نشریه علمی فناوری و گیاهان دارویی ایران
دوره۶- شماره ۱- پیاپند ۱۰-بهار و تابستان ۱۴۰۲

بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از برگ حنا به روش سطح پاسخ

Optimization of antioxidant component extraction from Henna (*Lawsonia Inermis*) using response surface methodology (RSM).

مسعود نجف نجفی[1*]، رسول مظفرپور [2]

۱. دانشیار، گروه صنایع غذایی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران ، (نگارنده مسئول)
۲. گروه علوم و صنایع غذایی،دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۰۱ - شناسانهٔ برنمود رقمی: 10.22092/mpt.2024.366241.1161

چکیده

نجف نجفی، م.، مظفر پور، ر.، . بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از برگ حنا به روش سطح پاسخ
نشریه علمی فناوری وگیاهان دارویی ایران، دوره ۶ - شماره ۱- پیاپند ۱۰-بهار و تابستان ۱۴۰۲ صفحه: ۵۴-۴۴

گیاه حنا (*Lawsonia inermis*)، به دلیل ترکیبات فنلی (کومارین‌ها ، فلاوونوئیدها، نفتالین و مشتقات اسید گالیک)، تری ترپنوئیدها، استروئیدها و هیدروکربن‌های آلیفاتیک از مهمترین گیاهان دارویی محسوب می شود. بدین منظور بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولی از عصاره متانولی برگ حنا توسط روش فراصوت و مقایسه آن با روش غوطه وری انجام گرفت. آزمون‌ها بر مبنای طراحی باکس بنکن جهت ارزیابی اثر متغیرهای مستقل بر عملکرد پاسخ (راندمان استخراج ترکیبات فنولی) و همچنین پیشگویی بهترین مقدار پاسخ انجام شد. تأثیر عوامل مختلفی مانند دما (۱۰، ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی گراد)، زمان (۵، ۲۰ و ۳۰ دقیقه) و pH (۶، ۷ و ۸) بر کارایی فرایند بررسی شد. نتایج نشان داد در زمان ۳۰ دقیقه و دمای استخراج ۳۲ درجه سانتی گراد و pH=۳۳.۶، بیشترین بازده استخراج ترکیبات فنولی به میزان ۴۹،۸ درصد بدست آمد. تحت این شرایط میزان استخراج ترکیبات فنولی از عصاره بیش از ۱۵ میلی گرم بر حسب گالیک اسید به ازای یک گرم پودر اولیه و میزان شاخص IC_{50} برابر 0.48 میلی گرم در میلی لیتر بود. مقایسه بین دو روش استخراج، نشان داد که بازده استخراج ترکیبات مؤثره گیاه در روش فراصوت نسبت به روش خیساندن به مقدار ۴۹،۸ درصد بیشتر است. مقدار بازده استخراج از مقدار ۱۰،۲۸ میلی گرم بر گرم بر حسب گالیک اسید در روش غوطه وری به مقدار ۱۵،۴ در روش فراصوت افزایش یافت.

واژه های کلیدی: پلی فنول، فراصوت، روش غوطه وری ، رادیکال **DPPH**

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: Email: mnajafi.mhd@gmail.com

مقدمه

طی سال‌های اخیر توجه به یافتن ترکیبات آنتی اکسیدانی طبیعی که بتواند جایگزین آنتی اکسیدان‌های سنتزی مورد استفاده در غذاها شود، معطوف گردیده است(Kavepour et al., 2023).آنتی اکسیدان‌های موجود در برخی گیاهان نقش مهمی در جلوگیری از تغییرات نامطلوب در طعم و کیفیت غذاها دارند و خطرات ناشی از طیف گسترده ای از بیماری‌های مزمن مانند سرطان، دیابت و التهاب را کاهش می دهند(Abdi et al., 2011). از این رو در سال‌های اخیر تلاش برای شناسایی و جداسازی آنتی اکسیدان‌های جدید از منابع طبیعی مخصوصا با منشأ گیاهی افزایش یافته است. فلاونوئیدها، کومارین‌ها، کورکومینیوئیدها یا ترپن‌های جدا شده از گیاهان که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قوی و سمیت کمی هستند، از جمله این موارد بشمار می روند (Iqbal and Bhanger, 2006, 2007). درختچه حنا (*Lawsonia inermis*) ، در هند، خاور میانه (از جمله ایران) و کشورهای آفریقایی حاشیه دریای مدیترانه کشت می شود(Fadimu et al., 2020; Kaur et al., 2006). برگ‌های این گیاه علاوه بر استفاده در محصولات آرایشی ،دارای خواص آنتی اکسیدانی می باشد (Rodrigues and Pinto, 2007). مطالعات گیاهشناسی نشان داده است که برگ‌های حنا حاوی ماده ای رنگی به نام لاوسون یا هیدروکسی نفتوکینون (۱/۳-۰/۲۲)، گلیکوزیدهای فنلی متعدد و فلاونوئیدهایی مانند لوتئولین مقدار کمی آلکالوئید می‌باشند (Kavepour et al., 2023; Živković et al., 2018) جهت دستیابی به این ترکیبات، استخراج اولین مرحله اساسی را در تحقیقات گیاهان دارویی تشکیل می دهد. استخراج با حلال یک روش مناسب برای بازیافت ترکیبات حساس به حرارت ازجمله پلی فنل‌های گیاهی است. اما این روش‌ها به زمان استخراج طولانی تری نیاز داشته، بنابراین نیاز به توسعه روش‌هایی با کارایی بالا و استخراج سریع به دلیل وجود متابولیت‌های ثانویه متعدد در گیاهان ضروری است (Serna-Jiménez et al., 2023). استخراج به کمک امواج فراصوت روشی ارزان تر بوده و کاربرد آن ساده تر است. مکانیسم اصلی استخراج با امواج فراصوت به پدیده کاویتاسیون(رشد سریع و انفجار حباب‌ها درون مایع) مربوط می شود. از این رو استفاده از امواج فراصوت سرعت فرآیند استخراج را افزایش داده و مصرف حلال را کاهش می دهد (Cao et al., 2023).

Kavepour و همکاران (۲۰۲۳)، بهینه سازی استخراج آبی پودر برگ حنا را مورد بررسی قرار دادند. راندمان استخراج ۳۰,۵۹٪ تحت بهترین شرایط استخراج در ۴۰ درجه سانتیگراد، مدت زمان ۲ ساعت و نسبت وزن حلال به گیاه ۱:۱۰۰ به دست آمد. در میان ترکیبات استحصال شده در فرایند استخراج ترکیب لاوزون[1] در زمان بازداری ۱۳,۵ دقیقه شناسایی شد (Kavepour et al., 2023). Spingo و همکاران (۲۰۰۷)، اثر زمان، حلال و درجه حرارت را بر بازده و میزان ترکیبات فنولی

۱- lawsone

تفاله انگور بررسی کردند. نتایج نشان داد دمای ۴۵ درجه سانتی گراد راندمان استخراج بالاتری نسبت به دمای ۶۰ درجه سانتی گراد داشت و بعد از ۲۰ ساعت میزان ترکیبات فنولی کاهش یافت (Spigno et al., 2007). در رابطه با ترکیبات فنولی و خواص آنتی اکسیدانی برگ حنا پژوهش‌های اندکی صورت گرفته است لذا این پژوهش با هدف بهینه یابی شرایط استخراج عصاره آنتی اکسیدانی از برگ حنا به عنوان یک منبع در دسترس با استفاده از روش سطح پاسخ انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه

گیاه حنا پس از جمع آوری و جداسازی ناخالصی‌ها، در دمای اتاق و دور از نور خورشید در سالنی تاریک در دمای محیط قرار گرفت و تا خشک شدن کامل چند مرحله زیر و رو شدند. سپس برگ‌های خشک شده توسط آسیاب به ذرات بسیار ریز تبدیل و از الک با مش ۱۰۰ گذرانده و تا زمان انجام آزمون‌ها در کیسه‌های محافظ به هوا و رطوبت در فریزر با دمای ۱۸- نگهداری گردیدند (Ali et al., 2018). متانول، معرف فولین- سیوکالتو[۲] و اسید گالیک از شرکت مرک آلمان و کربنات سدیم و ۱و۱ دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH) از شرکت سیگما خریداری گردید.

استخراج عصاره با استفاده از روش خیساندن

جهت تهیه عصاره اتانولی برگ حنا از روش Ali و همکاران (2018) استفاده شد. عصاره تغلیظ شده با کمک آون تحت خلأ خشک و تا زمان انجام آزمایشات در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا بسته بندی و در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد(Ali et al., 2018).

استخراج عصاره با استفاده از روش فراصوت

به منظور استخراج عصاره از روش(۲۰۰۷) Rodrigues and Pinto استفاده شد. در فرآیند استخراج با امواج فراصوت،۱۰ گرم از پودر خشک گیاه با ۱۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد (حجمی/حجمی) مخلوط و با هدف بهینه سازی شرایط استخراج،تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند دما، زمان و pH در سطح مختلف قرار گرفت. دما با استفاده از حمام فراصوت در سطوح ۱۰، ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی گراد، زمان در سطوح ۵، ۲۰ و ۳۰ دقیقه وpH ۶، ۷ و ۸ انتخاب گردید. پس از پایان تیمار فراصوت، نمونه‌ها با کمک دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه و دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه، سانتریقوژ شد. محلول شفاف رویی در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد با استفاده از دستگاه تبخیر کننده گردان تحت خلأ تغلیظ گردید. عصاره تغلیظ شده با کمک آون تحت خلأ خشک و تا زمان انجام آزمایشات در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا بسته بندی و در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد (Rodrigues and Pinto, 2007).

اندازه گیری مقدار ترکیبات فنولی کل

میزان کل ترکیبات فنولی در عصاره حاصل از دو روش استخراج خیساندن و فراصوت، مطابق روش(2007) Rodrigues and Pinto اندازه گیری گردید (Rodrigues and Pinto,

۲ - Folin-Ciocalteu

2007. مقدار کل ترکیبات فنولی بر اساس معادله به دست آمده از منحنی استاندارد کالیبراسیون اسید گالیک بر حسب میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان شد. این آزمون با ۳ تکرار انجام گردید و میانگین آن گزارش شد .

اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی

به منظو اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی، مطابق روش Kaur و همکاران (۲۰۰۶) و همکاران عمل شد. سپس میزان جذب نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (دو پرتویی فرابنفش–مرئیShimatzu ، مدل UV-160، ساخت ژاپن) در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با رابطه (۲–۱) محاسبه گردید(Kaur et al., 2006).

رابطه ۱ = به دام اندازی رادیکال آزاد (٪)

۱۰۰ × (جذب کنترل/ (جذب نمونه – جذب کنترل)

طرح آماری

در این مطالعه به منظور بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولیک از برگ حنا، از طرح باکس بانکن برای عوامل استخراج شامل دما، زمان استخراج و pH با حدود مشخص بالا و پایین استفاده شد. این طرح شامل سه متغیر مستقل در سه سطح و سه تکرار بود. سطوح متغیر مستقل و کدهای مربوطه در جدول ۱ ذکر شده اند. برای طراحی آزمایش و آنالیز نتایج از نرم افزار دیزاین اکسپرت [۳] (نسخه ۷) استفاده گردید.

نتایج و بحث

اثر روش استخراج بر میزان ترکیبات فنولی‌کل

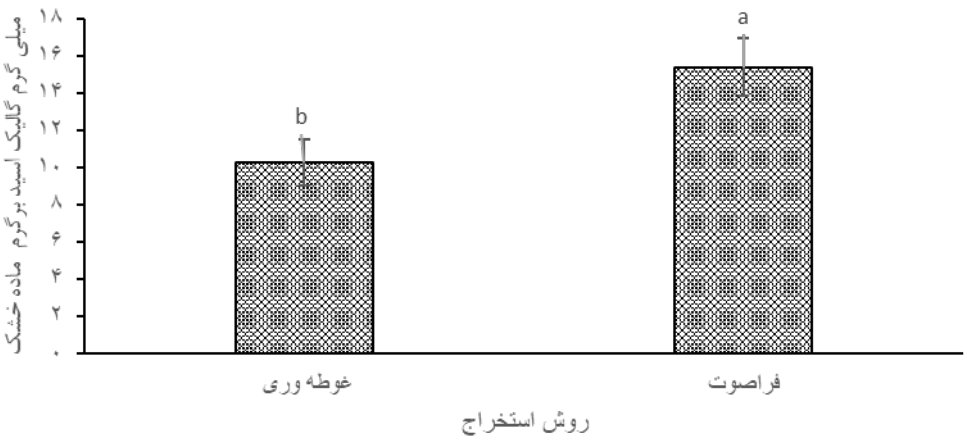
اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره‌های استخراجی با روش‌های خیساندن (ماسراسیون[۴]) و فراصوت حاکی از آن بود که روش استخراج تاثیر به سزایی بر میزان کل ترکیبات فنولی بر حسب اسید گالیک داشت ($p<0.05$). در روش فراصوت،۱/۲۲ ± ۱۵/۱۴ و در روش ماسراسیون ۱/۵۴ ± ۱۰/۲۸ میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره استخراج گردید (شکل ۱). می توان گفت تنش برشی حاصل ازکاویتاسیون امواج فرا صوت باعث ایجاد منافذ و روزنه در سلول‌ها و شکسته شدن مولکول‌های پلیمری بزرگ و در نتیجه استخراج بهتر ترکیبات فنولی نسبت به روش غرقابی گردیده است. Hamdellou و همکاران (۲۰۲۳) نیز در تحقیق مشابه‌ی بهینه سازی فرایند استخراج به کمک فراصوت ترکیبات فنلی از برگ‌های گیاه Haloxylon Scoparium و مقایسه آن با روش ماسراسیون متداول را مورد بررسی قرار دادند. این محققین اذعان نمودند که بازده استخراج به کمک روش فراصوت(۱۹۱,۸۸ mg GAE/g) بالاتر از روش استخراج معمولی(۱۰۵,۸۷ mg GAE/g) بود. تفاوت در کارایی بین دو روش به اثرات مکانیکی ناشی از پدیده کاویتاسیون در طول استخراج به کمک فراصوت نسبت داده شد. امواج صوتی تولید شده طی فراصوت دیواره‌های سلولی گیاه را شکسته و انتشار ترکیبات فنلی را تسهیل می کند و سطح تماس بین حلال و ماده گیاهی را افزایش می دهد. این پدیده باعث افزایش آزادسازی ترکیبات

۳- Design Expert

۴- Maceration

جدول ۱- متغییرهای مستقل و کدهای مربوط به آن‌ها در فرایند بهینه سازی

متغییرهای مستقل	نماد	Coded level		
		-1	0	1
زمان (دقیقه)	A	5	20	30
دما (℃)	B	10	25	40
pH	C	6	7	8

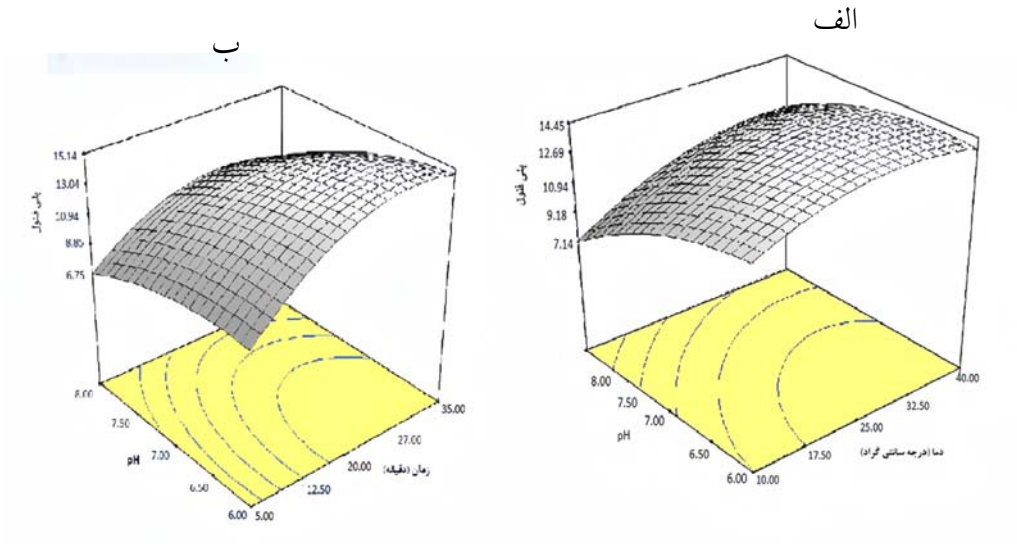


شکل ۱- مقایسه تأثیر روش استخراج بر مقدار کل ترکیبات فنولیک عصاره

فنلی از ماتریکس گیاه می شود(Hamdellou et al., 2024).

اثر فاکتورهای استخراج بر میزان کل ترکیبات فنولی

بررسی نتایج نشان داد که زمان استخراج در مقایسه با سایر فاکتورهای استخراج، تأثیر بیشتری بر مقدار استخراج پلی فنول داشت. به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که زمان و دمای استخراج اثر معنی‌داری بر راندمان استخراج داشته اند (شکل ۲). افزایش دما می‌تواند حلالیت ترکیبات فنلی را افزایش دهد، انتقال جرم و سرعت انتشار را افزایش دهد و ویسکوزیته حلال و کشش سطحی را کاهش دهد و در نتیجه قابلیت استخراج ترکیبات فنلی را افزایش دهد (Almusallam et al., 2021). روند استخراج ترکیبات فنلی در دمای حدود ۳۲ درجه سانتی گراد، با افزایش بیشتر دما کاهش خواهد یافت. این پدیده در مطالعات متعددی گزارش شده است و احتمالا در اثر تخریب و اکسیداسیون برخی پلی فنول‌های حساس به حرارت می باشد. Almusallam و همکاران (۲۰۲۱) بیان داشتند

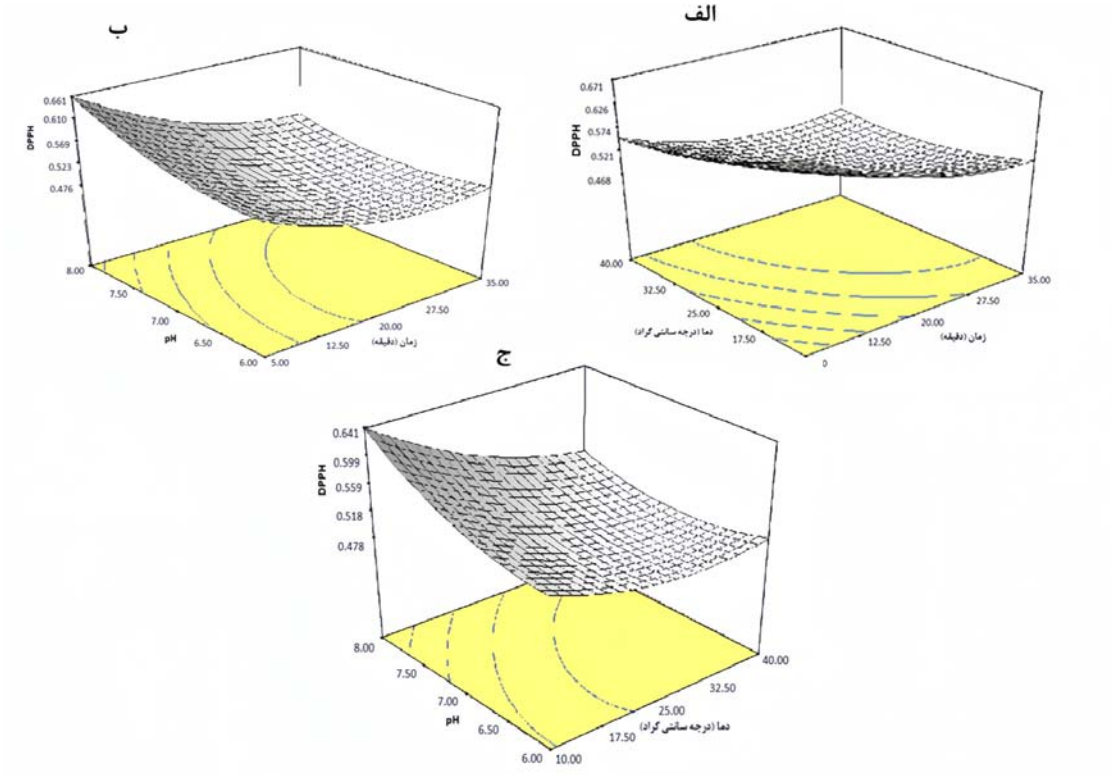


شکل ۲- اثر شرایط استخراج بر میزان پلی فنول عصاره استخراج شده از برگ حنا، الف: اثر دما و pH ب: اثر زمان و pH.

که دمای فراصوت تأثیر عمده ای بر مقادیر ترکیبات فنل کل و فعالیت مهار رادیکال DPPH عصاره گل درخت خرما داشت و حداکثر مقادیر این پاسخ‌ها در دمای فراصوت ۴۲,۵ درجه سانتیگراد به دست آمد(Almusallam et al., 2021). به طور مشابه، تحقیقات پیشین نیز تأثیر بالای دمای فراصوت را بر بازده استخراج ترکیبات فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست انار(Živković et al., 2018) ،دانه و پوست هندوانه (Fadimu et al., 2020) عصاره برگ فلفل (Shetta et al., 2019)و نیز ترکیبات فنل کل عصاره برگ آرگل (Mohamed Ahmed et al., 2020)نشان دادند. همچنین با افزایش pH خصوصا pH خنثی به بالا به دلیل این که بسیاری از ترکیبات فنولی در محدوده قلیایی ناپایدارند، این موضوع سبب کاهش این ترکیبات گردید.

اثر فاکتورهای استخراج بر IC_{50} در روش مهار رادیکال آزاد DPPH

با توجه به نتایج حاصل در شکل۳ (الف، ب و ج) با افزایش دما تا ۳۴ درجه سانتی گراد و زمان ۳۰ دقیقه مقدار شاخص IC_{50} کاهش یافت اما در دما و زمان‌های بالاتر این روند بسیار کند گردید و تقریبا ثابت شد. در بررسی اثر متقابل زمان و pH مشخص گردید با افزایش زمان تا ۳۰ دقیقه میزان IC_{50} کاهش یافت. نتایج حاصل از مطالعات سایر محققین نیز بیانگر این مطلب بود که با افزایش زمان و دما میزان شاخص IC_{50} کاهش می یابد که این به دلیل افزایش استخراج ترکیبات فنولی با افزایش دما و زمان و اثر بازدارندگی آن‌ها بر رادیکال‌های آزاد است. به طور مشابه، Latif و همکاران(2021)، گزارش دادند که طولانی شدن زمان فراصوت تا ۳۰ دقیقه منجر به افزایش تدریجی بازده ترکیبات فنلی کل و رهایش ترکیبات محلول شد. این محققین بیان داشتند که زمان طولانی فراصوت باعث گسترش تخریب دیواره سلولی می شود. علاوه بر این، افزایش زمان فراصوت با افزایش سطوح توان و افزایش دمای حلال می‌تواند



شکل ۳- اثر شرایط استخراج بر میزان IC_{50} الف: اثر دما و زمان، ب: اثر زمان و pH و ج: اثر دما و pH

جدول ۲- مقایسه میانگین IC_{50} برای عصاره برگ حنا و BHA در روش مهار رادیکال های آزاد DPPH

نمونه	IC_{50} (میلی گرم در میلی لیتر)
آنتی اکسیدان سنتزی (BHA)	۰/۳
عصاره متانولی برگ حنا	۰/۴۸

تاثیر مثبتی بر بازده استخراج داشته باشد(Latiff et al., 2021). اما با افزایش pH مخصوصا از pH خنثی به بالا به دلیل این که بسیاری از ترکیبات فنولی در این محدوده ناپایدارند، این موضوع سبب کاهش ترکیبات فنولی شده و به تبع آن شاخص IC_{50} افزایش می یابد. مقایسه شاخص IC_{50} بدست آمده در این تحقیق با مقدار گزارش شده توسط Salmanian و همکاران برای گیاه زولنگ، عدد بسیار کوچک تری را نشان می دهد که بیانگر توانایی بیشتر در مهار رادیکال‌های آزاد می باشد. همچنین فعالیت ضد رادیکالی عصاره برگ حنا قابل رقابت با آنتی اکسیدان سنتزی BHA بود (جدول ۲). ثابت شده است که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های گیاهی عمدتا وابسته به غلظت ترکیبات فنلی موجود درگیاه می باشد. Farahmandfar و Ranji (1397)، ویژگی‌های آنتی اکسیدانی عصاره گلپر را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند که افزایش غلظت عصاره تا ppm1800 سبب افزایش قدرت مهار

رادیکال آزاد DPPH به میزان ۷۴,۳۷ درصد گردید که این میزان برای آنتی اکسیدان سنتزی BHA برابر با ۸۴,۸۵ درصد بود.

بهینه سازی

بهینه سازی استخراج عصاره برگ حنا به منظور دستیابی به حداکثر بازده استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی انجام شد. نتایج نشان داد در صورتی که دمای استخراج ۳۲ درجه سانتی گراد، pH=۶/۳۱ و زمان استخراج ۲۸ دقیقه باشد، بیشترین بازده استخراج حاصل می گردد. در این شرایط میزان ترکیبات پلی فنولی ۱۵/۱۴ (میلی گرم در گرم عصاره) و شاخص $\mathbf{IC_{50}}$ برابر ۰/۴۸ (میلی گرم در میلی لیتر) خواهد بود.

نتیجه گیری

آنالیز سطح پاسخ مربوط به طرح باکس بنکن با سه متغیر مستقل شامل زمان، دمای استخراج و pH بعنوان عوامل مؤثر بر استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از برگ حنا به انجام رسید. نتایج نشان داد که روش سطح پاسخ را می توان به خوبی در ارزیابی بازده فرایند استخراج بکار برد. روش استخراج تاثیر به سزایی بر میزان کل ترکیبات فنولی بر حسب اسید گالیک داشت، به گونه ای که در روش فراصوت به دلیل اثرات مکانیکی ناشی از پدیده کاویتاسیون، شکستن دیواره سلولی و تسهیل انتشار ترکیبات فنلی صورت گرفته. و در مقایسه با روش ماسراسیون مقدار بالاتری معادل گالیک اسید در گرم عصاره استخراج گردید. زمان استخراج در مقایسه با سایر فاکتورهای استخراج، تأثیر بیشتری بر مقدار استخراج پلی فنول داشت، از طرفی افزایش دما نیز با افزایش حلالیت ترکیبات فنلی و کاهش کشش سطحی قابلیت استخراج ترکیبات فنلی را افزایش داد. هر سه عامل در فعالیت آنتی اکسیدانی نقش داشتند. افزایش زمان و دمای استخراج و میزان شاخص IC_{50} را به دلیل افزایش استخراج ترکیبات فنولی با افزایش دما و زمان و اثر بازدارندگی آن‌ها بر رادیکال‌های آزاد کاهش داد.نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر این مطلب است که که با استفاده از این روش می توان شرایط استخراج را با در نظر گرفتن عوامل مختلف پیش بینی و اصلاح نمود.

References

Abdi, K., Safarian, S., Esmaeili, N., and Ebrahimzadeh, H. 2011. Determination of some phenolic compounds in *Crocus sativus* L. corms and its antioxidant activities study. Pharmacognosy Magazine, 7(25): 74-89

Ali, A., Lim, X. Y., Chong, C. H., Mah, S. H., and Chua, B. L. 2018 . Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from Piper betle using response surface methodology. LWT, 89: 681–688.

Almusallam, I. A., Mohamed Ahmed, I. A., Babiker, E. E., Al Juhaimi, F. Y., Fadimu, G. J., Osman, M. A., Al Maiman, S. A., Ghafoor, K., and Alqah, H. A. S. 2021. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive properties from date palm (*Phoenix dactylifera* L.) spikelets using response surface methodology.LWT, 140: 110-116.

Cao, Y., Song, Z., Dong, C., Ni, W., Xin, K., Yu, Q., and Han, L. 2023. Green ultrasound-assisted natural deep eutectic solvent extraction of phenolic compounds from waste broccoli leaves: Optimization, identification, biological activity, and structural characterization. LWT, 190: 115-124.

Chan, S. W., Lee, C. Y., Yap, C. F., Wan Aida, W. M., and Ho, C. W. 2009. Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. International Food Research Journal, 16(2): 203–213.

Fadimu, G. J., Ghafoor, K., Babiker, E. E., Al-Juhaimi, F., Abdulraheem, R. A., and Adenekan, M. K. 2020. Ultrasound-assisted process for optimal recovery of phenolic compounds from watermelon (*Citrullus lanatus*) seed and peel. Journal of Food Measurement and Characterization, 14(3): 1784–1793.

Farhamandfar, R. Ranji,M. Antioxidant potential of chervil extract (*Heracleum persicum*) in soybean oil stabilization during accelerated storage conditions. Iranian Journal of Food Science and Industry, 15 (85): 87-102

Hamdellou, A., Addad, D., Kadi, K., Belattar, H., Torche, Y., Mekersi, N., Ikhlef, M.-A., and Abderazek, H. 2024. Modeling and Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Haloxylon Scoparium* Aerial Parts. Chemistry Africa, 7(2): 689–703.

Hosseini,F. Javadian,S.R, Somaieh,B. The effect of different extraction methods on the antioxidant properties of geranium leaf extract in order to increase the shelf life of Phytophage minced meat at 4 degrees Celsius. Iranian Journal of Food Science and Industry. 15 (81):189-199.

Iqbal, S., and Bhanger, M. I. 2006. Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. Journal of Food Composition and Analysis, 19(6–7), 544–551.

Iqbal, S., and Bhanger, M. I. 2007. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. Food Chemistry, 100(1): 246–254.

Kaur, G., Jabbar, Z., Athar, M., and Alam, M. S. 2006. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. Food and Chemical Toxicology, 44(7): 984–993.

Kavepour, N., Bayati, M., Rahimi, M., Aliahmadi, A., and Nejad Ebrahimi, S. 2023. Optimization of aqueous extraction of henna leaves (*Lawsonia inermis* L.) and evaluation of biological activity by HPLC-based profiling and molecular docking techniques. Chemical Engineering Research and Design, 195: 332–343.

Latiff, N. A., Ong, P. Y., Abd Rashid, S. N. A., Abdullah, L. C., Mohd Amin, N. A., and Fauzi, N. A. M. 2021. Enhancing recovery of bioactive compounds from *Cosmos caudatus* leaves via ultrasonic extraction. Scientific Reports, 11(1):172-186.

Mohamed Ahmed, I. A., Al-Juhaimi, F., Adisa, A. R., Adiamo, O. Q., Babiker, E. E., Osman, M. A., Gassem, M. A., Ghafoor, K., Alqah, H. A. S., and Elkareem, M. A. 2020. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from Argel (*Solenostemma argel* Hayne) leaves using response surface methodology (RSM). Journal of Food Science and Technology, 57(8): 3071–3080.

Rodrigues, S., and Pinto, G. A. S. 2007. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder. Journal of Food Engineering. 80(3): 869–872.

Salmanian,S., Sadeghi,M., Alami,M., And the victim, Muhammad. 2013. Evaluation of total phenolic, flavonoid, anthocyanin compounds and antibacterial and antioxidant activity of oleic fruit acetone extract. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 13(1): 53-66.

Serna-Jiménez, J. A., Torres-Valenzuela, L. S., Sanín Villarreal, A., Roldan, C., Martín, M. A., Siles, J. A., and Chica, A. F. 2023. Advanced extraction of caffeine and polyphenols from coffee pulp: Comparison of conventional and ultrasound-assisted methods. LWT, 177: 114-122.

Shetta, A., Kegere, J., and Mamdouh, W. 2019. Comparative study of encapsulated peppermint and green tea essential oils in chitosan nanoparticles: Encapsulation, thermal stability, in-vitro release, antioxidant and antibacterial activities. International Journal of Biological Macromolecules,126: 731–742.

Singh, B., Sharma, H. K., and Sarkar, B. C. 2012. Optimization of extraction of antioxidants from wheat bran (*Triticum spp*.) using response surface methodology. Journal of Food Science and Technology, 49(3): 294–308.

Spigno, G., Tramelli, L., and De Faveri, D. M. 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. Journal of Food Engineering, 81(1): 200–208.

Wissam, Z., Ghada, B., Wassim, A., and Warid, K. 2012. Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. Int J Pharm Pharm Sci, 4(3): 675–682.

Živković, J., Šavikin, K., Janković, T., Ćujić, N., and Menković, N. 2018. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from pomegranate peel using response surface methodology. Separation and Purification Technology,194: 40–47.

Optimization of antioxidant component extraction from Henna (*Lawsonia Inermis*) using response surface methodology (RSM).

Masoud Najaf Najafi[1*], Rassoul Mozafarpour [2]

1. Associate professor, Khorasan Razavi Agricultural and Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran. . (Corresponding author)
2. Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: July 2024 Accepted: September 2024 - DOI: 10.22092/mpt.2024.366241.1161

Abstract

Najaf Najafi, M., Mozafarpour, R., Optimization of antioxidant component extraction from Henna (Lawsonia Inermis) using response surface methodology (RSM).
Iranian Medicinal Plants and Technology, Vol 6, No. 1, 2023 7-8: 44-54(in Persian)

Abstract

The Henna plant (*Lawsonia inermis*) is considered one of the most important medicinal plants due to its high concentration of phenolic chemicals (such as coumarins, flavonoids, naphthalene, and gallic acid derivatives), triterpenoids, steroids, and aliphatic hydrocarbons. To optimize the extraction of phenolic compounds from the methanol extract of Henna leaves, an ultrasonic method was employed and compared with the immersion method. The experiments were conducted using a Box-Behnken design to assess the impact of independent variables on response performance (i.e., the extraction efficiency of phenolic compounds) and to predict the optimal response value. The impact of various factors, including temperature (10, 25, and 40 °C), time (5, 20, and 30 minutes), and pH (6, 7, and 8), on the process efficiency was examined. The findings indicated that the highest extraction efficiency of phenolic compounds, reaching 49.8%, was achieved after 30 minutes at an extraction temperature of 32°C and pH 6.6. Under these conditions, the extraction yield of phenolic compounds was over 15 mg of

Email address of the corresponding author: Email: mnajafi.mhd@gmail.com

gallic acid per gram of the initial powder, with an IC50 value of 0.48 mg/ml. A comparison of the two extraction methods revealed that the ultrasound method achieved a 49.8% higher extraction efficiency of active plant compounds compared to the immersion method. Specifically, the extraction efficiency increased from 10.28 mg/g (in terms of gallic acid) with the immersion method to 15.4 mg/g using the ultrasonic method.

Keywords: DPPH radical, Immersion method, Polyphenol, Ultrasound.