*

- Science and Technology, 17: 300–312.
- 28- Wu Y., Cui S.W., Tang J., and Gu X. 2007. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds by response surface methodology. *Food Chemistry*, 105: 1599–1605.
- 29- Yang H., Li X., Tang Y., Zhang N., Chen J., and Cai B. 2009. Supercritical fluid CO<sub>2</sub> extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in Annona genus plant seeds by HPLC-DAD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49: 140–144.
- 30- Zou T. B., Wang M., Gan R. Y., and Ling W. H. 2011. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from mulberry, using response surface methodology. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 3006–3017.



## Optimization of Celery Seed Essential Oil Extraction and its Antioxidant Activity Using Response Surface Methodology and Ultrasound-Assisted

F. Salimi<sup>1\*</sup> - M. Fattahi<sup>2</sup> - J. Hamzei<sup>3</sup>

Received: 12-08-2017

Accepted: 26-02-2018

**Introduction:** Medicinal plants contain antioxidant compounds are benefits to human health and celery as a medicinal plant, is rich in antioxidant. Celery (*Apiumgraveolens* L.) seed has a lot of essential oil (EO) and this EOs has long been used for fragrance industries, spice, pharmacological and cure diseases. EO for celery seeds is 1.5-3% (v/w). Although a number of methods are applied for the acquisition of essential oils, the most frequently used method is steam distillation. Among EO extraction methods, ultrasound-assisted extraction (UAE) is an inexpensive, simple, and efficient extraction technique. This is most likely due to the intensification of mass transport and to the facilitation of solvent penetration into plant tissues which are damaged by the ultrasounds. Response surface methodology (RSM) is a powerful mathematical model with a collection of statistical techniques where in, interactions between multiple process variables can be identified with fewer experimental trials. It is widely used to examine and optimize the operational variables for experiment designing, model developing and factors and condition optimization. Antioxidants deactivate free radicals before they can damage to the bimolecular cells structure. In the present study, to find effective antioxidant constituents of EO, antioxidant activity were determined using DPPH scavenging assay and FRAP methods.

**Materials and Methods:** In this research, the effect of seed to water ratio ( $X_1$ ), ultrasonic time ( $X_2$ ), and extraction time ( $X_3$ ) on essential oil extraction (v/w) from wild celery seeds were evaluated by the following equations. Antioxidant activity of EO was measured via two methods of FRAP, and %DPPH<sub>30min</sub>.

$$\%EO \text{ (v/w)} = 1.200000 + 0.075000 X_1 - 0.300000X_2 + 0.875000X_3 + 0.725000X_1^2 - 0.825000X_2^2 + 0.725000X_3^2 + 0.300000X_1X_2 - 0.150000X_1X_3 + 0.300000X_2X_3$$

$$\%DPPH_{30min} = 60.4136 + 6.3782 X_1 - 22.7935X_2 + 3.7569X_3 - 8.0662X_1^2 - 45.5443X_2^2 - 13.5193X_3^2 - 6.6459X_1X_2 - 5.8430X_1X_3 + 21.7333X_2X_3$$

$$FRAP (\mu MFe^{+2}/50\mu l \text{ EO}) = 1432.94 + 166.65 X_1 + 166.22X_2 + 126.29X_3 - 384.48X_1^2 - 1215.25X_2^2 - 322.43X_3^2 - 87.85X_1X_2 + 575.35X_1X_3 - 219.80X_2X_3$$

For optimization of EO extraction conditions, the RSM method was used. A Box-Behnken design (BBD) with three center points was used to study the effects of three independent variables, water to seed ratio ( $X_1$ ), ultrasonic time ( $X_2$ ), and extraction time ( $X_3$ ) on three dependent responses (EO, %DPPH<sub>30min</sub>, and FRAP). The independent variables were transformed to three levels (-1, 0, 1), and the complete design consisted of 15 experimental runs with three replications of the center points. The following quadratic polynomial model was fitted to the predicted responses of EO, %DPPH<sub>30min</sub>, and FRAP with changing water to seed ratio ( $X_1 = 375, 500, \text{ and } 625 \text{ ml water to } 35\text{g seed}$ ); ultrasonic time ( $X_2 = 10, 20, \text{ and } 30 \text{ min}$ ); and extraction time ( $X_3 = 1, 2, \text{ and } 3 \text{ h}$ ) in extraction samples; Where EO, %DPPH<sub>30min</sub>, and FRAP stands ( $Y_n$ ) for the predicted responses for  $X_1 - X_3$ ;  $b_0$  is the constant coefficient;  $b_1, b_2, \text{ and } b_3$  are the linear coefficients;  $b_{11}, b_{22}, \text{ and } b_{33}$  are the quadratic coefficients; and  $b_{12}, b_{13}, \text{ and } b_{23}$  are the cross-coefficients. The accuracy of the estimated coefficient was analyzed by ANOVA method and the model accuracy was obtained using the F test at 1 and 5 % by indicating coefficient  $R^2$ .

$$Y_n = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^3 b_{ij} X_i X_j$$

**Results and Discussion:** According to the results, the best ratio of treatments (optimized condition) was 35g seed to 625 ml water ratio, ultrasonic time of 20 min, and extraction time of 3h. At this optimization conditions, the ratio of 35g seed/625 ml water, non-using ultrasonic, and extraction time of 3h was used as a control

1, 2- Former Ph.D. Student of Medicinal Plants, and Assistant Professor of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran

(\* - Corresponding Author Email: fatemesalimi18@yahoo.com)

3- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

treatment. Under optimized condition, the highest essential oil percentage (v/w) and antioxidant activity with styles of FRAP, and %DPPH<sub>30min</sub> was obtained 2.33% (v/w), 1513.6 $\mu$ MFe<sup>+2</sup>/50 $\mu$ l EO and 48.52%, respectively. However, at the control treatment, the highest essential oil percentage (v/w) and antioxidant activity with styles of FRAP, and %DPPH<sub>30min</sub> was revealed at 1.45 % (v/w), 1064 $\mu$ MFe<sup>+2</sup>/50 $\mu$ l EO and 29.30%, respectively. In the study of optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from mulberry, using response surface methodology and also, optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate seed oil were shown similarity results.

**Conclusions:** The values of adjusted R-squared (0.9972, 0.9598, 0.9472) for the equation are reasonably close to 1, indicated a high degree of correlation between the observed and predicted values. Therefore, the experimental values were agreed with those predicted by RSM models, and it suggested that using RSM method for optimization of extraction condition is suitable. Furthermore, application of ultrasonic technology increased essential oil extraction and its antioxidant activity. In addition, results indicated that the UAE method is a powerful tool for the extraction essential oil from seeds.

**Keywords:** DPPH, FRAP, Medicinal plant, Ultrasonic frequency, Volatile oil