

## تطبيق منهجية سطح الاستجابة لأمثلة استخلاص المركبات المضادة للأكسدة من الزعتر (Thymus vulgaris L.)

د. رامز محمد\*\*

م. نورا جمل\*

(الايذاع:15 تشرين الثاني 2021،القبول:15 شباط 2022)

الملخص:

تمَّ تحديد الشروط المثلى لاستخلاص المركبات المضادة للأكسدة من الزعتر باستخدام منهجية سطح الاستجابة RSM، حيث تمَّ استخدام التصميم المركب المركزي CCD للتحقق من تأثير ثلاث متغيرات مستقلة هي تركيز المذيب ودرجة حرارة الاستخلاص وزمن الاستخلاص على عامل الاستجابة وهو القدرة المضادة للأكسدة بطريقة DPPH. تمَّ اختيار القيم التجريبية بناءً على نتائج التجارب الأولية واختبرت المتغيرات المستقلة على ثلاث مستويات. تمَّ توقع نتائج الاستجابة من خلال استخدام نموذج كثير حدود من الدرجة الثانية. أظهر تحليل الانحدار أنَّ الانحرافات قد فُسرَت من خلال النموذج. كانت الشروط المثلى لاستخلاص المركبات المضادة للأكسدة هي تركيز الايتانول 59.5% (ح/ح)، درجة حرارة 58.78 م، زمن 85.58 د. تمَّ استخلاص المركبات المضادة للأكسدة وفق الظروف المثلى، وكانت القيمة التجريبية  $0.03 \pm 66.12$  مغ ترولكس/غ وزن الجاف. لقد دلَّ تطابق النتائج التجريبية مع القيم النظرية المتوقعة من خلال النموذج المستخدم على ملاءمة النموذج ونجاح منهجية سطح الاستجابة في تحديد الشروط المثلى لاستخلاص المركبات المضادة للأكسدة.

الكلمات المفتاحية : الزعتر، القدرة المضادة للأكسدة، منهجية سطح الاستجابة، طريقة DPPH.

\* قائم بالأعمال قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة تشرين.

\*\* أستاذ، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة تشرين.

## Application of Response Surface Methodology to Optimize Extraction of Antioxidant Compounds from Thyme (Thymus Vulgaris L.)

Noura Jamal\*

Dr. Ramez Mohammad\*\*

(Received:15 November 2021,Accepted:15 february 2022)

### Abstract :

The optimal conditions for extracting antioxidant compounds from thyme (Thymus vulgaris L.) were determined using response surface methodology RSM, where the central composite design CCD was used to verify the effect of three independent variables: solvent concentration, extraction temperature and extraction time on the response factor, the DPPH antioxidant capability.

Experimental values were selected based on the results of preliminary experimental and independent variables were tested at three levels. Response results were predicted through the use of second-order polynomial model.

Regression analysis showed that the variation was explained by the model. The optimal conditions for extracting antioxidant compounds were found to be ethanol concentration of 59.5%v/v, extraction temperature of 58.78°C, extraction time of 85.58min.

The antioxidant compounds were extracted under optimum conditions, and the experimental value was  $66.12 \pm 0.03$ mg Trolox /g dry weight. 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 antioxidant compounds.

**Keywords:** Thyme, antioxidant compounds, Response surface methodology, Extraction, DPPH method.

\*\*Professor, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Tishreen University.

\*Charge d'affaires, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Tishreen University.

## 1 - المقدمة

ينتمي نبات الزعتر *Thymus vulgaris* L. إلى الفصيلة الشفوية *Lamiaceae* ويعتبر من النباتات الطبية الهامة، بسبب خصائصه العلاجية حيث يتميز زيت الزعتر بخواصه القاتلة للبكتيريا المرضية والفطريات، ومقدرته على طرد الديدان الرفيعة من الأمعاء، ويستعمل مغلي النبات أو زيت العطر في علاج اللثة الملتهبة وتسوس الأسنان. وتعود خصائصه العلاجية إلى مكوناته الأساسية وهي الثايمول *thymol* والكارفافكرول *carvacrol*، كما يعدُّ الزعتر من العقاقير الفاتحة للشهية، ويفيد في علاج التهابات القناة الهضمية المزمنة، تعدُّ مستحضرات الزعتر وزيت من المقشعات والمليينات المستعملة بكثرة لعلاج الاضطرابات المعدية المعوية وأمراض القصبة الرئوية [1,2].

كما يحتوي الزعتر على مستويات عالية من مضادات الأكسدة ممَّا يجعله مصدراً محتملاً لمكونات الأغذية الوظيفية [3]، حيث يزداد الاهتمام بالفوائد الصحية التي تتضمن تقليل خطر الإصابة ببعض أنواع السرطان وأمراض الأوعية القلبية، فهناك اعتقاد بأن ازدياد استهلاك الأغذية الغنية بمضادات الأكسدة يخفف من خطر الإصابة بهذه الأمراض، إنَّ التوجه الحالي للمستهلكين باستخدام مضادات الأكسدة الطبيعية كبديل عن المركبات الصناعية شجع الباحثين على دراسة الخصائص المضادة للأكسدة والخصائص التغذوية والتركيبي الكيميائي للزعتر وفعاليتيه المضادة للأحياء الدقيقة [4, 5, 6].

لعبت مضادات الأكسدة الاصطناعية دوراً هاماً في الصناعات الغذائية مثل (بوتيل هيدروكسي أنيسول BHA ، بوتيل هيدروكسي تولوين BHT، ثلاثي بوتيل هيدروكينون TBHQ) نظراً لأدائها الجيد وارتفاع فعاليتها مقارنة بالتكلفة، وبالرغم من ذلك، تشير نتائج العديد من الدراسات إلى أنَّ الاستخدام الآمن للمواد الاصطناعية المضادة للأكسدة يمكن أن تكون في بعض الأحيان مشكوك فيها، وهذه النتائج تحرض الجهود المتواصلة التي تركز على البحث عن مضادات الأكسدة الطبيعية [6].

إضافة لما سبق فإنَّ نمو بعض النباتات الطبية مثل الزعتر بشكل بعلي في كثير من المناطق السورية وخاصة في المناطق الساحلية والجبليّة، كما أنَّ عملية الاستخلاص تعتبر بسيطة، لذلك فإنَّ أمثلة شروط الاستخلاص تعتبر ذات أهمية كبيرة. إنَّ أهم المركبات المتواجدة في الزعتر هي الثايمول بشكل رئيس بالإضافة إلى حمض الغاليك *galic acid* وحمض الروزمارينيك *rosmarinic acid* والتي تساهم في رفع القدرة المضادة للأكسدة [7].

كما تؤثر العديد من العوامل على كمية مضادات الأكسدة في النبات مثل الموقع وتركيب التربة والموسم والارتفاع عن سطح البحر [6]، بالإضافة إلى تأثير منهجية الاستخلاص المتبعة حيث تؤثر العديد من العوامل مثل تركيب المذيب، وزمن الاستخلاص، ودرجة حرارة الاستخلاص ونسبة المذيب إلى الأجزاء الصلبة والضغط على كفاءة الاستخلاص [8] وتتأثر استعادة المركبات المضادة للأكسدة من العينات المختلفة بمدى قطبية مذيبات الاستخلاص المستخدمة ومدى ذوبانها فيها [9] ، كما تتأثر كفاءة عملية الاستخلاص بعوامل أخرى أهمها الحرارة والزمن، وقد تؤثر هذه العوامل بشكل مستقل أو بشكل تفاعلي متبادل. لذلك فإنَّه من الصعوبة بمكان اختيار المذيب المناسب لاستخلاص المركبات المضادة للأكسدة لمختلف العينات، وحسب دراسة [10] وجد أنَّ القدرة المضادة للأكسدة لا تعود فقط إلى المركبات العطرية ولكن تساهم العديد من المركبات فيها.

تمَّ استخدام عدة مذيبات في استخلاص المركبات المضادة للأكسدة من الزعتر، وتضمنت هذه المذيبات الأسيتون والميتانول والماء [7]، كما استخدم [10] الماء وهكسان 10/1 (v/v)، وكذلك استخدم [10] النقع بالماء (m/v) (10/1)، أما [9] فقد استخدم ماء بدرجة حرارة الغليان، ايتانول [8]، ايتانول بواسطة سوكلست [11]، ايتانول 80% والميتانول 80% [12]، كما وجد [7] أنَّ المذيبات العضوية أكثر كفاءة من الماء في استخلاص المركبات المضادة للأكسدة.

تعتبر التحليلات الإحصائية من الأدوات المهمة في حل كثير من المشاكل وبالتالي اتخاذ القرارات المناسبة والتنبؤ بأفضل الشروط، وتعتبر منهجية سطح الاستجابة من الطرائق الإحصائية المهمة وقد لاقت تطبيقاتها نجاحاً كبيراً في الهندسة الكيميائية والزراعة والطب والبيولوجيا، حيث تبحث منهجية سطح الاستجابة في كيفية الوصول إلى الاستجابة المثلى للمتغير (Y) ومستويات العوامل للمتغيرات المستقلة A,B,C التي تحقق هذه الاستجابة، وتسعى لإيجاد المفهوم الأحسن للنظام ككل [13]، وتعتبر أكثر فعالية من الطرق الكلاسيكية وكأمثلة على استخدامها في استخلاص المركبات الفينولية من التوت [14] والزيت من الزعتر [15]، والفلافونويدات من الزعتر [16].

**أهمية البحث وأهدافه:** تتبع أهمية استخلاص وتنقية المواد الكيميائية من مصادرها الطبيعية من استخدامها في تحضير المكملات الخام ومكونات الأغذية الوظيفية والمنتجات الصيدلانية، لذلك لا بد من البحث عن أفضل الشروط للاستخلاص، كما أنّ تعدد الطرائق المستخدمة في الاستخلاص تجعل من الصعوبة بمكان المقارنة بين النتائج للنباتات في الأبحاث المخبرية المستقلة نظراً لاختلاف ظروف الاستخلاص، حيث أنّ شروط الاستخلاص ليست معممة نظراً للطبيعة المتنوعة للمركبات المضادة للأكسدة الطبيعية الموجودة في النباتات المختلفة. بناءً على ما سبق تتلخص أهداف البحث في تحديد الشروط المثلى لاستخلاص أعلى كمية من المركبات المضادة للأكسدة الموجودة في أوراق الزعتر، وتقديرها بطريقة (DPPH)، استخدام منهجية سطح الاستجابة وتحليل التباين في أمثلة عملية الاستخلاص.

## 2- مواد وطرائق البحث:

**مكان البحث:** نفذ هذا البحث في مخابر كلية الزراعة – قسم علوم الأغذية، خلال العامين 2020-2021.

### 2-1 مواد البحث:

**جمع العينات النباتية:** جمعت 20 عينة عشوائية وزن كل منها 200 غرام من من أوراق نبات الزعتر خلال شهر آذار، من عدة مواقع في المنطقة الساحلية (محافظة اللاذقية – منطقة الحفة على ارتفاع 310 م عن سطح البحر وتمتلك الإحداثيات التالية  $35^{\circ} 35' 0'' N$ ,  $36^{\circ} 2' 0'' E$ ، الطقس 20م، متوسط سرعة الرياح 10كم/ساعة).  
**المواد الكيميائية المستخدمة:** محلول DPPH (1،1-ثنائي فينيل-2-بيكريل هيدرازيل) في الميثانول 70% بتركيز 0.025 غ/ل، الترولكس (Trolox 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) وهو عبارة عن نظير صناعي لفيتامين E من شركة (Sigma Aldrich).

**2-2 تحضير العينات:** تمّ الحصول على أوراق الزعتر دون قلع الجذور حيث تمّ قطف النباتات فوق سطح التربة وفصلت الأوراق عن الأجزاء الأخرى للنبات، كما تمّ غرلبتها وتنظيفها، وتبعتها عملية التجفيف لتخفيض رطوبة الأوراق إلى الرطوبة القياسية لحمايتها من الفساد وإعدادها للتخزين، اتبعت طريقة التجفيف الطبيعي، حيث نشرت العينات النباتية في طبقات رقيقة على صفائح من الورق على طاوولات خشبية مرفوعة عن الأرض في مكان مظلل مع وجود مجرى من الهواء، وقد روعي التقلب بشكل مستمر حرصاً على عدم تعرض الطبقات السفلية للتعفن، استمرت عملية التجفيف أسبوعاً تقريباً، حيث انخفضت الرطوبة إلى ما دون 10%، ثم وضعت العينات في أوانٍ زجاجية معتمة .

**2-3 خطوات الاستخلاص:** تم اتباع خطوات [17] مع بعض التعديل، حيث تمّ مزج (10) غ من مطحون الزعتر مع 250 مل مذيب من الايثانول بالمقارنة مع الماء بعدة تراكيز لمدد زمنية مختلفة على درجات حرارة متعددة وفقاً للظروف التجريبية المختبرة. ثم تركيز المزيج بواسطة المبخر الدوار نوع BUCHI على درجة حرارة 40 م حتى الوصول إلى حجم نهائي 40 مل، التثليل بالمتقلة نوع Hettich بسرعة 3000د/د لمدة 10دقائق، وأخيراً أخذ السائل الرائق للتحليل.

**2-4 تحديد القدرة المضادة للأكسدة وفق طريقة DPPH:** يعد مركب DPPH (1,1-ثنائي فينيل-2-بيكريل هيدرازيل) جذر حر مستقر بسبب فعالية الإلكترون المفرد غير المتموضع الذي يتحرك على كامل الجزيئة، وبالتالي لا تقوم الجزيئة بالتماكب كما هو الحال بالنسبة لمعظم الجذور الحرة. كما أن عدم التموضع للإلكترون المفرد يزيد من قتامة اللون البنفسجي لمحلول DPPH والذي يمتلك امتصاصية عظمى عند  $\lambda_{max}=517$  nm. وعند مزج محلول DPPH مع مركب قادر على منح ذرة هيدروجين تتم عملية الأكسدة وبالتالي تزداد نسبة DPPH بصيغته المرجعة ويرافق ذلك بالتالي انخفاض الشدة اللونية للمحلول، ويصبح عديم اللون أو بلون أصفر فاتح.

**طريقة العمل:** تتلخص الطريقة حسب [18] بتحضير محلول DPPH 0.1mM بأخذ 19,716 mg من مركب DPPH وتحل بالقليل من الميثانول ثم يُكمل الحجم إلى 50 mL بالميثانول، يؤخذ 100  $\mu$ L من مستخلص العينة، يضاف 2 مل من محلول DPPH 0.1m mole، يترك في الظلام لمدة 30 دقيقة، تُقاس الامتصاصية عند 517 نانومتر، بجهاز سبيكتروفوتومتر (JascoV-530)

تؤخذ عينة شاهد مكونة من الميثانول ونفس الحجم من محلول الـ DPPH، تمّ التعبير عن القدرة المضادة للأكسدة بعدد مغ ترولكس /غ مادة جافة، تُعاد الخطوات السابقة بإضافة محلول DPPH إلى 100  $\mu$ L من محلول الـ Trolox بتراكيز تتراوح من (0-1500  $\mu$ g/L)، وذلك لتحضير المنحنى المعياري.

**2-5 تحديد الشروط الملائمة للاستخلاص:** تمّ تحديد وسط الاستخلاص في مزيج المذيب باستخدام ثلاث عوامل هي تركيز المذيب ودرجة الحرارة والزمن، وثلاث مستويات لهذه العوامل حيث تمّ تحديد هذه المستويات. وقد تمّ تحضير العينات واستخلاص وتقدير المركبات المضادة للأكسدة. ولتحديد التركيز المناسب تمّ تطبيق تراكيز مختلفة من مزيج المذيب الايتانول والماء هي (90%، 75%، 60%، 45%، 30%، 15%) مقارنة بالماء على درجة حرارة 30م ولمدة ساعة، على الرغم من أنّ مذيبات مثل الاسيتون والميثانول تعتبر جيدة لاستخلاص المركبات المضادة للأكسدة في النباتات إلا أنّ استخدامها قد يؤدي لوجود مستويات متبقية غير مرغوبة في المستخلص الناتج لذلك تمّ استخدام الايتانول، أما تحديد درجة حرارة الاستخلاص الأفضل فقد استخدمت درجات حرارة هي (30، 40، 50، 60، 70 م )، وتمّ تحديد زمن الاستخلاص الأفضل من بين خمسة أزمنة مختلفة هي (30، 60، 90، 120، 180 دقيقة).

**2-6 تصميم التجربة:** بعد إجراء التجارب الأولية استخدمت أفضل القيم الناتجة من أجل تحديد أفضل شروط الاستخلاص باستخدام تصميم Central Composite Design (CCD) الذي يتضمن إجراء 20 تجربة تتوزع العوامل فيها بشكل عشوائي من خلال ثلاث مكررات للنقط التجريبية، إنّ المتغيرات المدروسة هي: العامل الأول تركيز المذيب ( $A=\%v/v$ )، العامل الثاني درجة حرارة الاستخلاص ( $B=C$ )، العامل الثالث زمن الاستخلاص ( $C=\min$ )، بينما عامل الاستجابة المركبات المضادة للأكسدة حيث تمّ التعبير عن القيم ب (مغ ترولكس/غ).

**2-7 تحليل البيانات:** تمّ استخدام تحليل الانحدار لسطح الاستجابة برمجيات (Stat Ease, Design Expert ver. 11. USA) لتحليل بيانات التجربة حيث وافقت بيانات التجربة نموذج كثير حدود من الدرجة الثانية والمعادلة العامة هي:

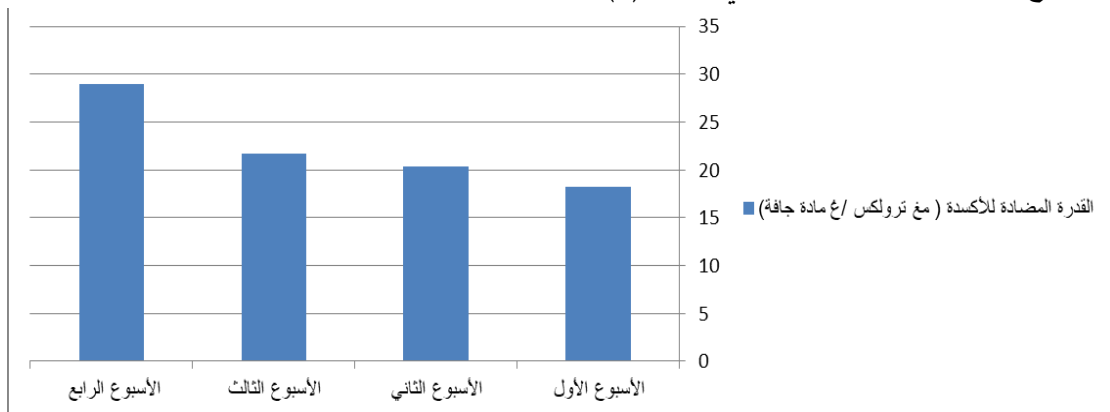
$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

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 المتغيرات المستقلة، إن مدى ملاءمة معادلة النموذج تظهر من خلال تحديد معامل التحديد  $R^2$  واختبار نقص المطابقة، وكلما كانت قيمة  $R^2$  قريبة من الواحد كلما ازداد تطابق البيانات بين النتائج الفعلية والقيم المحسوبة.

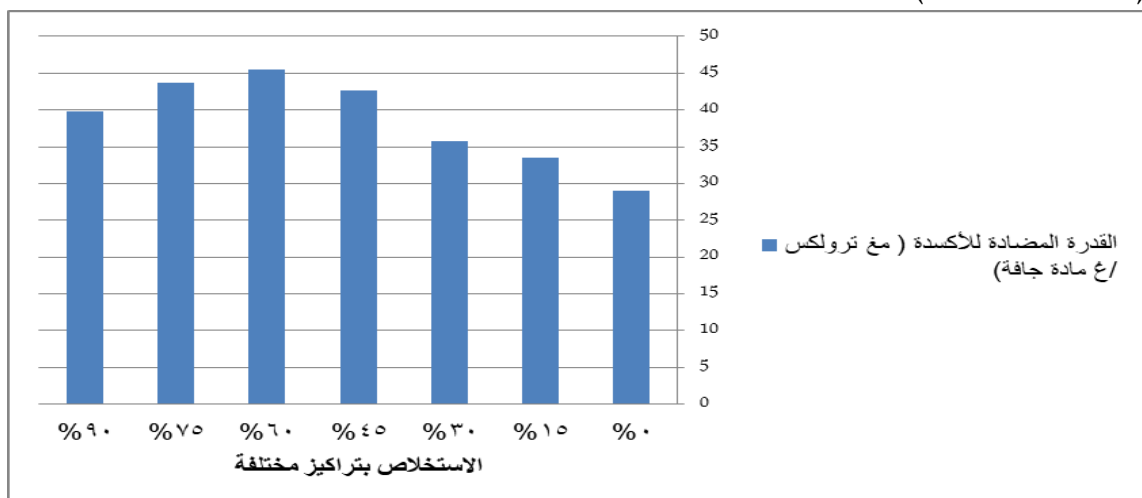
**2-8 اختبار موثوقية النموذج:** تعتمد الظروف المثالية لاستخلاص المركبات المضادة للأكسدة من الزعتر على المذيب وحرارة الاستخلاص وزمن الاستخلاص المستحصل عليها باستخدام معادلات التنبؤ من تلك المنهجية. تمَّ تحديد المركبات تحت الشروط المثلى للاستخلاص ثم مقارنة القيم الفعلية والنظرية لتحديد صلاحية النموذج.

### 3- النتائج و المناقشة:

**3-1 نتائج التجارب الأولية لاختيار مستويات القيم العليا والوسطى والدنيا للمتغيرات:** تمَّ تحديد المستويات الدنيا والوسطى والعليا لتصميم المتغيرات المستقلة المستخدمة في سطح الاستجابة بناءً على القيم الناتجة في التجارب الأولية، حيث أظهرت نتائج التجارب الأولية أنَّ الأسبوع الرابع من شهر آذار 2020 قد أعطى أفضل النتائج كفترة زمنية لجمع الأوراق مقارنة بالأسابيع الثلاثة الأخرى، كما يظهر في الشكل (1).

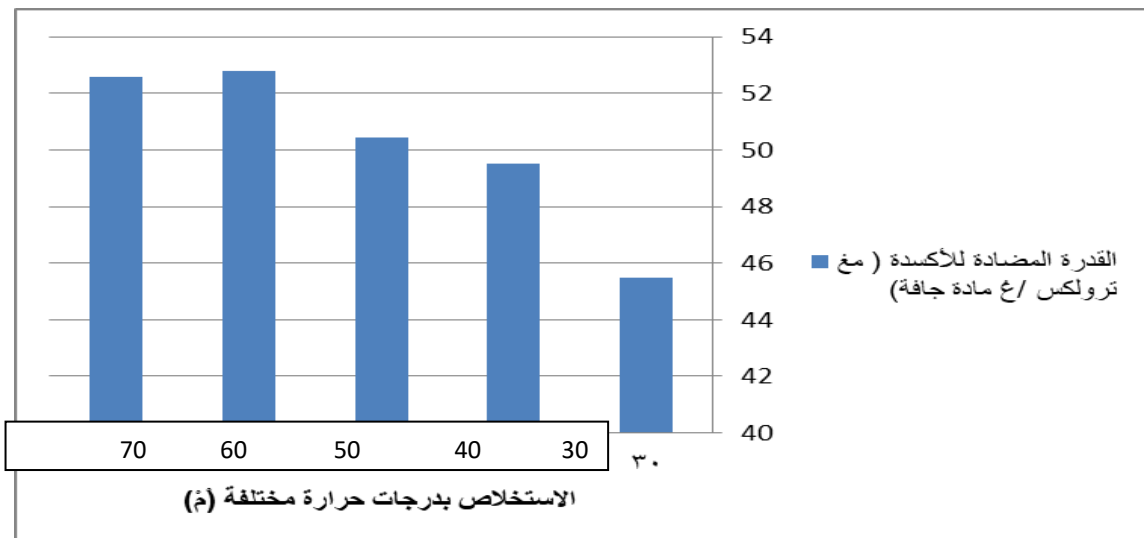


الشكل رقم (1) : يظهر القدرة المضادة للأكسدة في الزعتر عند جمع العينات بأزمنة مختلفة خلال شهر آذار 2020 ويلاحظ من الشكل (2) إنَّ لتركيز الإيتانول أهمية كبيرة حيث أعطى تركيز 60% أعلى معدل لاستخلاص المركبات المضادة للأكسدة وتتوافق هذه النتائج مع نتائج [19]، لذلك تمَّ تحديد المستويات الأعلى والأدنى بناءً على النتائج السابقة وكانت القيم (45%-60%-75%).



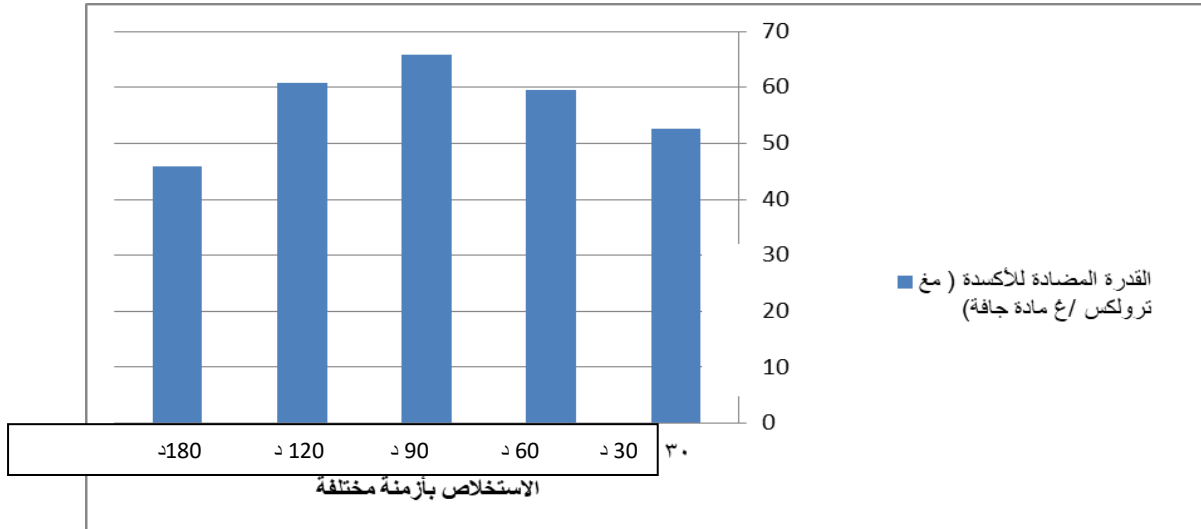
الشكل رقم (2) : يظهر القدرة المضادة للأكسدة في الزعتر عند الاستخلاص باستخدام تراكيز مختلفة

ويظهر في الشكل (3) ازدياد كمية مضادات الأكسدة الكلية في المستخلص مع ارتفاع درجة الحرارة حتى درجة 60 م ثم الانخفاض مع ملاحظة استخدام كمية كبيرة نسبياً من المذيب 250مل خوفاً من تبخره عند درجات الحرارة العالية.



الشكل رقم (3) : يظهر القدرة المضادة للأكسدة في الزعتر عند الاستخلاص بدرجات حرارة مختلفة

أشارت النتائج أنّ حركة انتقال المركبات الفعالة من الركيزة يلاحظ حتى حد معين وبعد ذلك تبدأ احتمال خسارتها بسبب تفككها في درجات الحرارة الأعلى [20]. إنّ الحرارة الأعلى تستطيع أن تحرك مركبات معينة بينما تشجع احتمال تخريب مركبات أخرى قد انتقلت مسبقاً عند درجات حرارة أقل. رفع درجة الحرارة قد يحسن الاستخلاص من خلال تعزيز ذوبان المركبات المضادة للأكسدة في المذيب بذلك يقل زمن الاستخلاص [4]، ومما قد يفسر ذلك أيضاً هو انخفاض اللزوجة مما يسرع الاستخلاص. نلاحظ أنّه بارتفاع درجة الحرارة زادت نسبة الاستخلاص حيث يمكن أن يسهم ارتفاع درجة الحرارة بتحرير أو حلمهة مركبات مضادة للأكسدة محررة وهذا يتفق مع ما وجدته [8]، حيث أنّ زيادة فترة الاستخلاص قد تسبب فقد في المذيب العضوي المستخدم نتيجة التبخر، حيث أعطت مستخلصات الزعتر أعلى استخلاص للمركبات عند درجة 60 م. اختيار زمن الاستخلاص كان الخطوة الأخيرة في سلسلة التجارب الأولية حيث تمّ استخلاص المركبات المضادة للأكسدة من عينات الزعتر من خلال تفاوت زمن الاستخلاص مع استخدام الايتانول 60% وإبقاء درجة الحرارة على 60 م، حيث أظهرت النتائج في الشكل (4) ارتفاع في معدل الاستخلاص مع زيادة زمن الاستخلاص من 30 د إلى 60 د وما بعد 180 د قد انخفض بشدة. وقد يعود ذلك إلى تفكك المركبات الفعالة خلال طول فترة الاستخلاص. [7,21] لذلك فإنّ زمن الاستخلاص يشكل عاملاً آخرًا مهمًا يؤثر على استخلاص المركبات المضادة للأكسدة، تمّ تحديد أفضل زمن للاستخلاص بـ 90 د تقريباً، لذلك تمّ اختيار الأزمنة التالية (60،90،120) د.



الشكل رقم (4) : يظهر القدرة المضادة للأكسدة في الزعتر عند الإستخلاص خلال أزمنة مختلفة

2-3 تصميم النموذج: يظهر في الجدول (1) المستويات المختلفة للمتغيرات المستقلة من تركيز مذيب ودرجة حرارة وزمن.

الجدول (1): يظهر المستويات المختلفة للمتغيرات المستقلة المدروسة

اسم العامل المتغير	الوحدة	المتوسط	الحد الأعلى	الحد الأدنى
A	تركيز المذيب ح/ح %	60	75	45
B	درجة مئوية	60	70	50
C	دقيقة	90	120	60

بعد إجراء التجارب المختلفة كما هو موضح في الجدول (2) والحصول على البيانات التجريبية تم معالجة البيانات بواسطة البرنامج والحصول على القيم المتوقعة وفق النموذج حيث ظهرت النتائج كما يلي:

الجدول رقم(2): تصميم التجربة ونتائج البيانات التجريبية والقيم المتوقعة لاستخلاص المركبات المضادة للأكسدة من

#### الزعتر

رقم التجربة	التركيز ح/ح %	درجة الحرارة (م)	الزمن (د)	القدرة المضادة للأكسدة في الزعتر (مغ ترولكس/غ)	البيانات التجريبية	القيم المتوقعة
1	75	50	120	البيانات التجريبية	50.45	50.21
2	75	50	60	البيانات التجريبية	54.45	54.25
3	45	70	120	البيانات التجريبية	51.25	51.01
4	60	60	90	البيانات التجريبية	65.85	65.94



55.54	55.79	60	70	45	5
65.24	65.85	90	60	60	6
54.45	54.23	90	43	60	7
65.24	65.85	90	60	60	8
54.98	55.12	40	60	60	9
50.91	51.51	90	77	60	10
58.55	58.45	60	70	75	11
58.17	57.94	120	70	75	12
50.04	49.5	140	60	60	13
65.24	65.85	90	60	60	14
59.03	58.94	60	50	45	15
65.24	65.85	90	60	60	16
68.03	67.92	90	60	85	17
65.24	65.85	90	60	60	18
60.08	59.57	120	50	45	19
62.31	62.54	90	60	35	20

أظهر تحليل التباين (ANOVA) أنَّ النموذج المختار من الدرجة الثانية يمثل البيانات المستحصل عليها بشكل كافي، يظهر في الجدول (3) نتائج تحليل التباين ANOVA للمركبات المضادة للأكسدة نلاحظ أنَّ قيمة  $p < 0.0001$  عند استخدام النموذج تشير إلى اختلاف الاستجابة المتوقعة عند اختلاف شروط الاستخلاص وملاءمة النموذج لتوقع الاستجابة في شروط الاستخلاص المختلفة.

الجدول رقم (3) : تحليل التباين ANOVA للنموذج المستخدم للمركبات المضادة للأكسدة في الزعتر.

مصدر التباين	مجموع المربعات	درجات الحرية	متوسط مجموع مربعات	F قيمة	p-value Prob > F
النموذج	661.52	9	73.50	40.93	< 0.0000
نقص المطابقة	17.96	5	3.59	2494.43	< 0.0001
خطأ النموذج	0.0000	5	0.0000		

وقد أظهر تحليل التباين ANOVA لثوابت انحدار سطح الاستجابة المتوقعة في نموذج كثير حدود من الدرجة الثانية للمركبات المضادة للأكسدة لنبات الزعتر أن كلاً من تركيز المذيب والحرارة والزمن تساهم بشكل ملحوظ على الاستجابة وتلعب دوراً حدياً في عملية الاستخلاص حيث لوحظت معنوية المؤشرات الخطية والتربيعية لكل المستخلصات، كما أن التأثير المشترك لتلك العوامل قد كان له أيضاً تأثير معنوي.

حددت كفاءة النموذج بواسطة معامل تحديد  $R^2$  كما يظهر في الجدول (4) حيث بلغت 0.973، وهي بذلك تقترب من (1) نلاحظ أن قيم  $R^2$  مرتفعة مما يشير إلى مدى ارتباط لكل نماذج التوقع تمثل إلى حد معقول النتائج الفعلية. نتيجة لذلك، فقد تم تفسير جزء كبير من المتغيرات من خلال نماذج RSM للمركبات المضادة للأكسدة. علاوة على ذلك، يصف معامل الاختلاف (CV) مدى تشتت البيانات. إن معامل الاختلاف CV للمركبات المضادة للأكسدة كان ضمن الحد المقبول.

الجدول رقم (4): تحليل التباين ANOVA لثوابت معاملات الانحدار في نموذج كثير حدود من الدرجة الثانية

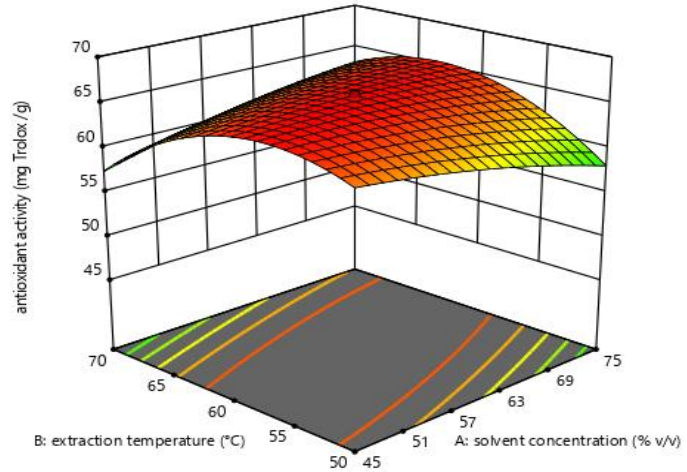
ثوابت معاملات الانحدار	المركبات المضادة للأكسدة في الزعتر
المتوسط $\pm$ الانحراف المعياري	58.99 $\pm$ 1.34
معامل التحديد $R^2$	0.9736
C.V. %	2.27

**3-3 تحليل سطح الاستجابة:** إنَّ العلاقة بين المتغيرات المستقلة والمرتبطة موضحة في تمثيل ثلاثي الأبعاد لسطح الاستجابة حيث يصوّر الشكل (5) تأثير عاملين من المتغيرات هما تركيز المذيب ودرجة الحرارة على محتوى الزعتر من المركبات، ويبرهن تأثير تركيز المذيب من الدرجة الثانية على الاستجابة حيث ترتفع مركبات المضادة للأكسدة لحدود 60% تركيز مذيب عضوي في الوسط يتبعه انخفاض مع ارتفاع التركيز. كما يظهر أنَّ تأثير درجة حرارة من الدرجة الثانية على استخلاص المركبات. عندما تمَّ إبقاء الزمن على 90 دقيقة فإنَّ الحرارة قد سببت ازدياد في الاستجابة.

X1 = A: solvent concentration  
X2 = B: extraction temperature

**Actual Factor**

C: extraction time = 90



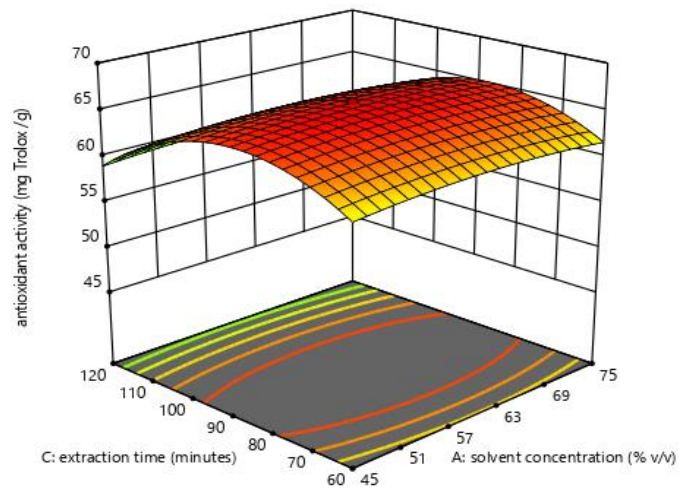
**الشكل رقم (5) : تأثير الحرارة وتركيز المذيب على استخلاص المركبات المضادة للأكسدة من نبات الزعتر**

ويظهر الشكل (6) تأثير تركيز المذيب والزمن على قيم الاستخلاص، بشكل مماثل فإنَّ تأثير كلا العاملين من الدرجة الثانية حيث يزداد الاستخلاص عند زيادة الزمن حتى حد معين ثم ينخفض نتيجة تفكك المركبات المضادة للأكسدة بتأثير الحرارة وطول مدة الاستخلاص، أما الشكل (7) فيبين تأثير عاملين هما الحرارة وزمن الاستخلاص.

X1 = A: solvent concentration  
X2 = C: extraction time

**Actual Factor**

B: extraction temperature = 60

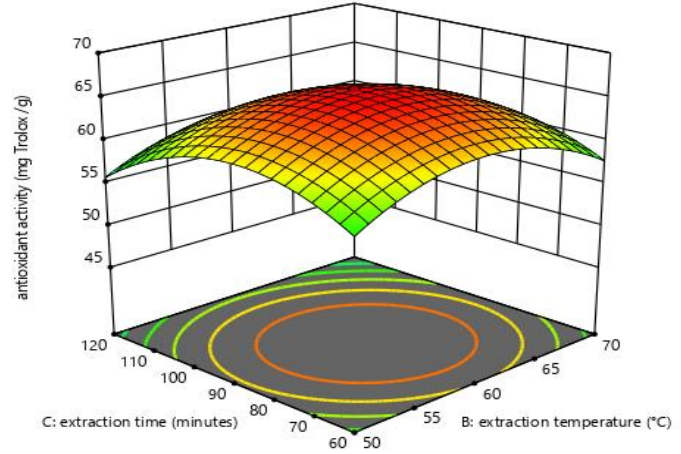


**الشكل رقم (6) : تأثير الزمن وتركيز المذيب على استخلاص المركبات المضادة للأكسدة من نبات الزعتر**

X1 = B: extraction temperature  
X2 = C: extraction time

**Actual Factor**

A: solvent concentration = 60



الشكل رقم (7) : تأثير الزمن والحرارة على استخلاص المركبات المضادة للأكسدة من نبات الزعتر

3-4 تجارب الموثوقية: يظهر أن القيم التجريبية كانت إلى حد معقول قريبة من القيم المتوقعة مما يعزز صلاحية وكفاءة النموذج.

**4-الاستنتاجات والتوصيات:**

يمكن أن يستعمل نموذج كثير الحدود من الدرجة الثانية في الوصول إلى أفضل استخلاص ممكن للمركبات المضادة للأكسدة من الزعتر. كما وجد أن المحلول المائي للآيتانول كان فعالاً في استخلاص المركبات المضادة للأكسدة .

شروط الاستخلاص للمركبات المضادة للأكسدة هي تركيز مذيب 59.5%، درجة حرارة 58.78 م، زمن 85.58 د، عند تطبيق هذه الشروط وفق البرنامج فإنه سيتم الحصول على مستخلص يحتوي  $0.01 \pm 66.20$  مغ ترولكس/غ، لذلك تم استخلاص المركبات المضادة للأكسدة في ظل الظروف المثلى للتحقق من صحة النموذج، وكانت القيمة التجريبية  $0.03 \pm 66.12$  مغ ترولكس/غ وزن الجاف.

## 5- المراجع:

1. Dauqan, E. M. A; Abdullah, A., (2017). Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. Journal of Applied Biology & Biotechnology. 5 (02), 017–022, DOI: 10.7324/JABB.2017.50203.
2. Razzaghi–Abyaneh, M.; Shams-Ghahfarokhi, M.; Rezaee, M. B.; Jaimand, K.; Alinezhad, S.; Saberi, R. & Yoshinari, T., (2009). Chemical composition and antiaflatoxic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. Food Control, 20, 1018–1024. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.12.007>
3. Glucin, I., (2005). The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*piper nigrum*) seeds. Inter. J. Food sci. nut., 56: 491–499.
4. Hossin, M. B., Brunton, N. P., Martin –Dianaa, A. B. & Barry–Ryan C., ( 2010). Application of response surface methodology to optimize pressurized liquid extraction of antioxidant compounds from sage (*Salvia officinalis* L.), basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) .Food Funct., 1, 269–277 | 269 <http://pubs.rsc.org/10.1039/C0FO00021C>.
5. Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K.-A.-H., & Khalel, K. I., (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. Industrial Crops and Products, 43, 827–831. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.029>
6. Alu’datt M. H., Rababah, T., Johargy A., Gammoh S., Ereifej K., Alhamad M. N., Brewer M. S., Saati A. A., Kubow S. & Rawshdeh M., (2016) . Extraction, optimisation and characterization of phenolics from *Thymus vulgaris* L.: phenolic content and profiles in relation to antioxidant, antidiabetic and antihypertensive properties. International Journal of Food Science and Technology, 51, 720–730.
7. Jovanović A.A., Đorđević V.B., Zdunić G.M., Pljevljakušić D.S., Šavikin K.P., Gođevac D.M., Bugargaski, B.M. (2017). Optimization of the Extraction Process of Polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat and ultrasound–assisted techniques. Separation and Purification Technology, 179, 369–380. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.055>.
8. Szilvássy B., Rak G., Sárosi S., Novák I., Pluhár Z. & Abrankó, L., (2013) . Polyphenols in the Aqueous Extracts of Garden Thyme (*Thymus vulgaris*) Chemotypes. Cultivated in Hungary Natural Product Communications. 8(5): 605–608.
9. Grigore A., Paraschiv Ina, Colceru–Mihul S., Bubueanu C., Draghici E., Ichim M. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. volatile oil obtained by two different methods. Romanian Biotechnological Letters. 15 (4):5436–5443.
10. El–Guendouz, S.; Aazza, S.; Dandlen, S. A.; Majdoub, N.; Lyoussi, B.; Raposo, S.; Antunes, M. D.; Gomes, V.; Miguel, M. G., (2019). Antioxidant Activity of Thyme Waste Extract in O/W Emulsions. Antioxidants, 8, 243. doi:10.3390/antiox8080243.

11. Gedikoğlu A., Sökmen M., Çivit A., ( 2019) .Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. Food Sci. Nutr. 7:1704–1714. DOI: 10.1002/fsn3.1007.
  12. Myers, R. H.; Montogomery, D. C. (2002). Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments. 2nd. ed. Wiley. New York, 2100.
  13. Cacace, J. E.; Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. J. Food Engineering, 59, 379–389.
  14. Malik N. R., Yadav K. C., Verma A., (2016). Optimization of Process Parameters in Extraction of Thyme Oil Using Response Surface Methodology (RSM). International Journal of Science, Engineering and Technology 4 (1).
  15. Park Y.; Lee J.; In M.–J.; Chae H. J., (2020). Optimization of extraction conditions of flavonoid compounds from Thyme (*Thymus vulgaris Libiatae*). J. Appl. Biol. Chem. 63(1), 111–116 <https://doi.org/10.3839/jabc.2020.015>.
  16. Preva–Uzunalic, A., Skerget, M., Knez, Z., Weinreich, B., Otto, F. & Gruner, S., (2006). Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): extraction efficiency of major catechins and caffeine. Food Chemistry, 96, 597–605.
  17. Kumaran A. And Karunakaran R. J., (2006). Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of an Aqueous Extract of Coleus Aromaticus. Food Chem., 97, 109–114.
  18. Chizzola, R.; Michitsch, H.; Franz C., (2008). Antioxidative Properties of Thymus vulgaris Leaves: Comparison of Different Extracts and Essential Oil Chemotypes. J. Agric. Food Chem., 56, 6897–6904.
  19. Dent, M.; Dragovic–Uzelac, V.; Penic, M.; Brncic, M.; Bosiljkov, T.; Levaji , B. (2012). 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), 84–91.
  20. Onofre, F.O. & Hettiarachchy, N.S. (2007). Extraction, quantification, and characterization of phenolics extracted with the aid of sonication from rice bran. Cereal Chemistry, 84, 337–342.
- 1- العبادي، إيناس وموسى، مكارم وعباس، عقيل. (2011). المحتوى الكيميائي لبذور الزعتر *Thymus vulgaris* وفعاليتها المضادة للأحياء المجهرية. مجلة الأنبار للعلوم الزراعية، 9(2):294–305.