

تحديد شروط استخلاص المركبات الفينولية من نبات الميرمية *Salvia officinalis* باستخدام مبدأ سطوح الاستجابة

د. رامز محمد*

سماهر صقور**

(تاريخ الإيداع 14 / 12 / 2020. قبل للنشر في 6 / 7 / 2021)

□ ملخص □

جمعت عينات ورقية من نبات الميرمية *Salvia officinalis* L. في آذار 2020 من منطقة البهلوية في محافظة اللاذقية، وذلك بهدف تحديد الشروط المثلى لاستخلاص المركبات الفينولية منها بالاعتماد على مبدأ سطوح الاستجابة، وقد تمّ استخدام التصميم المركب المركزي للتحقق من تأثير ثلاث متغيرات مستقلة هي تركيز المذيب ودرجة حرارة الاستخلاص وزمن الاستخلاص في عامل الاستجابة، وهو كمية المركبات الفينولية المستخلصة. اختبرت القيم الفعلية بناءً على نتائج التجارب الأولية واختبرت المتغيرات المستقلة على ثلاث مستويات. تمّ توقع نتائج الاستجابة من خلال استخدام نموذج متعدد حدود من الدرجة الثانية.

كانت القيمة المتوقعة لكمية الفينولات ضمن الشروط المثلى (تركيز الإيثانول 51.5%، درجة الحرارة 85.9 م°، الزمن 74.4 دقيقة) 2.83 مغ مكافئ حمض غاليك / غ وزن جاف، تمّ استخلاص المركبات الفينولية تحت الشروط المثالية المتوقعة للتحقق من صلاحية النموذج وكانت النتائج 0.02 ± 2.91 مغ مكافئ حمض غاليك / غ وزن جاف، يدل التقارب الكبير بين قيمتي الفينولات المتوقعة والتجريبية على ملاءمة النموذج ونجاح مبدأ سطوح الاستجابة في تحديد الشروط المثلى للاستخلاص، وقد أظهر تحليل الانحدار أن 95-97% من الانحرافات قد فسرت من خلال النموذج.

الكلمات المفتاحية : الميرمية، منهجية سطوح الاستجابة، استخلاص، المركبات الفينولية.

* أستاذ ، قسم علوم الأغذية ، كلية الزراعة ، جامعة تشرين ، اللاذقية، سورية dr.gobranramz@gmail.com

** قائمة بالأعمال ، قسم علوم الأغذية ، كلية الزراعة ، جامعة تشرين ، اللاذقية، سورية.

Determining Conditions for Extraction of Phenolic Compounds From sage, *Salvia officinalis* using response surface technique

Dr. Ramez Mohammad*
Samaher Sakkour**

(Received 14 / 12 / 2020. Accepted 6 / 7 / 2021)

□ ABSTRACT □

Samples of *Salvia officinalis* L. were collected in March 2020 from Albahlulia in Lattakia. The optimal conditions for the extraction of polyphenolic compounds (pc) from *Salvia officinalis* were determined using response surface methodology (RSM). A Central Composite Design was used to investigate the effects of three independent variables, namely solvent concentration, extraction temperature and time on the response phenolic content. The independent variables were at three levels and their actual values selected on the basis of preliminary experimental results. A second-order polynomial model was used for predicting the response. Regression analysis showed that more than 95-97% of the variation was explained by the models. The optimal conditions for phenolic compounds extraction were found to be ethanol concentration of 51.5 v/v %, extraction temperature of 85.9 C°, extraction time of 74.4 min, for sage. Under the optimum conditions the corresponding predicted response value for polyphenolic compounds was 2.83 mg EGA/g dry weight. The phenolics were extracted under optimum conditions to check the validity of model, and the experimental value was 2.91±0.02 mg galic acid equivalent /g dry weight from *S.officinalis*. The good agreement between predicted and ,experimental values indicated suitability of the model employed and the success of response surface methodology in optimizing the extraction conditions.

Key words : *Salvia officinalis*, phenolic compounds , Response surface methodology , Extraction.

* Professor, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Tichreen University, Lattakia, SYRIA. (dr.gobranramz@gmail.com)

** Academic Assistant, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Tichreen University, Lattakia, SYRIA.

مقدمة

ينتمي نبات الميرمية *Salvia officinalis* L إلى الفصيلة الحلقية Lamiaceae ، وإن جنس *Salvia* يضم قرابة 600 نوع، وهو عبارة عن نبات معمر، حيث يعد شجيرة دائمة الخضرة، سيقانها خشبية، وأوراقها رمادية اللون عليها طبقة رقيقة من الزغب، وأزهارها زرقاء إلى أرجوانية، وتنمو الميرمية في المناطق الجبلية وتكثر في بلاد الشام (Alhakim, 2008).

ويتميز زيت الميرمية بخواصه القاتلة للبكتيريا المرضية والفطريات (Aziz, 2017)، إضافة إلى قدرته المضادة للأكسدة وكذلك للسرطان والملاريا، ويستعمل مغلي أوراقها وأغصانها في معالجة الإسهال، إضافة إلى مقدرتها في ضبط هرمونات الجسم وتسكين الألم (Eidi *et al*, 2005)، وقد عرف من المركبات الأساسية لزيت الميرمية السينول Cineol، الميرسين Myrcene، بيتا باينين β -Pinene، الثوجون Thujun، الكامفور Camphor، الكاروفيللين Caryophyllene، البورنيول Borneol، الفابانين α -Pinene (Alizadeh & Shabaani, 2012). يعتبر العديد من النباتات التابعة للفصيلة الشفوية ذا محتوى عالي من المركبات الفينولية، كما أنّ المركبات الفينولية عبارة عن ناتج استقلاب ثانوي يتواجد في كل النباتات بشكل طبيعي، كما أنها تملك خصائص بيولوجية كمضادات أكسدة إضافة إلى دورها في الحماية من أمراض القلب والسرطان (Glucin, 2005).

إنّ أهم المركبات الفينولية المتواجدة في الميرمية هي الأحماض الفينولية، الفلافونويدات، ديتيربينينول، حمض الكافيك الحر، الفلافونات، لينتولين7 غلوكوسيد (Alizadeh *et al*, 2010; Lu & Yeap FOO, 2001).

هناك العديد من العوامل التي تؤثر على كفاءة عملية الاستخلاص أهمها نوع المذيب المستخدم، زمن الاستخلاص، درجة الحرارة المستخدمة (Alothman *et al*, 2009)، وهنا لا بدّ من الإشارة إلى أن العوامل السابقة إما أن تؤثر بشكل مستقل ولكن على الأغلب يكون لها تأثير مشترك، كما أن الحصول على المركبات الفينولية من المواد الأولية يتأثر بقطبية المذيبات المستخدمة ودرجة ذوبان المركبات الفينولية فيها (Sulaiman *et al*, 2011).

تمّ استخدام عدة مذيبات في استخلاص المركبات الفينولية من الميرمية، وتضمنت هذه المذيبات الماء بواسطة جهاز كلافنجر (Alizadeh & Shabaani, 2012)، الإيثانول، الميثانول، الماء (Jasicka-Misiak *et al*, 2018)، ميثانول وماء (Martins *et al*, 2015)، وكذلك استخدام تراكيز مختلفة (30%-50%-70%) من الإيثانول والأسيتون إضافة إلى الماء (Dent *et al*, 2012)، وبعد الإيثانول من أفضل المذيبات التي تستخدم في الاستخلاص وذلك نظراً لانخفاض تكلفته بالمقارنة مع المذيبات الأخرى إضافة إلى قلة سميته بالمقارنة مع الميثانول (Cacace & Mazza, 2003)، إلا أن الميثانول أكثر كفاءة في استخلاص المركبات الفينولية مقارنة بالماء (Martins *et al*, 2015).

تعد التحليلات الإحصائية من الأدوات المهمة في حل كثير من المشاكل، عادة تتم معالجة عامل واحد في كل مرة لإيجاد أفضل الشروط حيث يتم تجاهل التأثير المشترك للعوامل المختلفة وفي هذه الحالة فإن تحديد الشروط المثلى يكون غير دقيق، ولكن الإجراءات الإحصائية تأخذ بعين الاعتبار تفاعل عدة عوامل ويعد مبدأ سطوح الاستجابة من الطرق الإحصائية المهمة وقد لاقت تطبيقاتها نجاحاً كبيراً في الهندسة الكيميائية والزراعة والطب والبيولوجيا (Montgomery, 2001).

يبحث مبدأ سطوح الاستجابة في كيفية الوصول إلى الاستجابة المثلى للمتغير (كمية الفينولات الكلية Y) ومستويات العوامل للمتغيرات المستقلة A,B,C التي تحقق هذه الاستجابة من أجل بلوغ النقطة المثلى لاستجابة المتغير. وتسمى لإيجاد المفهوم الأفضل للنظام ككل والذي يكون أدق في تحديد العلاقة بين متغير الاستجابة والمتغيرات المستقلة (Myers & Montgomery, 2002).

أهمية البحث وأهدافه

حظيت مضادات الأكسدة ومصادرها الطبيعية باهتمام بالغ في السنوات الأخيرة، إذ تعدّ هذه المركبات الموجودة بشكل طبيعي في الغذاء عوامل حماية ووقاية للجسم من مسببات الأمراض والتي تعرف بالجنور الحرة النشطة، والتي تعدّ أيضاً المسؤولة عن الفساد التأكسدي للغذاء، لذا تضاف مضادات الأكسدة للمنتج الغذائي المصنع، وقد استخدمت لهذا الغرض بشكل واسع مضادات أكسدة صناعية مثل بوتيل هيدروكسي أنيزول BHA وبوتيل هيدروكسي التولوين BHT وبروبيل غالات PG، إلا أن السلامة الصحية لهذه المركبات ما زالت موضوع نقاش عند العلماء، إذ بينت الدراسات بأن BHA مادة مسرطنة، كما تبين ارتباط BHT بحدوث نزف داخلي وخارجي عند تطبيقه بجرعات عالية على الجرذان والخنزير (Namiki, 1990). إن هذه النتائج بالإضافة لاهتمام المستهلك المستمر بالأغذية الطبيعية دعت للتوجه إلى مضادات الأكسدة ذات المصدر الطبيعي لاستخدامها كبديل عن المركبات الصناعية لحماية الغذاء أثناء عمليات الحفظ والتخزين. وإضافة لما سبق نلاحظ أن نبات الميرمية ينمو بشكل بعلي في كثير من المناطق السورية وخاصة في المناطق الساحلية والجبليّة، بالتالي التكلفة الزراعية تكون معدومة تقريباً. كما أن عملية الحصول على الزيت العطري من هذا النبات تعد بسيطة لذلك لا بدّ من إجراء دراسة لتحديد إمكانية استخدام الزيت العطري الناتج من هذا النبات كبديل عن مضادات الأكسدة الصناعية التي تتم إضافتها إلى الأغذية. إلا أنه مع تعدد طرق الاستخلاص المستخدمة يصبح من غير الممكن المقارنة فيما بينها نظراً لاختلاف الشروط المطبقة في عملية الاستخلاص، إضافة لما سبق لم يحدد الباحثون في هذا المجال الشروط المثلى للحصول على المركبات الفينولية حيث أن شروط الاستخلاص ليست محددة وذلك نظراً لاختلاف طبيعة المركبات الفينولية بين النباتات المختلفة. وتتخلص أهداف البحث في تحديد الشروط المثلى لاستخلاص أعلى كمية من الفينولات الموجودة في الزيت المستخلص من نبات الميرمية ، وتقدير كمية الفينولات الكلية الموجودة في هذا الزيت العطري.

طرائق البحث و مواد

1- مواد البحث :

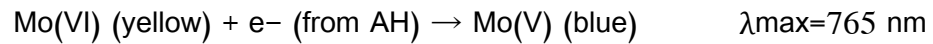
تمّ جمع 80 عينة عشوائية وزن كل منها 200 غرام من عدة مواقع في المنطقة الساحلية (محافظة اللاذقية منطقة البهلولية) من أوراق نبات *S. officinalis* خلال شهر آذار وذلك بمعدل 20 عينة في كل أسبوع (أربعة أسابيع) خلال عام 2020، أما المذيبات العضوية و كربونات الصوديوم وكاشف Folin-Ciocalteu phenol reagent من شركة Scharlau Chemie.

2 - تحضير العينات :

تمت عملية تنظيف العينات النباتية المجموعة بغية التخلص من الشوائب العالقة من نباتات مجاورة أو غبار، وتبعها عملية التجفيف لتخفيض رطوبة النبات وحمايته من الفساد وإعداده للتخزين، وهنا تتبع طريقة التجفيف الطبيعي، حيث تنتشر العينات النباتية في طبقات رقيقة على صفائح من الورق على طاوالت خشبية مرفوعة عن الأرض في مكان مظلل مع وجود مجرى من الهواء، ويراعى تقلب النباتات بشكل مستمر حرصاً على عدم تعرض الطبقات السفلية للتعفن في حال عدم تعرضها للهواء. حيث استمرت عملية التجفيف أسبوعاً تقريباً بهدف خفض نسبة الرطوبة إلى حوالي 10 % ثم حفظت العينات في أواني زجاجية معتمة حيث تم استخلاص الزيت العطري منها باستخدام المبخر الدوراني، حيث أخذ 100 غ من العينة النباتية ويضاف إليها 150 مل من المذيب المستخدم في الاستخلاص وتوضع في حوالة الاستخلاص التي توضع بدورها في حمام مائي، حيث تم ضبط درجة الحرارة في الحمام المائي وفق درجة الحرارة المطلوبة، حيث يسمح وجود مضخة التفريغ باستخدام درجات حرارة منخفضة في الاستخلاص.

3 - تحديد المحتوى الفينولي الكلي بطريقة فولين - سيوكالتو:

يتم تحديد كمية المركبات الفينولية وفقاً لطريقة فولين - سيوكالتو Folin - Ciocalteu عبر تفاعلها مع كاشف فولين - سيوكالتو الذي يتكون من مزيج حمض فوسفو تنغستنيك ($H_3PW_{12}O_{40}$; phosphotungstic acid) وحمض فوسفو موليبدينيك ($H_3PMo_{12}O_4$; phosphomolybdi acid) (Yu *et al*, 2003) والصيغة العامة لكاشف فولين - سيوكالتو هي: $3H_2O \cdot P_2O_5 \cdot 13 WO_3 \cdot 5 MoO_3 \cdot 10H_2O$. وهو محلول شديد الاصفرار وغير ثابت في الأوساط القلوية حيث يتلاشى لونه بسرعة عند قيم pH عالية ودرجات حرارة مرتفعة، كما تتفاعل الفينولات معه بشكل أسرع في الأوساط القلوية ولهذا يضاف محلول قلوي ليتم التفاعل بين العينة والكاشف (محلول فولين) عند رقم حموضة قريب من 10 لمدة ساعتين على درجة حرارة الغرفة بعيداً عن الضوء. حيث يتم التفاعل بوجود كربونات الصوديوم (pH=11.5) مما يؤمن تشتت المركبات الفينولية ويسهل تخليها عن الإلكترونات وأكسديتها بينما يرجع الكاشف بدوره نتيجة استقباله للإلكترون من المركب المعطي (المركب الفينولي) إلى مزيج من أكسيدي التنغستين والموليبدين (W_8O_{23} , Mo_8O_{23}) فيتحول لون كاشف فولين من اللون الأصفر إلى الأزرق الذي يملك امتصاصية عظمى عند طول الموجة $\lambda=765$ nm حيث تتناسب الشدة الضوئية مع تركيز المركب الفينولي.



4 - طريقة العمل:

قد تم اتباع الخطوات التالية: أولاً تحضير سلسلة عيارية من حمض الغاليك بتركيز تتراوح بين 50-500 ملغ/ل. وذلك بأخذ 20 ميكروليتر من الزيت العطري أو محاليل السلسلة العيارية ويضاف إليها 100 ميكروليتر من كاشف فولين - سيوكالتو و 1.58 ميليلتر من الماء المقطر. يُحرّك المزيج بعد ذلك جيداً ومن ثم يترك لمدة 5 دقائق ليضاف بعدها 300 ميكروليتر من محلول كربونات الصوديوم 200 غ/ل، ثم يترك المزيج في الظلام لمدة ساعتين، ويقاس بعدها الامتصاص الضوئي للمحلول الناتج باستخدام جهاز السبيكتروفوتوميتر عند طول موجة 765 نانومتر. يُرسم بعدها المنحني القياسي الذي يربط بين تركيز حمض الغاليك والامتصاصية الموافقة فنحصل على مستقيم يتم إيجاد معادلته بواسطة برنامج Excel. يحسب المحتوى الفينولي للعينات بالاستعانة بالمنحني القياسي بقيمة امتصاصية العينة حيث يتم تعويض قيمة الامتصاصية للعينة في معادلة المنحني القياسي لإيجاد تركيز المركبات الفينولية في العينة مقدرة بعدد

الميلي غرامات المكافئة من حمض الغاليك/غ من العينة الجافة حيث يتم تحضير منحى معياري بتركيز مختلفة من حمض الغاليك.

5- تحديد الشروط الملائمة للاستخلاص :

تمَّ في البداية تحديد وسط الاستخلاص في مزيج المذيب باستخدام ثلاث عوامل هي تركيز المذيب ودرجة الحرارة والزمن، وثلاث مستويات لهذه العوامل حيث تمَّ تحديد هذه المستويات من خلال تجارب أولية أجريت لاختيار المذيب الأفضل من بين الأسيتون والايثانول والميثانول بالمقارنة مع الماء. وقد تمَّ تحضير العينات واستخلاص الفينولات وتقدير المحتوى الفينولي وفقاً لطريقة الفولين سيوكالتو. ولتحديد التركيز المناسب تمَّ تطبيق تراكيز مختلفة من مزيج المذيب و الماء هي 25، 50، 75، 100% مقارنة بالماء على درجة حرارة 30م ولمدة ساعة. أما تحديد درجة حرارة الاستخلاص الأفضل فقد استخدمت ثمان درجات حرارة هي 30، 40، 50، 60، 70، 80، 90، 100 م°، وتمَّ تحديد زمن الاستخلاص الأفضل من بين خمسة أزمنة مختلفة هي 15، 30، 45، 60، 75 دقيقة.

6- تصميم التجربة Experimental design :

بعد إجراء التجارب الأولية استخدمت أفضل القيم الناتجة من أجل تحديد أفضل شروط الاستخلاص باستخدام التصميم المركب المركزي Central Composite Design الذي يتضمن إجراء 20 تجربة تتوزع العوامل فيها بشكل عشوائي من خلال ثلاث مكررات للنقط التجريبية، إنَّ المتغيرات المدروسة هي: العامل الأول تركيز المذيب (A =%, v/v, water/ethanol) العامل الثاني درجة حرارة الاستخلاص (B=C°) العامل الثالث زمن الاستخلاص (C=min) بينما عامل الاستجابة كان كمية الفينولات الكلية حيث تمَّ التعبير عن القيم بـ mg EGA/ g dry weight.

7- تحليل البيانات Data analysis :

تم استخدام تحليل الانحدار لسطوح الاستجابة برمجيات (Stat Ease, USA) design expert ver. 9. لتحويل بيانات التجربة حيث وافقت بيانات التجربة نموذج متعدد حدود من الدرجة الثانية و المعادلة العامة هي كالتالي:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j,$$

حيث أن Y هي متحول التابع الاستجابة بينما $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$ عبارة عن ثوابت يراد تقديرها، X_i, X_j هي متحولات مستقلة. تستخدم برمجيات design expert لخلق سطوح استجابة والمخططات بينما تحمل ثوابت المتغيرات في نموذج متعدد الحدود من الدرجة الثانية. إنَّ مدى ملائمة معادلة النموذج من الدرجة الثانية تظهر من خلال تحديد معامل التحديد R^2 واختبار نقص المطابقة من خلال الفحص باختبار F.

7-1- معامل التحديد: وهو يمثل مربع معامل الارتباط وكلما كانت قيمة R^2 قريبة من الواحد كلما ازداد تطابق البيانات بين النتائج الفعلية والقيم المحسوبة من خلال النموذج.

7-2- اختبار نقص المطابقة Lack of fit: من الأخطاء الشائعة اعتماد نتيجة جدول تحليل التباين للانحدار بدون معالجة مربعات الخطأ الكلي و تأثيره في قيمة اختبار F، الأمر الذي يترتب عليه اعتماد نتائج مضللة، علماً أن القيم الكبيرة لمعامل التحديد لا تؤكد أن البيانات قد تمَّ مطابقتها للنموذج بصورة جيدة. ويتمَّ حسابه على الشكل التالي:

$$1- \text{مجموع مربعات أخطاء النموذج } SS(p.e)$$

$$2- \text{مجموع مربعات نقص المطابقة } SS(L.O.F) = SS_e - SS(p.e)$$

أما احتساب اختبار نقص المطابقة فتتم عبر الصيغة التالية: $F = MS(L.O.F)/MS(p.e)$

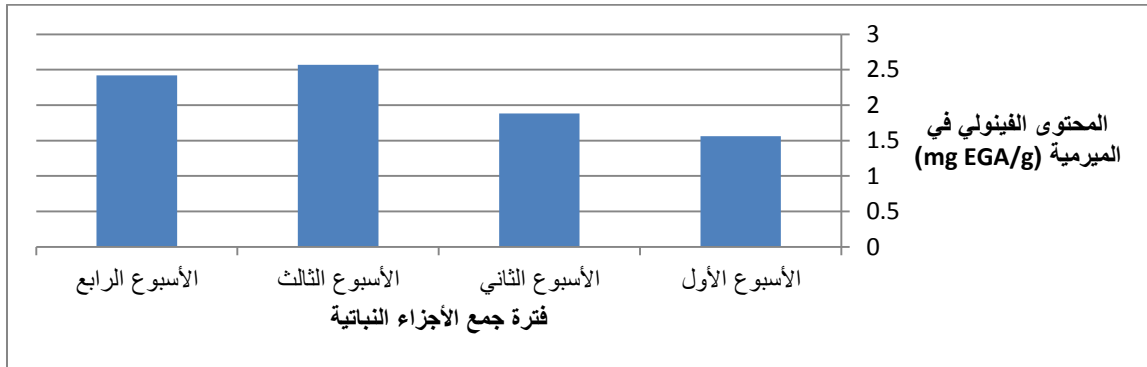
8- اختبار موثوقية النموذج:

تعتمد الظروف المثالية لاستخلاص المركبات الفينولية من الميرمية على المذيب وحرارة الاستخلاص وزمن الاستخلاص المستحصل عليها باستخدام معادلات التنبؤ من منهجية سطوح الاستجابة. تمّ تحديد المركبات الفينولية تحت الشروط المثلى للاستخلاص ثم مقارنة القيم الفعلية والنظرية لتحديد صلاحية النموذج.

النتائج و المناقشة

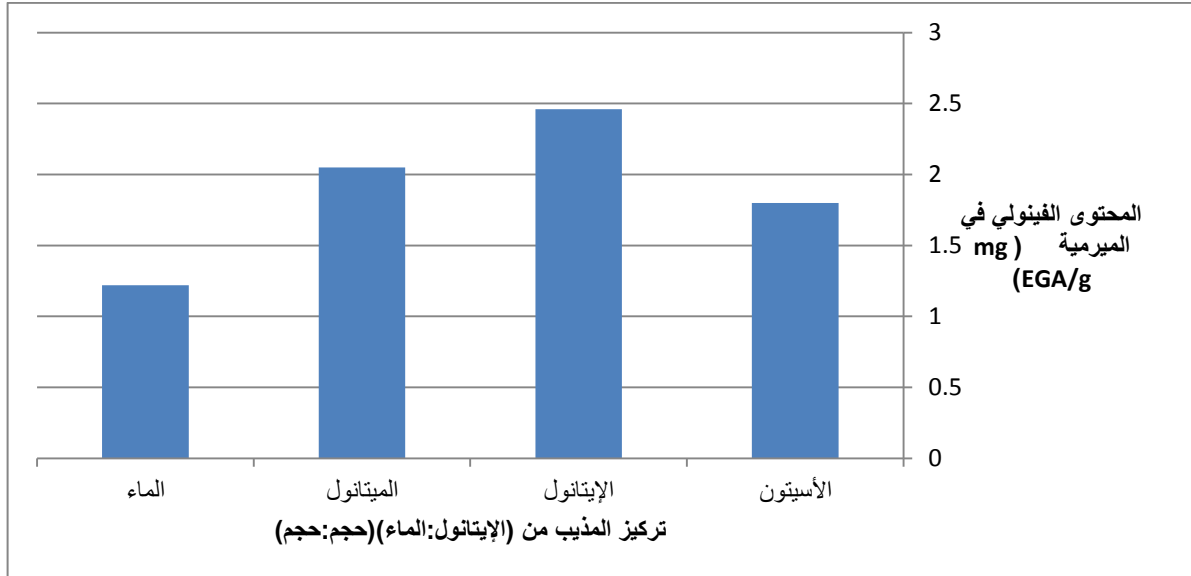
1- نتائج التجارب الأولية لاختيار مستويات القيم العليا والوسطى والدنيا للمتغيرات:

تمّ تحديد المستويات الدنيا والوسطى والعليا لتصميم المتغيرات المستقلة المستخدمة في سطوح الاستجابة بناءً على القيم الناتجة في التجارب الأولية، حيث أظهرت نتائج التجارب الأولية أنّ الأسبوع الثالث قد أعطى أفضل النتائج كفترة زمنية لجمع الأجزاء النباتية مقارنة بالأسابيع الثلاثة الأخرى (الشكل رقم 1).



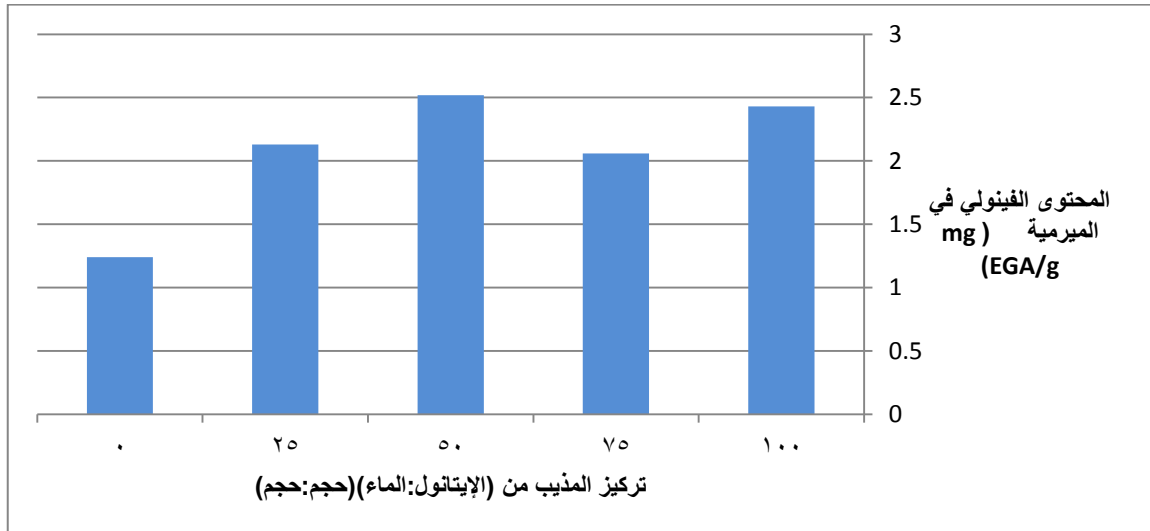
الشكل (1) المحتوى الفينولي في الميرمية عند الاستخلاص باختلاف الفترات الزمنية لجمع الأجزاء النباتية

كما أن الإيتانول أعطى أفضل نتائج كوسط لاستخلاص المركبات الفينولية في التجربة مقارنة بالمذيبات العضوية الأخرى (الأسيتون والميثانول) و الماء (الشكل رقم 2). لذلك تم تحديد المستويات الثلاثة (الماء، الميثانول، الإيتانول). وهذا يختلف مع *Dent et al* (2012) حيث أن نوع المذيب المستخدم (الإيتانول، الأسيتون، الماء) لم يكن له أثر كبير في كمية الفينولات المستخلصة بل كان لتركيز المذيب المستخدم الأثر الأكبر في كمية الفينولات الكلية.



الشكل (2) المحتوى الفينولي في نبات الميرمية عند الاستخلاص باستخدام مذيبات مختلفة

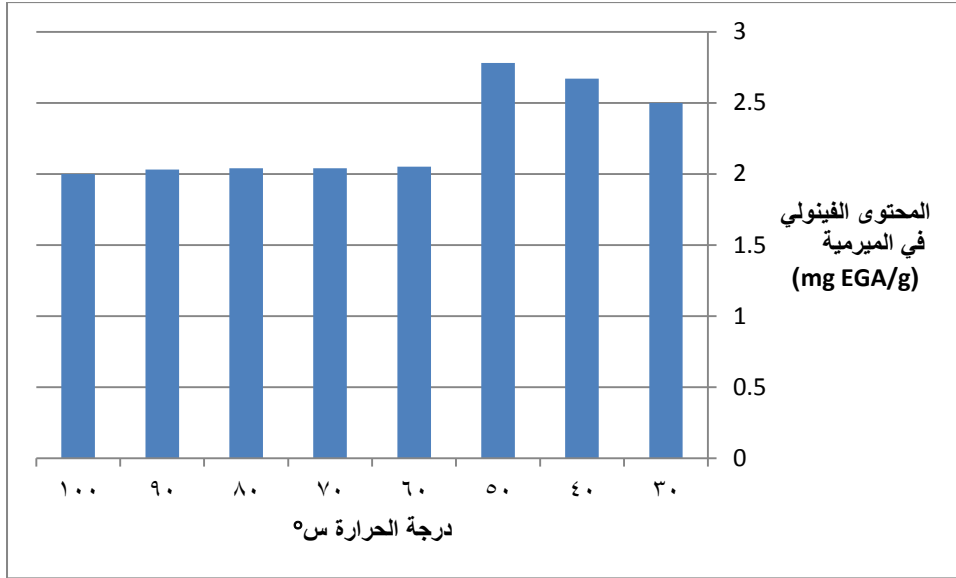
وتدل النتائج إلى أنَّ الإيثانول بتركيز قدره 50% أعطى أعلى معدل لاستخلاص المركبات الفينولية (الشكل رقم 3). وهذا يتفق مع Dent *et al* (2012)، لذلك تم تحديد المستويات (0%، 25%، 50%) حيث أعطت هذه التراكيز فروق معنوية فيما بينها. ويفسر اختلاف كمية الفينولات الكلية بنميه هذه المركبات إضافة إلى تعرضها للبلعمة.



الشكل (3) المحتوى الفينولي في نبات الميرمية عند الاستخلاص باستخدام تراكيز مختلفة من (الإيثانول:الماء)(حجم:حجم)

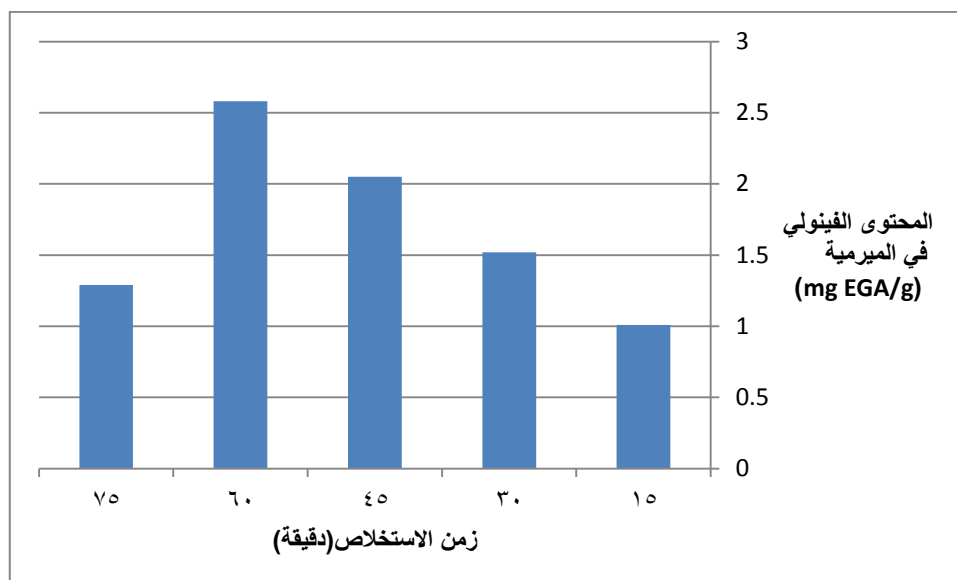
كما وقد دلت النتائج إلى ازدياد كمية الفينولات الكلية في المستخلص مع ارتفاع درجة الحرارة حتى درجة 50 م° ثم الانخفاض في كمية الفينولات (الشكل رقم 4). وهذا يعني أنَّ عملية انتقال المركبات الفعالة من المادة الأولية يحدث حتى حد معين وبعد ذلك يبدأ احتمال خسارتها بسبب تفككها في درجات الحرارة الأعلى، حيث أشارت الدراسات المرجعية بأن أعلى مستوى لاستخلاص المركبات الفينولية يكون عند درجة 63 م° حيث أنَّ درجة الحرارة الأعلى يمكن أن تستخلص مركبات فينولية معينة إلا أنها في الوقت نفسه تزيد من احتمال تخريب مركبات فينولية أخرى قد

انتقلت مسبقاً عند درجات حرارة أقل (Yu *et al*, 2003). ومما قد يفسر ذلك أيضاً هو انخفاض اللزوجة مما يسرع الاستخلاص. وهذا يتفق مع ما وجدته كل من (Yu *et al*, 2003; Dent *et al*, 2012). حيث أعطى مستخلص الميرمية أعلى استخلاص للمركبات الفينولية عند درجة 50 م° مما جعلنا نختار (100، 50، 70) م° كمستويات أقل وأوسط وأعلى.



الشكل (4) المحتوى الفينولي في نبات الميرمية عند الاستخلاص بدرجات حرارة مختلفة

كان اختيار زمن الاستخلاص الخطوة الأخيرة في سلسلة التجارب الأولية حيث تمّ استخلاص المركبات الفينولية من نبات الميرمية من خلال تفاوت زمن الاستخلاص مع استخدام الإيثانول 50% وإبقاء درجة الحرارة على 50 م°، حيث أظهرت النتائج ارتفاع في معدل الاستخلاص مع زيادة زمن الاستخلاص من 30 د إلى 45 د وما بعد 60 د قد انخفض بشدة (الشكل رقم 5). وقد يعود ذلك إلى تفكك المركبات الفعالة خلال طول فترة الاستخلاص. لذلك فإن زمن الاستخلاص يشكل عاملاً آخرًا مهمًا يؤثر على استخلاص المركبات الفينولية (Gantner *et al*, 2018) حيث أن زيادة فترة الاستخلاص قد تسبب فقد في المذيب العضوي المستخدم نتيجة التبخر، لذلك تمّ تحديد أفضل زمن للاستخلاص بـ 60 د تقريباً، لذلك تمّ اختيار الأزمنة التالية (15، 60، 45 د).



الشكل (5) المحتوى الفينولي في نبات الميرمية عند الاستخلاص خلال أزمنة مختلفة

2- تصميم النموذج:

المستويات المختلفة للمتغيرات المستقلة من تركيز مذيب ودرجة حرارة وزمن كما يظهر في الجدول (1)، حيث تم تحديد هذه القيم بناء على وجود فروق معنوية فيما بينها.

الجدول (1) المستويات المختلفة للمتغيرات المستقلة المدروسة

اسم العامل المتغير	الوحدة	الحد الأدنى	الحد الأعلى	المتوسط
A	تركيز المذيب (الإيثانول:الماء)	0	50	25
B	درجة الحرارة	100	50	75
C	الزمن	15	60	45

بعد إجراء التجارب المختلفة (20 تجربة) والحصول على البيانات التجريبية تم معالجة البيانات بواسطة البرنامج والحصول على القيم المتوقعة وفق النموذج (الجدول رقم 2).

الجدول (2) تصميم التجربة ونتائج البيانات التجريبية والقيم المتوقعة لاستخلاص المركبات الفينولية من نبات الميرمية تحت ظروف استخلاص مختلفة

المحتوى الفينولي في الميرمية (مغ مكافئ حمض غاليك / غ وزن جاف) (mg EGA/g)	البيانات التجريبية	القيم المتوقعة	الزمن (د)	درجة الحرارة (م°)	التركيز (حجم:حجم) (الإيثانول: الماء)	رقم التجربة
2.57	2.6	2.57	45	65	50	1
2.36	2.69	2.36	45	100	50	2
1.37	1.27	1.37	75	30	0	3
2.57	2.6	2.57	45	65	50	4
2.56	2.42	2.56	45	65	100	5
0.8333	1.02	0.8333	15	100	100	6
0.9192	1.1	0.9192	15	30	100	7
0.4926	0	0.4926	0	65	50	8
2.57	2.6	2.57	45	65	50	9
2.43	2.51	2.43	75	30	100	10
1.37	1.09	1.37	45	10	50	11
0.8713	0.88	0.8713	15	100	0	12
2.57	2.6	2.57	45	65	50	13
2.05	1.83	2.05	45	65	0	14
2.39	2.71	2.39	95	65	50	15
2.57	2.6	2.57	45	65	50	16
2.70	2.39	2.70	75	100	100	17
2.13	2.04	2.13	75	100	0	18
0.4622	0.86	0.4622	15	30	0	19
2.57	2.6	2.57	45	65	50	20

أظهر تحليل التباين (ANOVA) أن النموذج المختار من الدرجة الثانية يمثل البيانات التي تم الحصول عليها بشكل كافي، يظهر في الجدول (3) نتائج تحليل التباين ANOVA للمركبات الفينولية نلاحظ أن قيمة $p < 0.0001$ عند استخدام النموذج تشير إلى اختلاف الاستجابة المتوقعة عند اختلاف شروط الاستخلاص وملاءمة النموذج لتوقع

الاستجابة وذلك ضمن شروط الاستخلاص المختلفة. كما يظهر عدم معنوية اختبار نقص المطابقة مما يؤكد على مناسبة النموذج المستخدم للبيانات.

تمَّ تحديد أهمية كل معامل من خلال قيمة F في الجدول (4)، نلاحظ أن الزمن كان له الأثر الأكبر في استخلاص المركبات الفينولية $p < 0.0001$. وقد أظهر تحليل التباين ANOVA لثوابت انحدار سطوح الاستجابة المتوقعة في نموذج كثير حدود من الدرجة الثانية للمركبات فينولية لنبات الميرمية أن كلا من المؤشرات الخطية و التربيعية كانت معنوية بشكل عالي ($p < 0.001$ or $p < 0.05$) لكل المستخلصات. كما أن التأثير المشترك لتلك العوامل قد كان له أيضاً تأثير معنوي. يظهر التأثير الخطي و التربيعي للمتغيرات المستقلة بشكل ايجابي أو سلبي. إنَّ كلاً من تركيز المذيب والحرارة والزمن تساهم بشكل ملحوظ على الاستجابة و تلعب دوراً حدياً في عملية الاستخلاص. لقد تم تقييم كفاءة النموذج بواسطة معامل تحديد R^2 كما يظهر في الجدول (4) حيث نلاحظ أن قيم R^2 مرتفعة مما يشير إلى مدى ارتباط قوي ($p < 0.01$).

إضافة إلى ما سبق فإن معامل الاختلاف (CV) يشير إلى مقدار تشتت البيانات. وقد ظهر بأن معامل الاختلاف CV للمركبات الفينولية (جدول رقم 4) كان ضمن الحد المقبول (أقل من 20%).

جدول (3) تحليل التباين ANOVA للنموذج المستخدم للميرمية

p-value	F قيمة	متوسط مجموع مربعات	درجات الحرية	مجموع المربعات	مصدر التباين
< 0.0001	15.00	1.38	9	12.40	النموذج Model
		0.0918	10	0.9184	البواقي Residual
	5.47	0.1837	5	0.9184	نقص المطابقة Lack of Fit
		0.0000	5	0.0000	خطأ النموذج Pure Error
			19	13.3219	الخطأ الكلي Cor Total
0.0234	7.14	0.6554	1	0.6554	تركيز المذيب A
0.1003	3.28	0.3011	1	0.3011	درجة الحرارة B
<0.0001	67.36	6.19	1	6.19	الزمن C
0.2749	1.33	0.1225	1	0.1225	تركيز المذيب والحرارة AB
0.1884	1.99	0.1830	1	0.1830	تركيز المذيب والزمن AC
0.4268	0.6861	0.0630	1	0.0630	الحرارة والزمن BC
0.1032	3.21	0.2952	1	0.2952	تركيز المذيب A^2
0.0083	10.74	0.9859	1	0.9859	درجة الحرارة B^2
0.0004	27.31	2.51	1	2.51	الزمن C^2

جدول (4) تحليل التباين ANOVA لثوابت انحدار سطوح الاستجابة في نموذج كثير حدود من الدرجة الثانية

المحتوى الفينولي في الميرمية	ثوابت معاملات الانحدار	
2.57	β_0 Intercept	
0.2560**	تركيز المذيب A	الخطي
0.1696**	درجة الحرارة B	
0.6922**	الزمن C	
0.1237-**	تركيز المذيب والحرارة AB	المشترك التفاعلي
0.1512**	تركيز المذيب والزمن AC	
0.0888**	الحرارة والزمن BC	
0.2660-**	تركيز المذيب A^2	التربيعي
0.3790**-	درجة الحرارة B^2	
0.4623-**	الزمن C^2	
1.92±0.3030	المتوسط ± الانحراف المعياري	
0.9310	معامل التحديد R^2	
0.8690	Adjusted R^2	
0.2444	Predicted R^2	
15.78	التباين % C.V.	
10.4326	التذبذب Adeq precision	

**معنوي عند مستوى 1%

وبناء على الجدول (4) يمكن تحديد المعادلة التي تعطي الكمية الكلية للفينولات المستخلصة من نبات الميرمية

Final Equation in Terms of Actual Factors

phenolic compounds =

-1.40717

+0.015821 Solvent composition

+0.044795 temperature

+0.058768 time

-0.000071 Solvent composition * temperature

+0.000101 Solvent composition * time

+0.000085 temperature * time

-0.000106 Solvent composition ²

-0.000309 temperature²

-0.000514 time²

3- تحليل سطوح الاستجابة : Analysis of response surface

إن العلاقة بين المتغيرات المستقلة و المرتبطة موضحة في تمثيل ثلاثي الأبعاد لسطوح الاستجابة حيث يصور الشكل (6) تأثير عاملين من المتغيرات هما تركيز المذيب و درجة الحرارة على محتوى الميرمية من المركبات الفينولية، ويبرهن تأثير تركيز المذيب من الدرجة الثانية على الاستجابة حيث ترتفع المركبات الفينولية لحدود 50% تركيز مذيب عضوي في الوسط يتبعه انخفاض مع ارتفاع التركيز. كما يظهر الشكل (7) أنّ تأثير درجة حرارة من الدرجة الثانية على استخلاص المركبات الفينولية. عندما تم إبقاء الزمن على 45 دقيقة فإنّ الحرارة قد سببت ازدياد في الاستجابة (كمية الفينولات الكلية) عند مستويات منخفضة من تركيز المذيب في الوسط. كما يظهر تأثير تركيز المذيب والزمن على كمية الفينولات الكلية ، بشكل مماثل لما سبق فإن تأثير كل من العاملين من الدرجة الثانية، كذلك تبين من الشكل (8) تأثير عاملين هما الحرارة وزمن الاستخلاص حيث يزداد الاستخلاص عند زيادة الزمن حتى حد معين ثم ينخفض نتيجة تفكك المركبات الفينولية بتأثير الحرارة و طول مدة الاستخلاص.

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

phenolic compounds (mg gallic acid/100g dry)

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

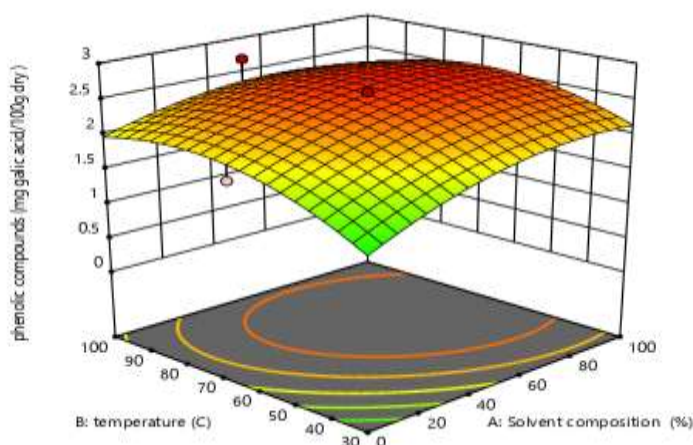
0 2.71

X1 = A: Solvent composition

X2 = B: temperature

Actual Factor


C: time = 45



الشكل (6) تأثير تركيز المذيب ودرجة الحرارة على كمية الفينولات الكلية المستخلصة من الميرمية

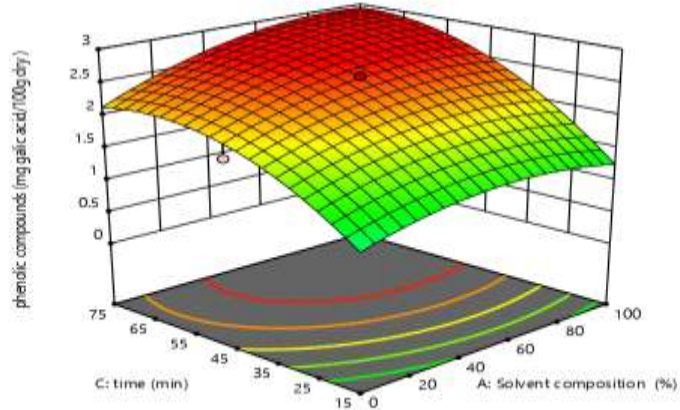
Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

phenolic compounds (mg gallic acid/100g dry)

- Design points above predicted value
 - Design points below predicted value
- 0  2.71

X1 = A: Solvent composition
X2 = C: time


Actual Factor
B: temperature = 65



الشكل(7) تأثيرتركيز المذيب و الزمن على كمية الفينولات الكلية المستخلصة من الميرمية

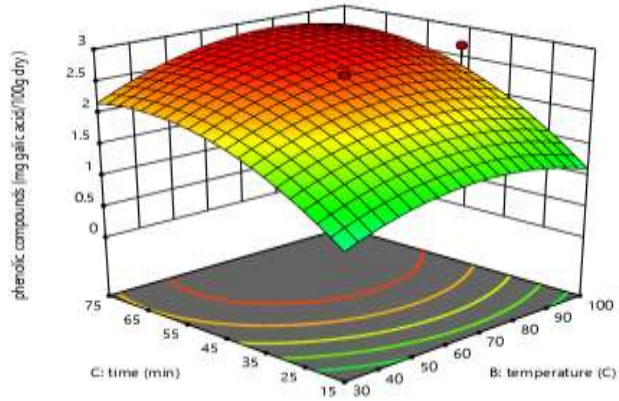
Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

phenolic compounds (mg gallic acid/100g dry)

- Design points above predicted value
- 0  2.71

X1 = B: temperature
X2 = C: time

Actual Factor
A: Solvent composition = 50



الشكل(8)تأثير درجة الحرارة والزمن على كمية الفينولات الكلية المستخلصة من الميرمية

4- تجارب الموثوقية:

يؤدي إثبات التجارب إلى تنبؤ الشروط المنتجة من تحليل القمم لمنهجية سطوح الاستجابة يظهر أن القيم التجريبية كانت إلى حد معقول قريبة من القيم المتوقعة مما يعزز صلاحية و كفاية النماذج.

الاستنتاجات و التوصيات:

ختاماً لهذا البحث وصلنا إلى الاستنتاجات التالية:

- 1- إن النموذج كثير الحدود من الدرجة الثانية يمكن أن يستعمل في الوصول إلى أفضل استخلاص ممكن للمركبات الفينولية من نبات الميرمية.
- 2- إن المحلول المائي للإيثانول هو الأكثر فعالية في استخلاص المركبات الفينولية من نبات الميرمية.
- 3- إن الشروط الأفضل لاستخلاص المركبات الفينولية من الميرمية هي:
 - أ- تركيز المذيب 51.5%.
 - ب- درجة الحرارة 85.9 س°.
 - ت- زمن الاستخلاص 74.4 دقيقة.وأخيراً نقترح استخدام سطوح الاستجابة في العديد من التطبيقات الكيميائية.

Reference

- 1- ALHAKIM,W. *Medicinal and aromatic plants*. Damascus university publications. 2008,100.
- 2- ALIZADEH, A., M. KHOSHKHUI, K. JAVIDNIA, O.R.FIRUZI, E. TAFAZOLI and A. KHALIGHI. *Effects of fertilizer on yield, essential oil composition, total phenolic content and antioxidant activity in Satureja hortensis L.(Lamiaceae) cultivated in Iran*. J. Med. Plan.Res.2010.4:33-40.
- 3- ALIZADEH,A&SHAABANI,M. *Essential oil composition, Phenolic content, Antioxidant and Antimicrobial activity in Salvia officinalis L. cultivated in Iran*. Environmental Biology6(1),2012,221-226.
- 4- ALOTHMAN, M., BHAT, R., KARIM, A.A., *Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents*. Food Chem. 115, 2009, 785–788.
- 5- AZIZ,R. *Antibacterial activity of some essential oils*. Damascus university journal. 33.2017(1):209-225.
- 6- CACACE, J. E., & MAZZA, G. *Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol*. J. Food Sci., 68, 2003, 240–248.
- 7- DENT,M;DRAGOVIC-UZELAC,V;PENIC,M;BRNCIC,M;BOSILJKOV,T;LEVAJ,B.*The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and math fraction of polyphenols in dalmatian wild sage (Salvia officinalis L.) extracts*. Food technol.biotechnol.51(1),2012,84-91.
- 8- EIDL,M;EIDL,A;ZAMANIZADEH,H. *Effect of Salvia officinalis L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats*. Journal of Ethnopharmacology 100,2005,310-313.
- 9- GANTNER,M;BRODOWSKA,M;GORSKA-HORCZYCZAK,E;WOJTASIK-KALINOWSKA,L;NAJDA,A; POGORZELSKA,E;GODZISZEWSKA,J. *Antioxidant of Sage(Salvia officinalis L.) extract on turkey meatballs packed in cold modified atmosphere*.Cyta-journal of food. 16(1),2018,628-636.
- 10- GLUCIN,I.*The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (piper nigrum) seeds*, inter.J. Food sci.nut.2005, 56:491-499.

- 11- JASICKAMISIAK,I;POLIWODA,A;PETECKA,M;BUSLOVYCH,O;SHLYAPNIKO V,V; WIECZOREK,P. *Antioxidant phenolic compounds in Salvia officinalis L. and Salvia sclarea L.* Ecol Chem Eng.25(1),2018,133-142.
- 12- LU,Y;YEAP FOO,L. *Antioxidant activities of polyphenols from sage* (*Salvia officinalis L.*). J. Food chemistry.75,2001,197-202.
- 13- MARTINS,N;BARROS,L;SANTOS-BUELGA,C;HENRIQUES,M;SILVA,S.*Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from Salvia officinalis L.* Food chemistry.170,2015,378-385.
- 14- MONTGOMERY, D. C. *Design and analysis of experiments* (5th ed.), Wiley. New York,2001,699.
- 15- MYERS, R. H., & MONTGOMERY, D. C. *Response surface methodology : Process and product optimization using designed experiments* (2nd ed.). Wiley. New York, 2002,856.
- 16- NAMIKI,M. *Antioxidant/antimuyagens in food.* Food Science Nutrition.29,1990,273-300.
- 17- SULAIMAN, S.F., SAJAK, A.A.B., SUPRIATNO, K.L.O., SEOW, E.M., *Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables.* J. Food Compos. Anal. 24, 2011, 506–515.
- 18- YU, L., PERRET, J., HARRIS, M., WILSON, J., & HALEY, S. *Antioxidant properties of bran extracts from ‘‘Akron’’ wheat grown at different locations.* J. Agric. Food Chem.51, 2003, 1566–1570.