

## نمذجة وأمثلة عملية استخلاص المواد الفينولية ومضادات الأكسدة من نبات *Cyperus esculentus* باستخدام منهجية سطح الاستجابة (RSM)

\* أ.د. علي محمد علي \*

\*\* أ.د. نزار عيسى \*\*

\*\*\* م. ديمة سمير سليم \*\*\*

(تاريخ الإيداع ٢٠٢٥/٢/١٦ . قُبل للنشر في ٢٠٢٥/٤/١٥)

□ ملخص □

يعتبر نبات السعد *Cyperus esculentus* (Tiger nut) من أكثر النباتات العشبية المنتشرة في حوض البحر الأبيض المتوسط، وتعد مستخلصاتها مصدر غني بالمكونات الفعالة حيويًا والتي تمتلك العديد من الخصائص المفيدة للصحة. تهدف هذه الدراسة إلى جعل مستخلصات هذا النبات أكثر فعالية من خلال تحسين عملية استخلاص الفينولات ومضادات الأكسدة من *C. esculentus* باستخدام منهجية سطح الاستجابة (RSM) القائمة على تصميم (BBD). تمت دراسة ثلاثة متغيرات مستقلة للعملية وهي زمن الاستخلاص ( $X_1$ )، درجة حرارة الاستخلاص ( $X_2$ ) ونسبة المادة الصلبة إلى السائلة ( $X_3$ )، بثلاثة مستويات (-1، 0، +1)، وذلك من خلال (١٥) نقطة تجريبية، وتقييم تأثيرها على استجابتيهما القدرة المضادة للأكسدة ( $Y_1$ : DPPHsc%) والمحتوى من المواد الفينولية ( $Y_2$ : TPC). حيث تم تحليل البيانات وبناء النماذج المحاكية لعملية الاستخلاص بصيغة متعدد حدود من الدرجة الثانية باستخدام علم تصميم التجارب ومنهجية سطح الاستجابة اعتماداً على التصميم (DOE/RSM/BBD). وتم إثبات كفاية النماذج باستخدام تحليل التباين (ANOVA). ودرست التأثيرات المهمة للعوامل وتفاعلاتها على كفاءة الاستخلاص عند مستوى ثقة ٩٥%. واستخدام نهج الأمثلية (Desirability approach) لتحديد وتقييم أفضل شروط لعملية الاستخلاص تعطي أقصى عائد ل (TPC) و (DPPHsc).

أشارت النتائج إلى أن أفضل قيم لـ ( $X_1$ ) و ( $X_2$ ) و ( $X_3$ ) بقيمة أمثلية تساوي ( $D = 99.3\%$ ) والتي تدل على الحل الأمثل، كانت (٢٥,٩h) و (٤٥.٧°C) و (٠,٢١ g/mL) على التوالي، والتي تعطي أفضل قيم تنبؤية لـ ( $Y_1$ ) و ( $Y_2$ ) في ظل الظروف المثلى وهي (٦٣,٩٢ %) و (١٧٨,٥٤ mgGAE /100 g dw) على التوالي.  
**الكلمات المفتاحية:** نبات السعد - القدرة المضادة للأكسدة - مستخلص مائي - البوليفينولات - أمثلة - منهجية سطح الاستجابة .

\*أستاذ في قسم تقانة الأغذية - كلية الهندسة التقنية - جامعة طرطوس - سورية.

\*\*أستاذ مساعد في قسم علم الحياة الحيوانية - كلية العلوم - جامعة دمشق - سورية.

\*\*\* معيدة موفدة داخلياً في قسم تقانة الأغذية - كلية الهندسة التقنية - جامعة طرطوس - سورية.

## Modeling and optimization of the extraction process of phenolics and antioxidants from *Cyperus esculentus* using response surface methodology (RSM)

Prof.Dr. Ali Mohammad Ali\*

Dr. Nizar Issa\*\*

Eng. Dimah Sameer Saleem\*

(Received 16/2/2025 . Accepted 15/4/2025)

### □ ABSTRACT □

*Cyperus esculentus* (Tiger nut) is one of the most widespread herbal plants in the Mediterranean basin, and its extracts are a rich source of bioactive components that have many beneficial properties for health. This study aims to make the extracts of this plant more effective by improving the extraction process of phenolics and antioxidants from *C. esculentus* using response surface methodology (RSM) based on the design (BBD). Three independent variables of the process were studied, namely extraction time (X1), extraction temperature (X2) and solid-liquid ratio (X3), at three levels (1-, 0, 1+), through (15) experimental points, and their effects on two responses (namely antioxidant capacity (Y1:DPPHsc%) and phenolic content (Y2:TPC)) were evaluated. The data were analyzed and simulation models for the extraction process were built in the form of a second-order polynomial using DOE/RSM/BBD. The adequacy of the models was proven using analysis of variance (ANOVA). The significant effects of factors and their interactions on extraction efficiency were studied at 95% confidence interval. Desirability approach was used to identify and evaluate the best conditions for the extraction process that give maximum yield of (TPC) and (DPPHsc). RSM indicated that the best values for (X1), (X2) and (X2) with a desirability value equal to (D = 99.3%) which indicates the optimal solution, were (25.9 h), ((45.7°C and (0.21 g/mL) respectively, which give the best predictive values for (Y1) and (Y2) under the optimal conditions which are (63.92%) and mgGAE /100 g dw 178.54) respectively.

**Keywords:** *Cyperus esculentus* – antioxidant capacity – aqueous extract – polyphenols – optimization – response surface methodology.

---

\* Department of Food Technology, Faculty of Technical Engineering, Tartous University, Syria.

\*\* Department of Biology , Faculty of science, Damascus University, Syria.

## ١. المقدمة:

يساهم الإجهاد التأكسدي في تطور العديد من الأمراض وذلك بسبب إنتاج الجذور الحرة التي تهاجم الجزيئات الحيوية الهامة مثل الأحماض النووية والدهون والبروتينات، مما يؤدي إلى تلف الخلايا [١،٢]، وتلعب مضادات الأكسدة الاصطناعية والطبيعية دوراً أساسياً في الوقاية من الأمراض المرتبطة بذلك [3]، تتفوق مضادات الأكسدة الطبيعية في كونها أكثر أماناً من الصناعية ذات التأثيرات الجانبية الضارة على الصحة [4].

تعتبر المواد الفينولية واحدة من أهم المكونات الفعالة حيوياً التي جذبت اهتمام الباحثين بسبب خصائصها المضادة للأكسدة وفعاليتها في تأخير أو تثبيط أكسدة الركيزة سواء في المختبر أو في الجسم الحي، وقدرتها العالية على التخلص من الجذور الحرة المسؤولة عن الإجهاد التأكسدي في الجسم، حيث أوصت العديد من الدراسات بالإكثار من تناول الأطعمة الغنية بالبوليفينولات للتقليل من خطر الإصابة بأمراض مزمنة [5].

تعد النباتات الطبية ومستخلصاتها مصادر غنية بالمركبات الفينولية، وتدخل في العديد من الصناعات الغذائية والدوائية. ولتحقيق أكبر فعالية للمستخلصات النباتية يجب أن توفر عملية الاستخلاص أقصى مردود للمركبات المستهدفة [6,7]

يعتبر نبات السعد *Cyperus esculentus* (Tiger nut) من النباتات العشبية في الفصيلة السعدية المنتشرة في حوض البحر الأبيض المتوسط والتي شاع استخدامها في الآونة الأخيرة كغذاء وظيفي بسبب فعاليتها الحيوية المضادة للأكسدة وللميكروبات وللتهاب والأورام واثارها الوقائية للكبد والعلاجية للعديد من الأمراض [8].

طوّرت من نبات السعد العديد من المنتجات الغذائية، ففي إسبانيا، يتم تقديمه كمشروب يشبه الحليب يسمى "Horchata de chufa"، والذي اكتسب شعبية كبيرة في كثير من البلدان بما في ذلك فرنسا والبرتغال والمملكة المتحدة والصين والأرجنتين [9]. تحتوي روزومات نبات السعد على تركيبة كيميائية نباتية غنية تتكون بشكل أساسي من الفلافونويدات والأحماض العضوية والقلويدات والجليكوزيدات [10]، الأحماض الدهنية الأحادية غير المشبعة، التانينات والفيئات، مع تركيبة زيتية غذائية مماثلة لزيت الزيتون [11] غني بمستخلصاته الكبير بالفلافونويدات والمواد الفينولية جعلها ذات فعالية عالية مضادة للأكسدة [12].

نبات (*Cyperus esculentus*) يملك خواص مضادة للأكسدة تمكنه من لعب أدوار حيوية هامة في الجسم وهو ما أظهرته العديد من الدراسات، حيث أثبتت دراسة أجراها الباحث Su وآخرون احتواء مستخلص نبات السعد على مستقبلات ثانوية من الفلافونويدات، والتي تظهر نشاطاً مضاداً للأكسدة [٣٤]. في دراسة أخرى وجد الباحث Willis وآخرون أن المستخلصات المائية لروزومات نبات السعد المحمصة حققت أعلى مردود من المواد الفينولية وتميزت بفعالية مضادة للأكسدة ثبتت ٥٠% من الجذور الحرة في اختبار DPPH [٣٥].

قام Badejo وآخرون بخلط خلاصة روزومات نبات السعد مع خلاصة الزنجبيل والماء بالنسبة (٧:١:٢) لصنع مشروب السعد المختلط، ودرسوا تأثيره في إزالة الجذور الحرة، أظهرت النتائج أن معدل إزالة الجذور الحرة (DPPH) كان ٣٢,٥٣%، حيث امتلكت المخاليط المدروسة إمكانات كبيرة مضادة للأكسدة وأوصت الدراسة باستخدامها كبديل للمشروبات الغازية [٣٦].

ونظراً لأن قطبية المركبات الفينولية وتركيبها يمكن أن يختلف بشكل كبير بين النباتات المختلفة وفي النبات نفسه، بالإضافة إلى العديد من العوامل التي تؤثر على الاستخلاص مثل الزمن، ودرجة الحموضة، ودرجة الحرارة، نسبة المذيب إلى المادة الصلبة وغيرها، فإنه من الصعب تحديد عملية استخلاص مثالية لجميع الحالات [13,14] من هنا تبرز أهمية تحسين عملية الاستخلاص من خلال التحكم في هذه العوامل لتحقيق أقصى استفادة.

تعد منهجية سطح الاستجابة (RSM) طريقة اقتصادية واسعة الاستخدام لتحسين ظروف عمليات صناعة الأغذية المختلفة والعديد من العمليات الكيميائية والكيميائية الحيوية، حيث تستهلك وقتاً أقل وتتطلب جهداً أقل فهي تتطلب عدداً أقل من التجارب لتحليل العديد من العوامل وتفاعلاتها وتأثيراتها على استجابة واحدة أو أكثر في الوقت نفسه [15]. استخدمت العديد من التصاميم التجريبية لـ RSM، أكثرها شيوعاً التصميم المركب المركزي (CCD) وتصميم (Box-Behnken (BBD). يتطلب BBD ثلاثة مستويات فقط لكل عامل لتناسب نموذج الانحدار من الدرجة الثانية، بينما يتطلب CCD خمسة مستويات لكل عامل، بالإضافة إلى ذلك، يتطلب BBD عدداً أقل من التجارب [16].

## 2 أهمية البحث:

تعتبر عملية الاستخلاص من أهم المراحل التي تؤثر في فعالية المستخلصات حيث تتحكم في مردود المواد المستهدفة وبالتالي بفعالية المستخلص الحيوية ومن هنا تأتي أهمية تحسين هذه العملية وأمثلتها. ويوفر استخدام علم تصميم التجارب ومنهجية سطح الاستجابة (RSM) أفضل الطرق وبأقل جهد ووقت لتحسين وأمثلة العمليات الكيميائية والكيميائية الحيوية.

## 3. هدف البحث:

هدفت هذه الدراسة إلى أمثلة عملية استخلاص المواد الفينولية ومضادات الأكسدة من روزومات نبات *C. esculentus*، من خلال استخدام منهجية سطح الاستجابة (RSM) وتصميم (Box-Behnken (BBD).

## 4. مواد البحث وطرقه:

### 1.4. المواد الكيميائية:

كاشف (2N) Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich، سويسرا)، ٢,٢-diphenyl-1-picryl-، (DPPH) hydrazyl (Sigma-Aldrich، الولايات المتحدة الأمريكية)، كربونات الصوديوم (Himedia، الهند)، حمض الغاليك (Sigma-Aldrich، الصين). ميثانول نقي بنسبة ٩٩,٥% من الدرجة الصيدلانية (Sigma-Aldrich، الولايات المتحدة الأمريكية)، ماء مقطر.

### ٤, ٢ جمع العينات وتحضيرها:

تم شراء روزومات نبات السعد المجففة المستوردة من أحد الأسواق الشعبية في مدينة دمشق ثم خزنت في أكياس ورقية بدرجة حرارة الغرفة في مكان جاف حتى استخدامها في التحاليل المخبرية. قبل إجراء التحاليل، طحنت الروزومات المجففة في مطحنة للحصول على مسحوق وحفظت في أكياس ورقية ضمن أكياس من البولي إيثيلين ليتم استخلاصها قبل إجراء الاختبارات مباشرة.

## ٣,٤. إجراءات الاستخلاص:

حدد محتوى مسحوق الـريزومات من الرطوبة وكان ٥,٨٧%. ثم أجريت سلسلة من تجارب الاستخلاص، وأجريت كل منها باستخدام الخطوات التالية: أضيفت عينات المسحوق الموزونة إلى حجم محدد من الماء وفق البارامترات الواردة في خطة التجربة الموضحة في الجدول (١).

## ١,٣,٤ تحديد المحتوى الفينولي الكلي (اختبار Folin-Ciocalteu):

تم تحديد كمية المركبات الفينولية الكلية في المستخلص المائي لنبات (*C.esculentus*) باستخدام طريقة (Folin-Ciocalteu) اللونية والإجراءات الموصوفة من قبل الباحث (Skerget) [17]، حيث أضيف (0.5 mL) من كاشف (Folin-Ciocalteu) (2N) و(4.5 mL) من الماء المقطر إلى (1 mL) من المستخلص في أنبوب اختبار، وترك المزيج عند درجة حرارة الغرفة لمدة (5 min)، بعد ذلك أضيف (4 mL) من (7.5%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ، وحضنت العينات في حمام مائي عند درجة حرارة (45°C) لمدة (30 min) ، وقيست الامتصاصية باستخدام جهاز السيكتروفوتومتر من النوع (V-630 UV-VIS Spectrophotometer) المزود من قبل شركة (JASCO) للمحاليل الناتجة الملونة باللون الأزرق عند طول موجة (734 nm)، وتم التعبير عن النتائج كمكافئات حمض غاليك (GAE) بالـ (mg) لكل (g) (100) من الوزن الجاف (DW).

## ٢,٣,٤ اختبار الفعالية المضادة للأكسدة في كبح الجذور الحرة باستخدام مقايصة diphenyl--1,1

## : (DPPH) 2-picrylhydrazil

استخدم اختبار تقييم نشاط الكسح الجذري لـ (DPPH<sup>•</sup>) المستخدم على نطاق واسع لتحديد نشاط مضادات الأكسدة في المستخلصات النباتية. أجري الاختبار وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل (Brand-) [18]. Williams *et al*

حيث أضيف (200 µL) من العينات إلى (200 mL) من محلول (DPPH) (100 µM/L methanol) وحرك المزيج، ثم قيس الامتصاصية عند (520nm) بعد (60min) من تحضين مخاليط التفاعل في الظلام عند درجة حرارة الغرفة وتم حساب نشاط الكسح الجذري بالمعادلة التالية (١):

$$(1) \quad (\%) \text{ نسبة كسح جذور DPPH} = \frac{[(Abs_c - Abs_s)]}{(Abs_c)} * 100$$

(Abs<sub>c</sub>): امتصاصية محلول (DPPH) مع المذيب، Abs<sub>s</sub>: امتصاصية محلول DPPH مع مستخلص العينة.

## ٣,٣,٤ تصميم التجربة باستخدام (RSM):

تم تحسين ظروف الاستخلاص لزيادة المردود من المركبات الفينولية والقدرة المضادة للأكسدة للمستخلصات باستخدام منهجية سطح الاستجابة (RSM)، والتي تم إجراؤها باستخدام برنامج (Minitab) .19

بناءً على إجراء دراسة مرجعية ومجموعة من التجارب الأولية، تم اختيار ثلاث متغيرات مستقلة وهي: درجة الحرارة، زمن الاستخلاص، نسبة المادة الصلبة إلى المذيب، باعتبارهما أكثر العوامل تأثيراً في المتغيرات غير المستقلة وهي القدرة المضادة للأكسدة (Y<sub>1</sub>:DPPHsc%) والمحتوى من المواد الفينولية (Y<sub>2</sub>:TPC)،

وأجريت عدة تجارب أولية لتحديد المجال الأضيق الأكثر فاعلية لتغيرات العوامل. يرد في الجدول (1) حدود المتغيرات المستقلة المدروسة.

الجدول (1): مستويات تغير العوامل المستقلة

| +1         | 0          | -1          |                       |
|------------|------------|-------------|-----------------------|
| 48         | 27         | 6           | X <sub>1</sub> (h)    |
| 75         | 50         | 25          | X <sub>2</sub> (°C)   |
| 1:5= 0.198 | 1:3 = 0.33 | 1:15= 0.066 | X <sub>3</sub> (g/mL) |

X<sub>1</sub>: زمن الاستخلاص (ساعة) ، X<sub>2</sub>: درجة حرارة الاستخلاص (°C) ، X<sub>3</sub>: نسبة المواد الصلبة إلى المذيب (g/mL)

وتم اعتماد التصميم (BBD)، حيث تم عرض قيم متغيرات الاستجابة وتصميم مصفوفة التجربة في

الجدول (2).

الجدول (2): الخطة التجريبية بثلاثة عوامل مستقلة X<sub>1</sub>,X<sub>2</sub>,X<sub>3</sub> ومستويين

| رقم التجربة | X <sub>1</sub><br>(h) | X <sub>2</sub><br>(°C) | X <sub>3</sub><br>(g/mL) | y1<br>(DPPHsc) | y2<br>(TPC) |
|-------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|----------------|-------------|
| 1           | 0                     | 1                      | -1                       | 28.05          | 105         |
| 2           | 1                     | -1                     | 0                        | 41.50          | 120         |
| 3           | -1                    | 0                      | -1                       | 39.00          | 115         |
| 4           | 0                     | -1                     | 1                        | 49.30          | 140         |
| 5           | -1                    | 0                      | 1                        | 47.40          | 137         |
| 6           | 0                     | 0                      | 0                        | 63.50          | 177         |
| 7           | 0                     | -1                     | -1                       | 31.50          | 126         |
| 8           | 1                     | 0                      | 1                        | 38.09          | 129         |
| 9           | 0                     | 0                      | 0                        | 64.20          | 179         |
| 10          | -1                    | 1                      | 0                        | 37.10          | 110         |
| 11          | 1                     | 0                      | -1                       | 40.10          | 119         |
| 12          | 0                     | 1                      | 1                        | 19.70          | 108         |
| 13          | 1                     | 1                      | 0                        | 24.70          | 101         |
| 14          | -1                    | -1                     | 0                        | 33.50          | 130         |
| 15          | 0                     | 0                      | 0                        | 62.10          | 175         |

تمت نمذجة البيانات التي تم الحصول عليها من تصميم BBD باستخدام معادلة كثير الحدود من

الدرجة الثانية:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=2}^n \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 . \quad (2)$$

حيث، Y هي الاستجابة المتوقعة؛  $\beta_0$  هو المعامل الثابت؛  $\beta_i$  هو المعامل الخطي؛  $\beta_{ii}$  هو المعامل

التربيعي، هو معامل التفاعل؛ و  $X_i$  و  $X_j$  متغيرات مستقلة؛ n هو عدد المتغيرات المستقلة (العوامل).

٤، ٣، ٤ أمثلة وتحسين عملية الاستخلاص:

تم استخدام نهج الأمثلية (Desirability approach) لتحديد وتقييم أفضل شروط لعملية الاستخلاص

تعطي أقصى عائد لـ (TPC) و (DPPHsc). لتحقيق ذلك، تم تحويل البيانات التي تم الحصول عليها (y<sub>i</sub>)

إلى دالة الأمثلية (di)، والتي يمكن تحسينها بواسطة تقنيات أحادية المتغير [19].

## ٤, ٣, ٥ اختبارات التحقق والتحليل الإحصائي:

تم التحقق من البيانات التجريبية وكفاية النموذج إحصائياً، وتم فحص الأهمية الإحصائية للحدود في معادلتى الانحدار باستخدام تحليل (ANOVA) لكل استجابة. تم استخدام برنامج (Minitab 19) و (R) في الأمثلة والتحليل الإحصائي.

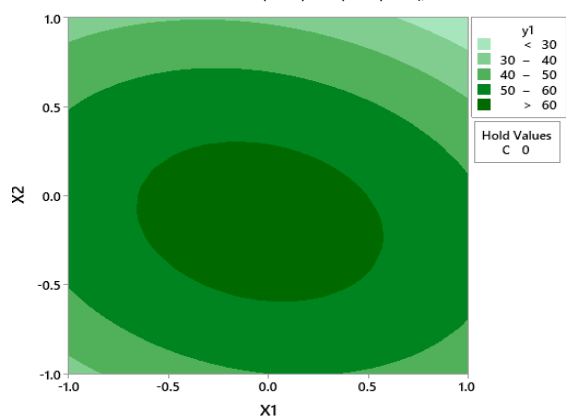
## 5. النتائج والمناقشة:

## ١, ٥. دراسة تأثير متغيرات الاستخلاص على القدرة المضادة للأكسدة:

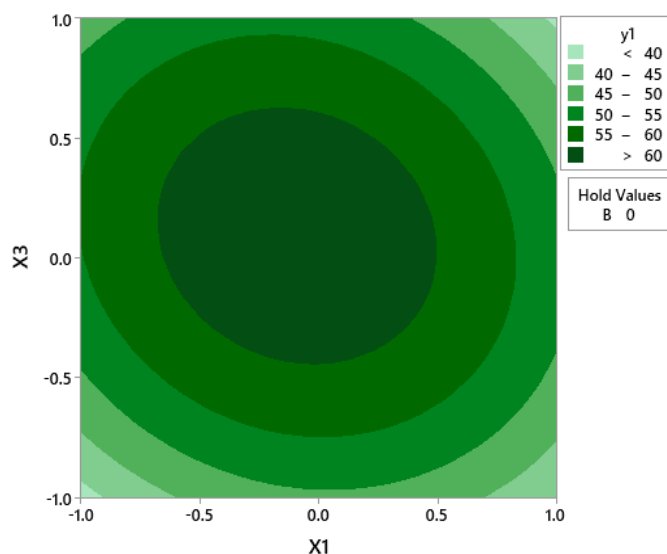
تم استخدام BBD لأمثلة عملية الاستخلاص من خلال (١٥) تجربة. تراوحت القدرة المضادة للأكسدة للعينات من (19.7%) إلى (64.2%). أظهرت التجربة (٩) أعلى DPPHsc بينما أظهرت التجربة (١٢) أقل DPPHsc. بناءً على القيم التجريبية التي تم الحصول عليها كما هو موضح في الجدول (٢)، تم تحديد معادلة الانحدار على النحو التالي:

$$1 \quad 63.27 - 1.58 X_1 - 5.78 X_2 + 1.98 X_3 - 10.03 X_1^2 - 19.04 X_2^2 - 12.09 X_3^2 - 5.10 X_1 X_2 - 2.60 X_1 X_3 - 6.54 X_2 X_3 \quad (3)$$

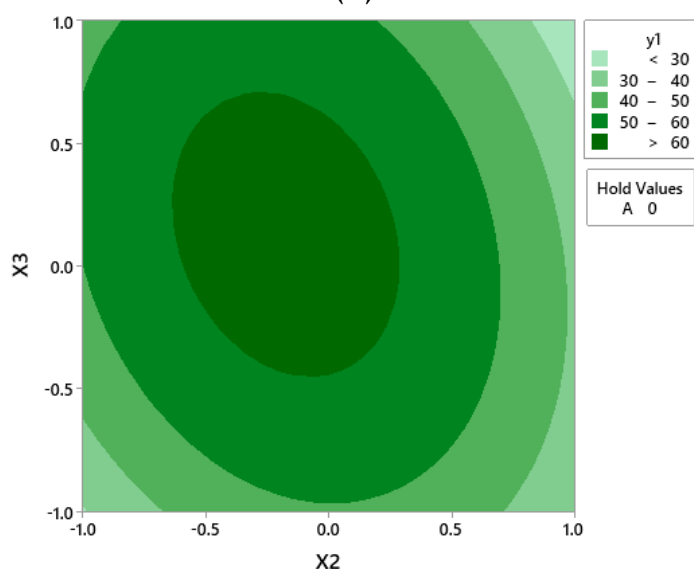
تصف هذه المعادلة القدرة المضادة للأكسدة المتوقعة كدالة للمتغيرات المشفرة  $X_1$ : زمن الاستخلاص (ساعة)،  $X_2$ : درجة حرارة الاستخلاص ( $^{\circ}\text{C}$ )،  $X_3$ : نسبة المواد الصلبة إلى المذيب (g/mL). يوضح الشكل (١) مخطط Contour لـ DPPHsc كدالة للمتغيرين ( $X_1$ ) و ( $X_2$ ). ويوضح الشكل (٢) مخطط Contour لـ DPPHsc كدالة للمتغيرين ( $X_1$ ) و ( $X_3$ ). ويوضح الشكل (٣) مخطط Contour لـ DPPHsc كدالة للمتغيرين ( $X_2$ ) و ( $X_3$ ).



(١)



(ب)



(ج)

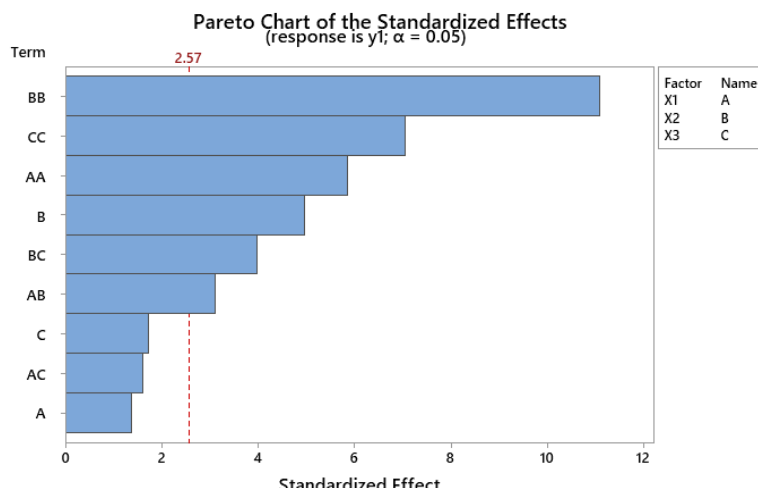
الشكل (١): (أ) مخطط Contour كدالة للمتغيرين  $(X_1)$  و  $(X_2)$ ، (ب): مخطط Contour كدالة DPPHsc للمتغيرين  $(X_1)$  و  $(X_3)$ . (ج): مخطط Contour كدالة للمتغيرين  $(X_2)$  و  $(X_3)$ .

تظهر المخططات في الشكل (١) أن أقصى قدرة مضادة للأكسدة للمستخلصات تنتج عند درجة حرارة استخلاص بين ٣٠ و ٦٠ درجة مئوية و زمن متوسط بين ١٢ و ٢٤ ساعة وعند استخدام نسبة مواد صلبة متوسطة بين ١:٢ g/mL و ١:٤ g/mL، أي تقريباً في منتصف المجالات المدروسة لتغيرات العوامل المدروسة. ومن أجل تحديد العوامل التي تؤثر بشكل كبير على استجابة القدرة المضادة للأكسدة، أجري تحليل ANOVA للنموذج ولخص في الجدول (٣).

الجدول (٣): تحليل ANOVA للنموذج متعدد الحدود (DPPHsc) y1

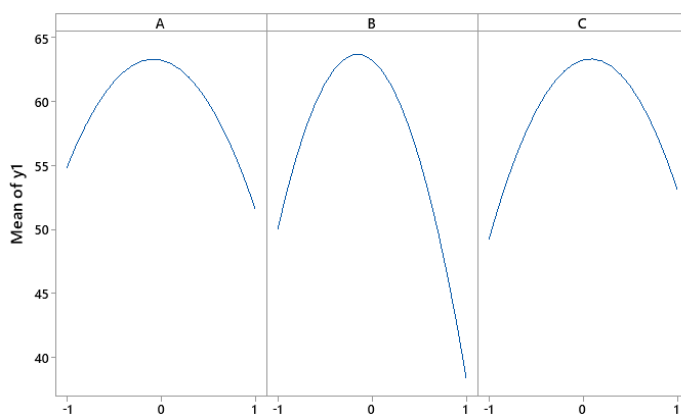
| Source                   | DF | Adj SS  | Adj MS  | F-Value | P-Value |
|--------------------------|----|---------|---------|---------|---------|
| <b>Model</b>             |    | 2605.85 | 289.54  | 26.55   | 0.001   |
| <b>Linear</b>            |    | 318.62  | 106.21  | 9.74    | 0.016   |
| X1                       |    | 19.88   | 19.88   | 1.82    | 0.235   |
| X2                       |    | 267.38  | 267.38  | 24.52   | 0.004   |
| X3                       |    | 31.36   | 31.36   | 2.88    | 0.151   |
| <b>Square</b>            |    | 1985.14 | 661.71  | 60.68   | 0.000   |
| X1*X1                    |    | 371.33  | 371.33  | 34.05   | 0.002   |
| X2*X2                    |    | 1338.31 | 1338.31 | 122.73  | 0.000   |
| X3*X3                    |    | 539.77  | 539.77  | 49.50   | 0.001   |
| <b>2-Way Interaction</b> |    | 302.09  | 100.70  | 9.23    | 0.018   |
| X1*X2                    |    | 104.04  | 104.04  | 9.54    | 0.027   |
| X1*X3                    |    | 27.09   | 27.09   | 2.48    | 0.176   |
| X2*X3                    |    | 170.96  | 170.96  | 15.68   | 0.011   |
| Error                    |    | 54.52   | 10.90   |         |         |
| <b>Lack-of-Fit</b>       |    | 52.24   | 17.41   | 15.23   | 0.062   |
| Pure Error               |    | 2.29    | 1.14    |         |         |
| Total                    | 4  | 2660.3  |         |         |         |

يُمْكِنُ تَقْيِيمُ أَهْمِيَّةِ مُعَامَلَاتِ الانحدارِ بِاسْتِخْدَامِ الْقِيَمَةِ الْإِحْتِمَالِيَّةِ (P-value). فَتَشِيرُ قِيَمَةُ (p) الْمُنخَفِضَةُ (<0.05) إِلَى أَنَّ الْمُتَعَيَّرَ ذُو دَلَالَةٍ إِحْصَائِيَّةٍ [20]. وَأَيْضًا مِنْ خِلَالِ مَحْطَطُ بَاريتو (الشكل ٢) الَّذِي يَظْهَرُ الْقِيَمَ الْمُطْلَقَةَ لِلتَّأثيرَاتِ الْمُعْيَارِيَّةِ مِنْ أَكْبَرِ تَأثيرٍ إِلَى أَصْغَرِ تَأثيرٍ، وَكثيراً مَا يُسْتخدَمُ فِي مَجَالَاتِ الْإِحْتِبَارَاتِ وَالْعَمَلِيَّاتِ الْكِيْمِيَّائِيَّةِ لِتَقْيِيمِ نَتَائِجِ التَّصَامِيمِ التَّجْرِبِيَّةِ. حَيْثُ يُنَمَّ تَقْدِيمُ تَأثيرَاتِ الْعَوَامِلِ وَتَقَاعَلَاتِهَا عَلَى أَنَّهَا "تَأثيرَاتٌ مُعْيَارِيَّةٌ" (SE)، وَالَّتِي يُنَمَّ حَسَابُهَا مِنْ خِلَالِ النَّسْبَةِ بَيْنَ "قِيَمَةِ التَّأثيرِ" وَالانحرافِ الْمُعْيَارِيِّ الَّذِي تَمَّ الْحُصُولُ عَلَيْهِ أَثناءَ عَمَلِيَّةِ النَّمْدَجَةِ، وَيَرَسُمُ خَطًّا مَرَجِعِيًّا لِلإِشَارَةِ إِلَى التَّأثيرَاتِ ذَاتِ الْأَهْمِيَّةِ الْإِحْصَائِيَّةِ، وَالَّذِي يُنَمَّ تَحْدِيدُ قِيَمَتِهِ وَفَقَّ دَرَجَةَ الْحُرِّيَّةِ الَّتِي يَنْطَوِي عَلَيْهَا حِسَابُ الْانحرافِ الْمُعْيَارِيِّ لِلتَّأثيرَاتِ، وَمُسْتَوَى التَّقَعُّدِ فِي الْعَمَلِ التَّجْرِبِيِّ [٢١].



الشكل (٢): مخطط (Pareto) لتأثير عوامل الإدخال على استجابة القُدرة المضادة للأكسدة

وعليه فإن أكثر العوامل تأثير في الاستجابة Y1 (القدرة المضادة للأكسدة) هي: X1 و X2 و X3 في الحدود التربيعية والعامل X2 وتفاعلاته مع X1 ومع X3. يشير المعامل الخطي السالب للعامل X2 (درجة الحرارة) إلى وجود ارتباط عكسي بين المتغير المستقل X2 والمتغير التابع Y1. وتُظهر مخططات التأثيرات الرئيسية الموضحة في الشكل (٣) أن قيمة y1 تزداد مع ارتفاع قيمة X2 (درجة حرارة الاستخلاص) حتى حد معين ثم تصبح العلاقة عكسية مع الارتفاع الإضافي في درجات الحرارة.



الشكل (٣): مخططات التأثيرات الأساسية للاستجابة Y1 (القدرة المضادة للأكسدة DPPHsc)

وهو ما فسرتة دراساته سابقة ذكرت أن ارتفاع درجة الحرارة يسبب انخفاض لزوجة المواد وزيادة قابليتها للذوبان في المذيب، وفي الوقت نفسه فإن ارتفاع درجة الحرارة يحسن معامل انتشار المذيب، مما يؤدي بالنتيجة إلى تسريع عملية الاستخلاص [22] ، وهو ما يفسر تحسن القدرة المضادة للأكسدة مع ارتفاع درجة الحرارة في البداية نتيجة ارتفاع المردود من المواد الفعالة المستخلصة، وذلك حتى تبلغ حد أقصى تعود بعدها القدرة المضادة للأكسدة لتتخفف من جديد وذلك قد يكون بسبب تدهور المركبات الفعالة وتعرضها للتحلل وللتغيرات الفيزيائية والكيميائية المختلفة [23] .

كذلك الأمر بالنسبة لزمن الاستخلاص، حيث وجد العديد من الباحثين ارتفاعاً متناسباً في عائد الاستخلاص مع زيادة زمن الاستخلاص [٢٤، ٢٥، ٢٦، ٢٧]. ومع ذلك، فإن للاستخلاص المطول عيوبه، فعلى الرغم من أن مزيداً من البوليفينولات يتم استخلاصها بمدة استخلاص أطول، فإنها تتعرض لمتغيرات

أخرى مثل درجة الحرارة والضوء والأكسجين ولفترة أطول أو يمكن لمكونات أخرى أن تتفاعل معها، مما قد يؤدي إلى انخفاض في عائد الاستخلاص. يمكن أيضًا أن يُعزى الانخفاض في عائد الاستخلاص إلى بعض التحلل الطفيف للبوليفينولات غير المستقرة عند درجات حرارة عالية في ظل وقت استخلاص طويل [٢٨، ٢٩، ٣٠].

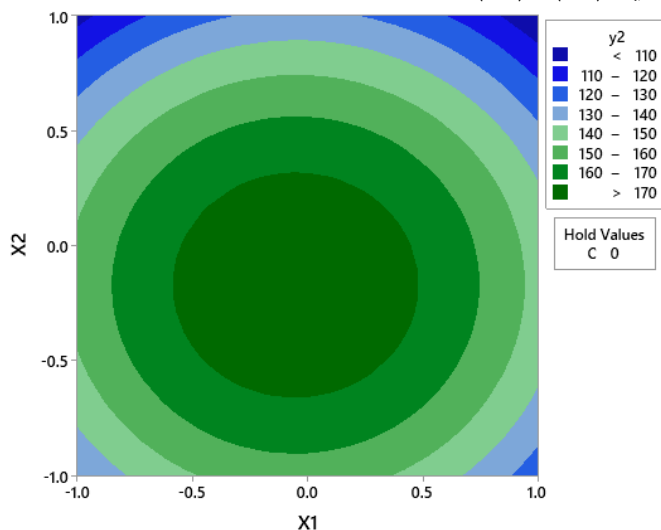
وبالنسبة للعامل  $X_3$  (نسبة المواد الصلبة إلى المذيب) فكذلك، تتفق نتائج دراستنا مع العديد من الدراسات التي قيمت النشاط المضاد للأكسدة DPPHsc لمستخلصات نباتية، وخلصت إلى أن القدرة على إزالة الجذور الحرة DPPH تزداد بشكل ملحوظ مع زيادة تركيز المستخلص (نسبة المواد الصلبة إلى السائلة) حتى حد معين تصبح بعدها العلاقة عكسية وذلك بسبب انخفاض نسبة الطور السائل وارتفاع نسبة المواد الصلبة مما ينعكس سلباً على معدل انتشار المواد الفعالة فتتخفض بالنتيجة فعالية المستخلص نتيجة انخفاض المردود من المواد الفعالة [٣١، ٣٢، ٣٣].

#### ٢,٥. دراسة تأثير متغيرات الاستخلاص على المحتوى من المواد الفينولية الكلية (TPC):

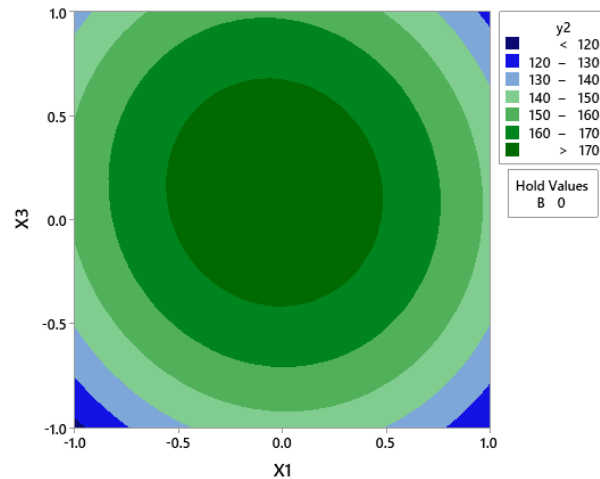
استخدم تصميم BBD لأمثلة عملية الاستخلاص من خلال ١٥ تجربة. تراوح المحتوى من المواد الفينولية الكلية في العينات من 101 mgGAE/100gDW إلى 179 mgGAE/100gDW. أظهرت التجربة ٩ أعلى محتوى فينولي بينما أظهرت التجربة ١٣ أقل محتوى فينولي. بناءً على القيم التجريبية التي تم الحصول عليها كما هو موضح في الجدول (٢)، تم تحديد معادلة الانحدار على النحو التالي:

$$177 - 2.88X_1 - 11.5 X_2 + 6.13 X_3 - 28.25 X_1^2 - 33.5 X_2^2 - 23.75 X_3^2 - 0.25 X_1X_2 - 3 X_1X_3 - 2.75 X_2X_3$$

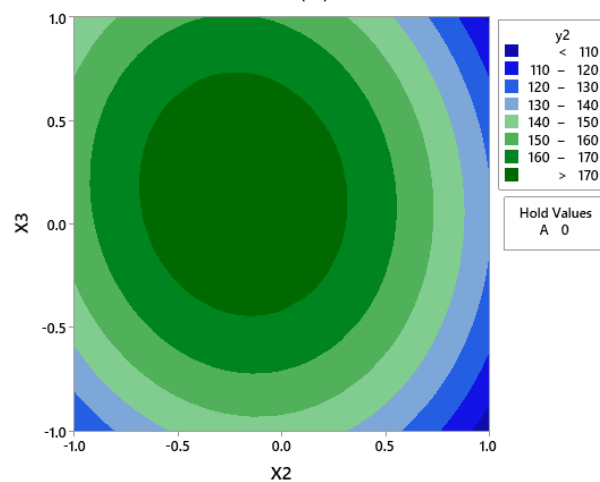
تصف هذه المعادلة المحتوى من المواد الفينولية الكلية كدالة للمتغيرات المشفرة  $X_1$ : زمن الاستخلاص (ساعة)،  $X_2$ : درجة حرارة الاستخلاص (°C)،  $X_3$ : نسبة المواد الصلبة إلى المذيب (g/mL) ويوضح الشكل (6) مخطط Contour لـ TPC كدالة للمتغيرين ( $X_1$ ) و ( $X_2$ ). ويوضح الشكل (7) مخطط Contour لـ TPC كدالة للمتغيرين ( $X_1$ ) و ( $X_3$ ). ويوضح الشكل (4) مخطط Contour لـ TPC كدالة للمتغيرين ( $X_2$ ) و ( $X_3$ ).



(i)



(ب)



(ج)

الشكل (٤): (أ): مخطط Contour لـ Y2 (TPC) كدالة للمتغيرين  $(X_1)$  و  $(X_2)$ ، (ب) مخطط Contour لـ Y2 (TPC) كدالة للمتغيرين  $(X_1)$  و  $(X_3)$ .

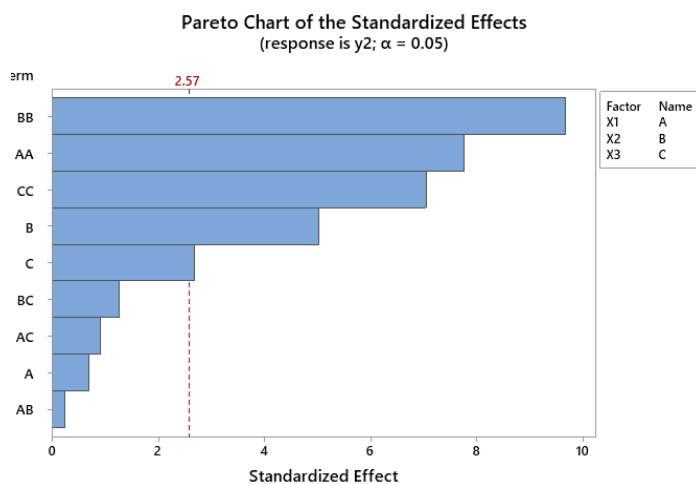
كدالة للمتغيرين  $(X_1)$  و  $(X_3)$  ، (ج) مخطط Contour لـ Y2 (TPC) كدالة للمتغيرين  $(X_2)$  و  $(X_3)$ .

تظهر النتائج أن أعلى محتوى من المواد الفينولية في المستخلصات نتج عند درجة حرارة استخلاص متوسطة وزمن متوسط وعند استخدام نسبة مواد صلبة متوسطة، أي تقريبا في منتصف المجالات المدروسة لتغيرات العوامل المدروسة. وهذه النتائج مماثلة للنتائج التي تم الحصول عليها في دراسة تأثير العوامل على استجابة القدرة المضادة للأكسدة Y1. من أجل تحديد العوامل التي تؤثر بشكل كبير على Y2 أجري تحليل ANOVA للنموذج ولخص في الجدول ٤.

الجدول (4): تحليل ANOVA للنموذج متعدد الحدود Y2 (TPC)

| Source                   | DF | Adj SS  | Adj MS  | F-Value | P-Value |
|--------------------------|----|---------|---------|---------|---------|
| <b>Model</b>             | 9  | 9680.98 | 1075.66 | 23.51   | 0.001   |
| <b>Linear</b>            | 3  | 1498.25 | 499.42  | 10.92   | 0.012   |
| A                        | 1  | 21.13   | 21.13   | 0.46    | 0.527   |
| B                        | 1  | 1152.00 | 1152.00 | 25.18   | 0.004   |
| C                        | 1  | 325.13  | 325.13  | 7.11    | 0.045   |
| <b>Square</b>            | 3  | 8072.23 | 2690.74 | 58.81   | 0.000   |
| A*A                      | 1  | 2741.77 | 2741.77 | 59.93   | 0.001   |
| B*B                      | 1  | 4268.31 | 4268.31 | 93.30   | 0.000   |
| C*C                      | 1  | 2261.77 | 2261.77 | 49.44   | 0.001   |
| <b>2-Way Interaction</b> | 3  | 110.50  | 36.83   | 0.81    | 0.543   |
| A*B                      | 1  | 2.25    | 2.25    | 0.05    | 0.833   |
| A*C                      | 1  | 36.00   | 36.00   | 0.79    | 0.416   |
| B*C                      | 1  | 72.25   | 72.25   | 1.58    | 0.264   |
| Error                    | 5  | 228.75  | 45.75   |         |         |
| <b>Lack-of-Fit</b>       | 3  | 220.75  | 73.58   | 18.40   | 0.052   |

من خلال قيم P-value ومقارنتها بمخطط باريتو نستنتج أن أكثر العوامل تأثير في الاستجابة Y2 (المحتوى من المواد الفينولية الكلية) هي: X2 و X1 و X3 في الحدود التربيعية والعامل X2 والعامل X3. يشير المعامل الخطي السالب للعامل X2 (درجة الحرارة) إلى وجود ارتباط عكسي بين المتغير المستقل X2 والمتغير التابع Y2.

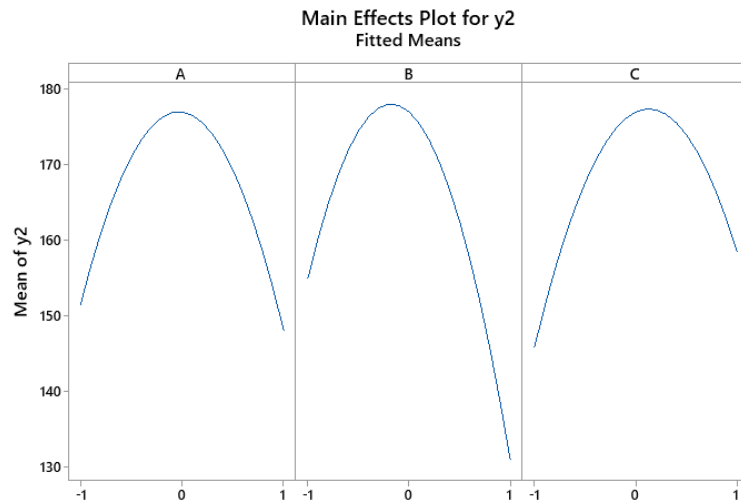


الشكل (٥): مخطط (Pareto) لتأثير عوامل الإدخال على الاستجابة Y2 (TPC)

وتُظهر مخططات التأثيرات الرئيسية في الشكل (٦) أن قيمة Y2 تزداد مع ارتفاع قيمة X2 (درجة حرارة الاستخلاص) وكذلك مع X3 (نسبة المواد الصلبة إلى السائلة) حتى حد معين ثم تصبح العلاقة عكسية مع الارتفاع الإضافي في درجات الحرارة.

وهو ما يتفق مع العديد من الدراسات السابقة التي ذكرت أن المردود من المواد الفعالة المستخلصة يرتفع مع ارتفاع درجة حرارة الاستخلاص حتى يبلغ حد أقصى ثم يعود لينخفض مع أي ارتفاع لاحق لدرجة الحرارة

[22، 23] . وكذلك بالنسبة لزمن الاستخلاص حيث يتيح الزمن الإضافي استخلاص المزيد من المكونات حتى حد أقصى توفر بعده مدة الاستخلاص المطولة فرصة لعمليات التحلل والفساد [24-30] .



الشكل(٦): مخططات التأثيرات الأساسية للاستجابة Y1 (المحتوى من المواد الفيئولية الكلية TPC)

كما تظهر مخططات التأثيرات الأساسية أن المحتوى من المواد الفيئولية ( $Y_2$ ) يزداد مع ازدياد نسبة المواد الصلبة إلى السائلة ( $X_3$ ) حتى حد معين ثم تصبح العلاقة بعد ذلك عكسية وهذا يتفق مع الدراسات السابقة حيث يصبح تدرج التركيز بين المادة الصلبة والجزء الأكبر من السائل أكبر، مما يؤدي إلى تعزيز القوة الدافعة بين الجزيئات وزيادة معدل الانتشار، بالتالي فإن كمية أكبر من المذيبات يمكن أن تدخل الخلايا النباتية، بينما يمكن أن تتخلل المزيد من المركبات الفيئولية في المذيب؛ وبالتالي تزيد العائد الفيئولي الإجمالي [ 38، 37 ] .

### 3.5 التَّحَقُّقُ مِنَ النَّمَاذِجِ التَّنْبُؤِيَّةِ إِحْصَائِيًّا:

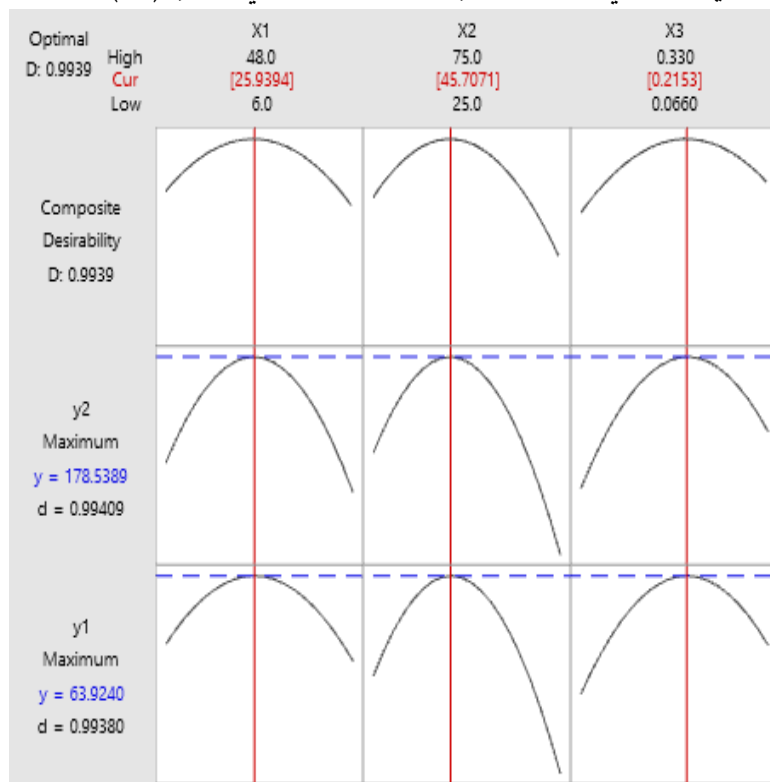
يُستخدَمُ تحليُّلُ التَّبَايُنِ (ANOVA) لِلتَّحَقُّقِ فِيمَا إِذَا كَانَ النَّمُوذَجُ الرِّيَاضِيَّ يَصِفُ المَجَالِ التَّجْرِيبيِّ المَدْرُوسَ بِشَكْلِ مُرَضٍ وَيُشِيرُ نُمُوذَجُ الانحدار الكبير، ونقص الملاءمة غير المعنوي إلى النَّمُوذَجِ الرِّيَاضِيَّ الملائم تمامًا للبيانات التجريبية [40,39].

كَانَتِ القِيَمُ الَّتِي تَمَّ الحُصُولُ عَلَيْهَا لمُعَامَلَاتِ التَّحْدِيدِ ( $R^2$ ) لـ  $Y_1$  (95.97%) و لـ  $Y_2$  (99.07%) عَلَى التَّوَالِي. وَمِنَ المَلاحَظِ أَنَّ مُعَامَلَاتِ ( $R^2$ ) أَكْبَرَ مِنْ (80%). بَيْنَمَا، لَمْ يَكُنْ لِعَدَمِ المَلاءِمَةِ (LOF) قِيَمَةٌ (F) كَبِيرَةٌ فِي كِلَا النَّمُوذَجِينَ، أَي لَمْ يَكُنْ (LOF) ذَا أَهْمِيَّةٍ إِحْصَائِيًّا. وَالنَّتَائِجُ المَذْكُورَةُ أَعْلَاهُ أَكَّدَتِ كِفَايَةَ النَّمُوذَجِينَ.

### 4.5 أمثلة وتحسين عملية الاستخلاص:

يُعَدُّ تَحْدِيدُ الطَّرُوفِ التَّجْرِيبيَّةِ المُتَلَى الَّتِي تُنتِجُ أَفْضَلَ مَرْدُودٍ فِي العَمَلِيَّاتِ الكِيمِيائِيَّةِ، وَالصَّنَاعَاتِ العِدَائِيَّةِ أَحَدَ أَهَمِّ الأَدْوَارِ الرِّئِيسِيَّةِ لِلتَّصْمِيمِ التَّجْرِيبيِّ. وَلِهَذَا الهَدَفُ تَمَّ تَطْبِيقُ طَرِيقَةِ الإِسْتِجَابَةِ المُتَعَدِّدَةِ لِإِجْرَاءِ النِّحْسِينِ العَدِيدِ لِهَدْفَيْنِ (استجابتين  $Y_1$  و  $Y_2$ ) فِي الوَقْتِ نَفْسَهُ، بِاسْتِخْدَامِ دَالَّةِ الأَمثَلِيَّةِ (D)، وَالَّتِي تَتَرَاوَحُ قِيَمَتُهَا مِنْ: صِفْرِ خَارِجِ الحُدُودِ، إِلَى القِيَمَةِ: وَاحِدٍ عِنْدَ الهَدَفِ [٤١]. اعْتُمِدَ، فِي دَراسَتِنَا الحَالِيَّةِ، أُسَاسٌ مَنهَجِيَّةٌ لِلنِّحْسِينِ (RSM) بِهَدَفِ تَحْسِينِ كُلِّ مِنَ المَحْتَوَى الفِئُولِيِّ، وَالقُدْرَةَ المُضَادَّةَ لِلأكْسِدَةِ لِلْمُسْتَخْلَصَاتِ مِنْ خِلَالِ

تَحْدِيدِ شُرُوطِ الإِسْتِخْلَاصِ المُثَلَّى. وَاسْتِخْدَامَ بَرْنَامِجِ التَّحْلِيلِ الإِحْصَائِيِّ (Minitab 19) لِتَحْدِيدِ الشُّرُوطِ المُثَلَّى لِلْمُتَغْيِرَاتِ ( X1 و X2 و X3)، مِنْ خِلَالِ تَعْظِيمِ دَالَّةِ الأَمْتَلِيَةِ المُركَّبَةِ (D). وَاخْتِيارِ الحَلِّ الأَمْتَلِيِّ بِنَاءً عَلَى أَقْرَبِ قِيَمِ (D) لِ (١)، وَالَّذِي يَظْهَرُ فِي مُنْحَنِيَّاتِ الحَلِّ الأَمْتَلِيِّ المُوضَّحَةِ فِي الشُّكْلِ (١١).



الشكل (٧): منحنيات الحل الأمثل

من الشُّكْلِ (٧) نجدُ أنَّ أفضلَ قِيَمٍ لِـ (X1) و (X2) و (X3) بِقِيَمَةِ استِصوابِ (أمتلية) تساوي واحد (D = 99.3%) والتي تَدُلُّ عَلَى الحَلِّ الأَمْتَلِيِّ، كَانَتْ (25.9 h) و (45.7°C) و (0.21 g/mL) عَلَى التَّوَالِي، وَالَّتِي تَعْطِي أَفْضَلَ قِيَمِ تَنْبُوِيَّةٍ لِـ (Y1) و (Y2) فِي ظِلِّ الطَّرُوفِ المُثَلَّى وَهِيَ (63.92%) و (178.54 mgGAE / 100 g dw)، عَلَى التَّوَالِي.

#### ٥،٥ التَّحَقُّقُ مِنَ الحَلِّ الأَمْتَلِيِّ تَجْرِيْبِيًّا:

أُجْرِيَتْ تَجْرِبَةٌ الإِسْتِخْلَاصِ لِرُوزِمَاتِ نَبَاتِ السَّعْدِ المَجْفُفَةِ بِاسْتِخْدَامِ القِيَمِ المُثَلَّى التَّنبُوِيَّةِ لِلْعَوَامِلِ المُؤَثِّرَةِ عَلَى العَمَلِيَّةِ، وَالَّتِي حُصِّلَ عَلَيْهَا بِاسْتِخْدَامِ دَالَّةِ الأَمْتَلِيَةِ (D) وَذَلِكَ لِمُقَارَنَةِ النُّتَاجِ التَّجْرِيْبِيَّةِ مَعَ النُّتَاجِ التَّنبُوِيَّةِ لِلنَّمَاذِجِ المُوضَّحَةِ فِي الجَدُولِ (٥).

#### الجَدُولُ (٥): التَّحَقُّقُ التَّجْرِيْبِيِّيُّ مِنَ الحَلِّ الأَمْتَلِيِّ

| الحل | مُتَغْيِرَاتِ العَمَلِيَّةِ |                      |                        | القِيَمِ التَّنبُوِيَّةِ |                       |        | القِيَمِ التَّجْرِيْبِيَّةِ (± SD) |                           | فَوَاصِلِ التَّنبُوِ PI 95% |                     |
|------|-----------------------------|----------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------|--------|------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------|
|      | X <sub>1</sub><br>h         | X <sub>2</sub><br>°C | X <sub>3</sub><br>g/mL | Y <sub>1</sub><br>DPPHsc | Y <sub>2</sub><br>TPC | D<br>% | Y <sub>1</sub><br>%                | Y <sub>2</sub><br>mg/100g | Y1<br>%                     | Y2<br>mg/100g       |
| 1    | 25.9                        | 45.7                 | 0.21                   | 63.92                    | 178.5                 | 99     | 61.75±<br>0.7                      | 175.8<br>±0.8             | (54.16;<br>73.69)           | (166.08;<br>191.00) |

بنتيجة اختبارات التحقق التجريبي من الحل الأمثل حصلنا على قيم استجابات قريبة من القيم التي تتبأ بها النموذج الذي تم الحصول عليه من خلال تطبيق منهجية سطح الاستجابة حيث بلغ المحتوى الفينولي تجريبياً  $175.8 \text{ mg}/100\text{g}$  مقابل قيمة تنبؤية من النموذج  $178.5 \text{ mg}/100\text{g}$ ، وبلغت القدرة على تثبيط جذور DPPH تجريبياً  $61.75\%$  مقابل قيمة تنبؤية  $63.92\%$ . مما يدل على صحة الحل الأمثل وكفاءة النموذج في أمثلة عملية الاستخلاص.

## 6. الاستنتاجات:

- بينت نتائج الدراسة أن مستخلصات (*C. esculentus*) تشكل مصدراً للمركبات الفينولية ذات القيمة الصيدلانية ومضادات الأكسدة القوية ذات القدرة على كسح الجذور الحرة (DPPH). ويمكن استخدامها في الصناعات الغذائية، والأدوية كمغذيات وظيفية.
- أدى تطبيق منهجية سطح الاستجابة (RSM) إلى تمثيل عملية استخلاص المواد الفينولية ومضادات الأكسدة من نبات (*C. esculentus*) بنموذجين رياضيين بثلاثة متغيرات مستقلة وهي زمن الاستخلاص (X1)، درجة حرارة الاستخلاص (X2) ونسبة المادة الصلبة إلى السائلة (X3) وأشارت النتائج إلى أن أفضل قيم لـ (X1) و (X2) و (X2) بقيمة أمثلية تساوي ( $D = 99.3\%$ ) والتي تدل على الحل الأمثل، كانت ( $25.9 \text{ h}$ ) و ( $45.7^\circ\text{C}$ ) و ( $0.21 \text{ g}/\text{mL}$ ) على التوالي، والتي تعطي أفضل قيم تنبؤية للقدرة المضادة للأكسدة (Y1) والمحتوى من المواد الفينولية (Y2) في ظل الظروف المثلى وهي ( $63.92\%$ ) و ( $178.54 \text{ mgGAE}$ ) و ( $100 \text{ g dw}$ ) على التوالي، وبينت اختبارات التحقق التجريبي من الحل الأمثل صحته وكفاءة النماذج في تمثيل عملية الاستخلاص.

## 7. التوصيات:

- تُوصي الدراسة باستخدام النماذج التي تم الحصول عليها لوصف الفضاء التجريبي وتحسين عملية استخلاص الفينولات ومضادات الأكسدة من (*C. esculentus*) باستخدام الماء. وزيادة الاهتمام باستخدام علم تصميم التجارب متعدد المتغيرات (DOE) والنمذجة الرياضية في اختصار الوقت والتكلفة في الأعمال البحثية.
- استكمال الدراسات البحثية واختبار طريقة الاستخلاص المتتابع لتحديد الأطوار الأكثر فعالية.
- اختبار فعالية نبات (*C. esculentus*) المضادة للأكسدة في الجسم الحي *In vivo*.

## ٨. المراجع:

1. Sindhi, V.; Gupta, V.; Sharma, K.; Bhatnagar, S.; Kumari, R.; and Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants - A review. *Int Res J Pharm.*; 7(9): 828-835.
2. Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; and Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacog Rev.*; 4(8): 118-126.
3. Barlow, S.; and Schlatter, J.(2010). Risk assessment of carcinogens in food. *Toxicol Appl Pharmacol.*; 243(2):180-190.
4. Yang, X.; Yan, F.; Huang, S.; and Fu, C. (2014). Antioxidant activities of fractions from longan pericarps. *Food Sci Technol.*; 34(2): 341-345.
5. Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, N. (2010). Chandra Free radicals, antioxidants and functional foods. impact on human health *Pharm. Rev*; 4 (2010): p. 118.
6. Stefkov, G.; Miova, B.; Dinevska-Kjovkarovska, S.; Stanoeva, JP.; Stefova, M.; Petrussevska, G.; and Kulevanova, S. (2014). Chemical characterization of *Centaurium erythrea L.* and its effects on carbohydrate and lipid metabolism in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol.*;152(1) :71-77.
7. Aberham, A.; Pieri, V.; Croom, EM.; Ellmerer, E.; and Stuppner, H. (2011). Analysis of iridoids, secoiridoids and xanthenes in *Centaurium erythraea*, *Frasera caroliniensis* and *Gentiana lutea* using LC-MS and RP-HPLC. *J Pharm Biomed Anal.*;54(3) :517-525.
8. Edo, G. I.; Onoharigho, F. O.; Jikah, A. N.; Oloni, G. O.; Samuel, P. O.; Rapheal, O. A.; Ikpekoru, O.; Akpogheli, P. O.; Agbo, J. J.; Ekokotu, H. A.; Ugbune, U.; Ezekiel, G. O.; Abere, G. A.; Oghrora, E. E.; Ojulari, A. E.; Okoronkwo K. A.; Owhero, J. O.; and Akpogheli, E. O. (2023). *Cyperus esculentus* (tiger nut): An insight into its bioactive compounds, biological activities, nutritional and health benefits. *Food Chemistry Advances*. Volume 3:100511
9. Asare, P. A.; Kpankpari, R.; Adu, M. O.; Afutu, E.; and Adewumi, A. S. (2020). Phenotypic Characterization of Tiger Nuts (*Cyperus esculentus L.*) from Major Growing Areas in Ghana. *Scientific World Journal*. 7:2020:7232591. doi: 10.1155/2020/7232591. eCollection 2020.
10. Metsämuuronen, S.; Sirén, H. (2019). Bioactive phenolic compounds, metabolism and properties: A review on valuable chemical compounds in Scots pine and Norway spruce. *Phytochemistry Reviews*, 18 (3): pp. 623-664, 10.1007/s11101-019-09630-2
11. Codina-Torrella, I.; Guamis, B.; Trujillo A.J. (2015). Characterization and comparison of tiger nuts (*Cyperus esculentus L.*) from different geographical origin. *Physico-chemical characteristics and protein fractionation. Industrial Crops and Products*; 65: pp. 406-414, 10.1016/j.indcrop.2014.11.007
12. Samuel, P.O.; Edo, G.I.; Emakpor, O.L.; Oloni, G.O.; Ezekiel, G.O.; Essaghah, A.E.A.; et al. (2024). Lifestyle modifications for preventing and managing cardiovascular diseases. *Sport Sci Health* 20: 23-36. 10.1007/s11332-023-01118-z
13. Yolmeh, M. and Jafari SM. (2017). Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. *Food Bioproc Tech.*;10: 413-433.

14. Azmir, J.; Zaidul, ISM.; Rahman, MM.; Sharif, KM.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M. H. A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N. A. N.; and Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng.* ;117(4) :426–436.
15. Bezerra, M.A.; Santelli, R.E.; Oliveira, E.P.; Villar, L.S.; and Escaleir, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*.;76(5): 965–977.
16. Stamenković, O.S.; Kostić, M.D.; Radosavljević, D.B.; Veljković, V.B. (2018). Comparison of box-behnken, face central composite and full factorial designs in optimization of hempseed oil extraction by n-hexane: a case study. *Period. Polytech. Chem. Eng.*; 62: pp. 359-367.
17. Skerget, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; Hraš, A.R.; Simonič, M.; Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.*89(2): 191–198.
18. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm Wiss Technol*, 28(1): 25-30.
19. Derringer, G.; Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables, *J. Qual. Technol.* 12(4): 214–219.
20. Abid, S; Messadi, R.; Hassine, T.; Ben Daly, H.; Soulestin, J.; Lacrampe, M.F. (2019). Optimization of mechanical properties of printed acrylonitrile butadiene styrene using RSM design. *Int J Adv Manuf Technol.* 100: 1363–1372.
21. Sergio L.C. Ferreira, Valfredo A. Lemos, Vanessa S. de Carvalho, Erik G.P. da Silva, Antonio F.S. Queiroz, Caio S.A. Felix, Daniel L.F. da Silva, Gilson B. Dourado, Rafael V. Oliveira. (2018). Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. *Microchemical Journal.* Volume 140: Pages 176-182.
22. Tanvir Ahmed, Md Rahmatuzzaman Rana, Mahjabin Rahman Maisha, A.S.M. Sayem, Mizanur Rahman, Rowshon Ara. (2022). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic content & antioxidant activity of hog plum (*Spondias pinnata* L. f. kurz) pulp by response surface methodology. *Heliyon*; 8(10): e11109
23. Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933–956.
24. VSilva, L.; Nelson, D.L.; Drummond, M.F.B.; Dufosse, L.; Gloria, M.B.A. (2005). Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric, *Food Res. Int.* 38: 1087–1096.
25. Spigno, G.; DeFaveri, D.M. (2007). Antioxidants from grape stalks and marc: influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts, *J. Food Eng.* 78: 793–801.
26. Telli, A.; Mahboub, N.; Boudjeneh, S.; Siboukeur, O.E.K.; Moulti-Mati, F. (2010) Optimisation des conditions d'extraction des polyphenols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L.) variété ghars, *Ann. Des Sci. Technol.* 2: 107–114. <https://journals.univ-ouargla.dz/index.php/AST/article/view/1309/896>.
27. Chavan, Y.; Singhal, R.S. (2013) Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu* L.) and optimization study using response surface methodology, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 17: 106–113.

28. Naczka, M.; Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food, *J. Chromatogr. A* 1054: 95–111.
29. Naczka, M.; Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*; 41: 1523–1542.
30. Drużyńska, B.; Stępniewska, A.; Wołosiak, R. (2007). The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts, *ACTA Sci. Pol. Technol. Aliment.*; 6: 27–36.
31. Bouyahya, A.; Bakri, Y.; Belmehdi, O.; Et-Touys, A.; Abrini, J.; and Dakka, N. (2017). Phenolic extracts of *Centaurium erythraea* with novel antiradical, antibacterial and antileishmanial activities. *Asian Pac J Trop Dis.*; 7(7) : 433–439.
32. Đorđević, M.; Mihailović, M.; Jovanović, JA.; Grdović, N.; Uskoković, A.; Tolić, A.; Sinadinović, M.; Rajić, J.; Mišić, D.; Šiler, B.; Poznanović, G.; Vidaković, M.; and Dinić, S. (2017). *Centaurium erythraea* methanol extract protects red blood cells from oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.*; 202: 172–18.
33. Zam, W.; Ali, A.; Saleem, D.; Alali, .(٢٠٢١) Optimization of phenolics and antioxidants extraction from *Centaurium erythraea* using response surface methodology .*Research Journal of Pharmacy and Technology* 14 (12), 6455-6462
34. Su, L.; Wang, S.; Jing, S. (2017). Preliminary study on microcirculation and anticoagulant activity of alcohol extract of *Cyperus* (*Cyperus esculentus* L.). *Food Ind.*, 38, 200–203.
35. Willis, S.; Jackson, C.; Verghese, M. (2019). Effects of processing on antioxidant capacity and metabolizing enzyme inhibition of tiger nut tubers. *Food Nutr. Sci.*; 10: 1132–1141.
36. Badejo, A.A.; Olawoyin, B.; Salawu, S.O.; Fasuhanmi, O.S.; Boligon, A.A.; Enujiugha, V.N. (2017). Antioxidative potentials and chromatographic analysis of beverages from blends of glutenfree acha (*Digitaria exilis*) and tiger nut (*Cyperus esculentus*) extracts. *J. Food Meas. Charact.*; 11: 2094–2101.
37. Fan, Z.; Li, L.; Bai, X.; Zhang, H.; Liu, Q.R.; Zhang, H.; Fu, Y.J.; Moyo, R. (2019). Extraction optimization, antioxidant activity, and tyrosinase inhibitory capacity of polyphenols from *Lonicera japonica*. *Food Sci Nutr.*; 7(5): 1786 – 1794.
38. Prasad, K.N.; Yang, E.Y.; Yi, C.; Zhao, M.; Jiang, Y. (2009). Effects of high pressure on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 10(2): 155–159.
39. Bezerra, M.A.; Lemos, V.A.; Novaes, C.G.; Jesus, R.M.; Filho, H.R.S.; Araújo, S.A.; Alves, J.P.S. (2020). Application of mixture design in analytical chemistry. *Microchem J.* 152 : 104336–104349.
40. Joglekar, A.M.; May, A.T. (1987). Product excellence through design of experiments. *Cereal Food World.* 32(12): 857–868.
41. Derringer, G.; Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables, *J. Qual. Technol.* 12(4): 214–219.