

## استخراج کیفی و کمی استویوزید از گیاه دارویی *Stevia rebaudiana* Bertoni. با استفاده از روش فاز جامد قالب مولکولی

سمیه آقاییک<sup>۱</sup>، مازیار احمدی گلسفیدی<sup>۲\*</sup>، محمدهادی سلیمانی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>دکتر گروه شیمی، دانشکده علوم، واحد گرگان، دانشگاه آزاد داسلامی، گرگان، ایران

<sup>۳</sup>داروسازی گیاه اسانس، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۰۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۱۹

### چکیده

گیاه استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni حاوی شیرین کننده استویول، گلیکوزیدی بدون کالری است که با اثر بر تنظیم میزان قند خون به خصوص در بیماران دیابتی به عنوان یک داروی موثر عمل می‌نماید. هدف از انجام این تحقیق دستیابی به یک روش نوین جهت جداسازی کیفی و کمی استویوزید به عنوان شیرین کننده بدون کالری از گیاه دارویی استویا می‌باشد. در این تحقیق نمونه برگهای خشک شده گیاه استویا در شهریورماه ۱۳۹۴ از شرکت تولید کننده گلزاران شمال تهیه شد. به منظور استخراج استویوزید علاوه بر روش HPLC و پلاروگرافی، یک فاز جامد قالب مولکولی مناسب تهیه و سپس برخی از عوامل موثر بر استخراج توسط این روش نوین، بهینه سازی گردید. برای تهیه پلیمر استخراج‌گر، از یک مونومر عاملی اکریلاتی و یک اتصال دهنده عرضی استفاده شد. نسبت کمی اجزای تشکیل دهنده پلیمر و همچنین تاثیر درجه ریز شدگی فاز استخراج‌گر بر راندمان استخراج نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین درصد بازدهی استخراج استویوزید در نسبت ۱ به ۵ از مقدار مونومر عاملی به مقدار اتصال دهنده عرضی و بهترین درجه ریز شدگی این استخراج‌گر ۱۰۰۰ میکرون به دست آمد و میزان استویوزید نیز ۱۱،۱۶ درصد وزنی گزارش گردید.

**واژه‌های کلیدی:** استخراج فاز جامد، استویا، استویوزید، پلیمر قالب مولکولی، پلاروگرافی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

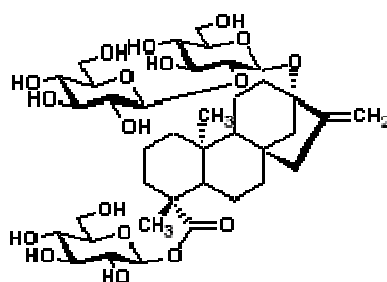


## مقدمه

می‌دهد. علاوه بر استویوزید تاکنون چندین ترکیب شیرین مانند استویوزید، ربادیوزاید A، ربادیوزاید B، ربادیوزاید C، ربادیوزاید D، ربادیوزاید E و دوالکوزید A از استویا جداسازی و استخراج شده‌اند (Anvari and Khayati, 2016).

مطالعات سم شناسی پل و همکاران (Pol et al., 2007) نشان می‌دهد که ماده موثره استویوزید فاقد عوارض جهش زای ژنتیکی و سرطانی می‌باشد. گلیکوزیدهای موجود در استویا دارای ویژگی‌های بیولوژیکی ارزشمندی است که مصرف منظم این ترکیبات میزان قند و کلسترول خون را کاهش داده و باعث احیای بافت سلولی و انعقاد خون می‌گردد (Atteh et al., 2007).

گیاه استویا با نام علمی *Stevia Rebaudiana* Bertoni متعلق به تیره آفتابگردان (Asteraceae) و بومی پاراگوئه و برزیل می‌باشد (Gardana et al., 2003). برگ‌های استویا محل ذخیره ۸ گلیکوزید استویول می‌باشد (Brandle and Telmar, 2007). گلیکوزید استویول ترکیب‌های شیرینی هستند که از گیاه استویا استخراج می‌شوند. استویوزید و ربادیوزاید A، دو گلیکوزید معروف و مهم در این گیاه می‌باشند. برگ گیاه استویا حدود ۳۰۰ برابر شیرین‌تر از ساکاروز می‌باشد. استویوزید به‌عنوان یک گلیکوزید متشکل از ۳ مولکول گلوکز متصل به یک آگلیکون توصیف می‌شود (Mondase et al., 2012). شکل ۱ ساختار شیمیایی گسترده استویوزید را نشان



شکل ۱: ساختار شیمیایی استویوزید (شیرین‌کننده بدون کالری)

در حال حاضر روش‌های متعددی جهت استخراج گلیکوزیدهای استویول توسط محققین با استفاده از تکنیک‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته‌است، از قبیل ماسراسیون و استفاده از حلال‌های مختلف (Lorenzo et al., 2014)، استخراج مایع تحت فشار (Teo et al., 2009) استخراج به وسیله مایع داغ (Pol et al., 2007)، استخراج به کمک امواج فراصوت (Puri et al., 2013)، استخراج توسط سیستم‌های دوفازی آبی با کولین کلرید (Abolghasembeyk et al., 2016) استخراج به کمک ریزموج (Yildiz et al., 2016).

در سال‌های اخیر از روش استخراج فاز جامد آبی به اختصار SPE در جداسازی ترکیبات مهم طبیعی و شیمیایی استفاده‌های زیادی شده است (Andrade-Eiroa et al., 2016). استخراج فاز جامد روشی است که در آن از یک فاز جامد و یک فاز مایع برای

در حال حاضر روش‌های متعددی جهت استخراج گلیکوزیدهای استویول توسط محققین با استفاده از تکنیک‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته‌است، از قبیل ماسراسیون و استفاده از حلال‌های مختلف (Lorenzo et al., 2014)، استخراج مایع تحت فشار (Teo et al., 2009) استخراج به وسیله مایع داغ (Pol et al., 2007)، استخراج به کمک امواج فراصوت (Puri et al., 2013)، استخراج توسط سیستم‌های دوفازی آبی با کولین کلرید (Abolghasembeyk et al., 2016) استخراج به کمک ریزموج (Yildiz et al., 2016).

## 2. Solid Phase Extraction

## 1. PHWE (Power Heat Water Extraction)

این روش در نمونه‌های طبیعی صورت پذیرفت. در این تحقیق جهت بررسی کارایی روش برای اولین بار از دستگاه پلازموگرافی به منظور سنجش استویوزید بهره گرفته شد.

#### مواد و روش‌ها

**تهیه برگ‌های گیاه استویا:** به منظور تهیه برگ خشک این گیاه، ابتدا مقدار ۱۰ کیلوگرم از گیاه استویا که توسط یکی از تولید کنندگان آن در شمال کشور (شرکت گلزاران شمال) به صورت کشت بافت تکثیر و پرورش یافته بود در شهریور سال ۹۴ خریداری شد. سپس برای خشک کردن به آزمایشگاه تحقیق و توسعه شرکت داروسازی گیاه اسانس منتقل شدند و پس از شستشوی با آب مقطر تحت دمای ۴۵ درجه به مدت ۳ ساعت در دستگاه خشک کن تحت عملیات خشک کردن قرار گرفتند. سپس مقدار یک کیلوگرم از برگ سبز و خشک شده گیاه در آسیاب صنعتی در حد بسیار ریز آسیاب شدند (Deshmukh et al., 2014). از این گیاه برای کلیه نمونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق استفاده شد.

**عصاره‌گیری به روش ماسراسیون** (Brandle et al., 2007): برگ‌های خشک شده گیاه استویا را پودر کرده و ۱ گرم از پودر خشک شده با ۱۰ میلی‌لیتر متانول خالص خیسانده شد و به مدت ۳ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. سپس با کاغذ صافی صاف شد.

**آماده‌سازی محلول استاندارد استویوزید و تهیه فاز جامد استخراج کننده استویوزید:** از آنجایی که این روش برای اولین بار برای استخراج استویوزید به کار می‌رود لذا مقادیر مواد اولیه متناسب با استوکیومتری واکنش‌ها در پلیمرزاسون انتخاب شدند. مقدار نیم میلی‌لیتر از متا اکریلیک اسید (MAA) (خریداری شده از شرکت Sigma-Aldrich) به عنوان مونومر عاملی و ۲/۵ میلی‌لیتر از اتیلن گلیکول دی متیل اکریلات

جداسازی یک ترکیب طبیعی یا شیمیایی به صورت محلول استفاده می‌شود. یکی از دلایل استفاده از استخراج فاز جامد، استخراج گزینش‌پذیر آن است (Plotka-Wasylika et al., 2016). در این تکنیک، ماده موثره مورد نظر از فاز مایع به درون فاز جامد استخراج می‌گردد. اخیراً روش پلیمرهای قالب مولکولی یا MIP یکی از قویترین تکنیک‌ها جهت استخراج و جداسازی ترکیبات طبیعی معرفی شده‌اند (Ashley et al., 2017). این نوع استخراج برای تهیه ترکیبات طبیعی، استخراج و پیش تغلیظ داروها، ترکیبات طبیعی، آلاینده‌ها از محیط، مواد بیولوژیکی، مواد غذایی و نمونه محصولات غذایی و آشامیدنی به کار می‌رود (Brandle et al., 2007).

در روش استخراج با MIP بین گروه‌های عاملی مولکول هدف (الگو) با گروه‌های عاملی مونومر، یک واکنش بین مولکولی ایجاد می‌شود و سایت‌های تشخیصی حاصل می‌گردند. این سایت‌ها تحت واکنش پلیمرزاسیون مونومرهای عاملی با غلظت بالایی از اتصال دهنده عرضی محکم می‌شوند. پس از آن توسط حلال شویی مولکول الگو حذف می‌شود (Sarhan, 1972). پلیمر بدست آمده قالب مولکولی یا MIP نامیده می‌شود (Quaglia et al., 2001). این روش گاما و همکاران (Gama et al., 2016) به طور بالقوه در تحقیقات استخراجی زیادی از قبیل جداسازی مولکول کایرال (Ebarvia et al., 2004) بیوسنسورها (Tianwei et al., 2001)، جداسازی ترکیبات بیوشیمیایی، شبیه‌سازی آنتی‌بادی و شبیه‌سازی تجزیه آنزیم‌ها (Ye and Mosbach, 2001) استفاده شده است. این تحقیق با هدف تهیه یک فاز جامد استخراج کننده بر پایه پلیمر قالب مولکولی برای استخراج استویوزید از گیاه دارویی استویا انجام شد و مهمترین عوامل موثر بر آن بهینه سازی شد و در نهایت ارزیابی

#### 1. Molecularly Imprinted Polymers

کننده با شستشو توسط ۳ میلی لیتر متانول صورت گرفت. محلول نهایی شامل شیرین کننده است و برای آنالیز با دستگاه پلاروگرافی با ۲۵ میلی لیتر محلول یک مولار  $\text{SO}_4\text{H}_2$  (خریداری شده از Merck) تحت عملیات رفلکس آماده سازی شد. پس از آنالیز با دستگاه پلاروگرافی نتایج حاصل مورد تحلیل قرار گرفتند. برای سنجش توسط دستگاه HPLC نیازی به عملیات آماده سازی با سولفوریک اسید نمی باشد.

**شرایط دستگاه پلاروگرافی:** در این تحقیق تمام اندازه گیری های کمی و کیفی الکتروشیمیایی توسط دستگاه پلاروگرافی (797 شرکت Metrohm) با سیستم سه الکترودی انجام پذیرفت. الکترود قطر جیوه (DME) به عنوان الکترود کار، الکترود کالومل اشباع (SCE) به عنوان الکترود مرجع و الکترود کمی میله نازک پلاتین انتخاب گردید.  $0/25$  میلی لیتر از محلول (عصاره یا استاندارد) به حجم  $20$  میلی لیتر رقیق شد و به کمک روش افزایش استاندارد و تکنیک پلاروگرافی پالسی در دمای اتاق مورد آنالیز کمی قرار گرفت. محلول استاندارد استفاده شده در این آنالیز  $1$  ml از محلول  $100$  ppm در هر مرحله بود. لازم به ذکر است قبل از انجام آنالیز، محلول آماده آزمایش به مدت  $5$  دقیقه توسط ورود گاز نیتروژن، اکسیژن زدایی شد. پارامترهای دستگاهی جهت آنالیز به صورت ذیل تنظیم گردید: دامنه پتانسیل (از  $0/1$  تا  $0/7$  ولت)، سرعت اسکن  $10$  میلی ولت بر ثانیه.

**شرایط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا HPLC:** جداسازی و اندازه گیری آنالیت مورد نظر توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا ساخت شرکت (Berlin Zehlendorf, Germany) knauer انجام گرفت. این دستگاه مجهز به آشکارساز فرابنفش مدل K-2600، ستون مدل Perfectsil RP-18 (4.6mm diameter, 250mm length, ODS 3-5m) بود. یک محافظ ستون RP-18 به صورت جریان مستقیم روی ستون نصب شده بود. پمپ چهار کاناله

EGDMA (خریداری شده از شرکت Sigma-Aldrich) به عنوان اتصال دهنده عرضی،  $0/4024$  میلی مول معادل  $323/9$  میلی گرم از استویوزید استاندارد به عنوان مولکول الگو و  $0/05$  گرم آغازگر آزوبیس بوتیرونیتریل (AIBN) (خریداری شده از شرکت Sigma-Aldrich) اضافه شد و به مدت  $10$  دقیقه گاززدایی انجام شد. سپس  $20$  دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار داده شد. مقدار  $0/1$  گرم از نانولوله کربنی نیز جهت بهینه سازی استخراج به مخلوط فوق اضافه شده و به مدت  $20$  دقیقه دیگر در حمام اولتراسونیک همگن گردید (Ma et al., 2017) پس از آن جهت انجام فرایند پلیمریزاسیون به مدت  $24$  ساعت در مقابل تشعشع لامپ UV با طول موج  $330$  نانومتر و در دمای  $4$  الی  $8$  درجه سانتی گراد ترک شد. سپس مرحله حذف مولکول الگو (استویوزید) با استفاده از حلال شویی انجام می شود. این مرحله با اضافه کردن حلال (متانول و اسید استیک به نسبت  $9/1$ ) به پلیمر به نسبت  $10$  ml به  $1$  gr به مدت  $24$  ساعت تحت رفلکس ادامه یافت. بعد از آن محلول توسط کاغذ صافی صاف شده و مجدد با متانول خالص به مدت  $24$  ساعت مرحله خروج الگو تحت همان شرایط رفلکس ادامه پیدا کرد. پس از اتمام عملیات رفلکس فاز جامد با متانول شستشو داده و در هوای آزاد خشک گردید. جاذب تهیه شده توسط هاون چینی به ذرات ریز خرد شد و با غربال توری سیمی به مش های میانگین اندازه  $1000$  و  $2000$  میکرومتر دسته بندی و همگن شدند.

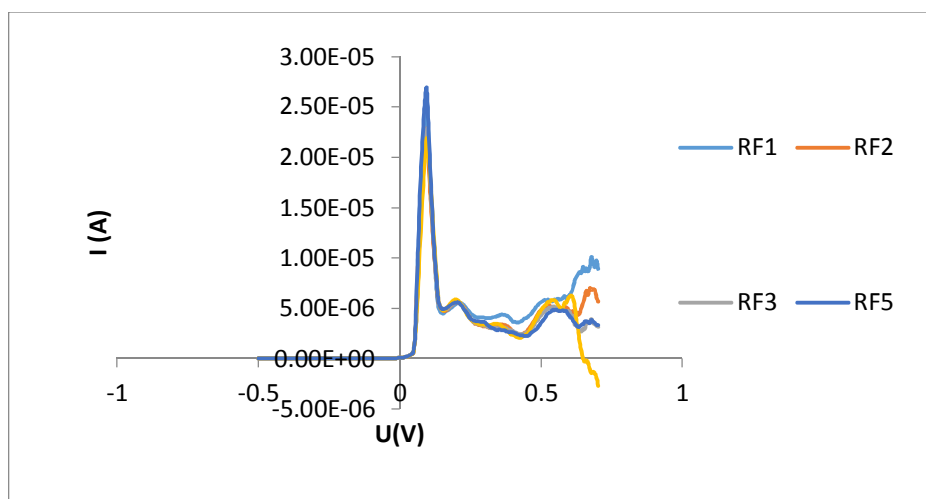
به منظور عملیات استخراج شیرین کننده بدون کالری استویوزید، مقدار  $0/1$  گرم از فاز جامد استخراجی تهیه شده با  $10$  میلی لیتر محلول عصاره هیدروالکلی گیاه استویا یا محلول استاندارد استویوزید  $10$  ppm به مدت  $20$  دقیقه درون یک بشر به همراه مگنت هم زده شد. سپس محلول صاف شده و فرایند و جذب مولکول های استویوزید از سطح استخراج

آن، ابتدا سنجش به روش الکتروشیمی و با استفاده از پلاروگرافی انجام پذیرفت. همان‌گونه که در شکل ۲ ملاحظه می‌شود محل سیگنال مربوط به استویوزید استخراج شده توسط پلیمر جاذب استخراج کننده استویوزید MIP در ولتاژ بین ۰/۵ تا ۱ ولت بدست آمده‌اند. در کلیه آنالیزها از یک نوع محلول با غلظت معین جهت افزایش استاندارد و در شرایط برابر استفاده شد.

مدل K-2600 همراه با گاز زدا نیز از جمله متعلقات این سیستم بود. فاز متحرک شامل آب-متانول به نسبت ۸۰-۲۰ بصورت تک توانی بود و عمل آشکارسازی در طول موج ۳۳۰ نانومتر و با سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه انجام پذیرفت.

## نتایج

به منظور بررسی عملکرد فاز جامد استخراج کننده استویول گلیکوزید و تعیین بهترین شرایط متغیرهای



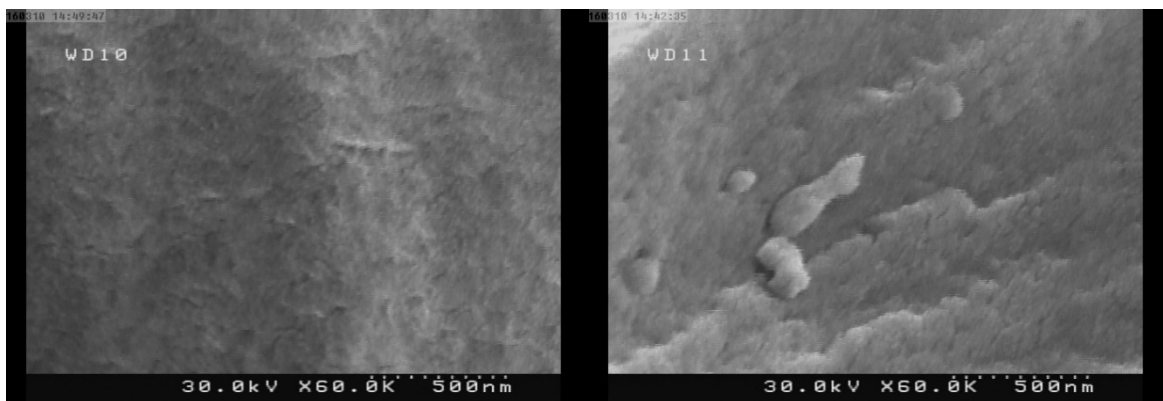
شکل ۲: پلاروگرام نمونه‌های استویوزید استخراج شده توسط فاز جامد قالب مولکولی در شرایط مختلف (دامنه پتانسیل: ۰/۱ تا ۰/۷ ولت)

به‌عنوان نمونه آزمایشگاهی در نسبت MAA به EGDMA مقدار ۰/۲ حاصل شده است. این مقدار بازیافت ۸۰ درصد در بهترین شرایط بدست آمده است. باید خاطر نشان نمود که اغلب در روش‌های استخراج با فاز جامد قالب مولکولی معضل کاستی درصد بازیافت وجود دارد. همچنین تاثیر همزمان دو متغیر (نسبت ترکیب اجزا و اندازه ذرات استخراج کننده) نیز طبق جدول ۱ و شکل ۲ نشان می‌دهد که بهترین درصد بازیافت استویوزید (در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) در نسبت ترکیب MAA/EGDMA برابر با ۰/۲ و اندازه ذرات استخراج کننده قالب

در این پلاروگرام فوق نمودارهای RF1 الی RF5 عبارتند از: نسبت ۰/۲ مونومر به اتصال‌دهنده عرضی، سایز ذرات ۱۰۰۰ میکرون (RF1)، نسبت ۰/۲ مونومر به اتصال‌دهنده عرضی، سایز ذرات ۲۰۰۰ میکرون (RF2)، نسبت ۰/۰۵ مونومر به اتصال‌دهنده عرضی، سایز ذرات ۱۰۰۰ میکرون (RF3)، نسبت ۰/۰۵ مونومر به اتصال‌دهنده عرضی، سایز ذرات ۲۰۰۰ میکرون (RF4)، نسبت ۰/۴ مونومر به اتصال‌دهنده عرضی، سایز ۱۰۰۰ میکرون (RF5).

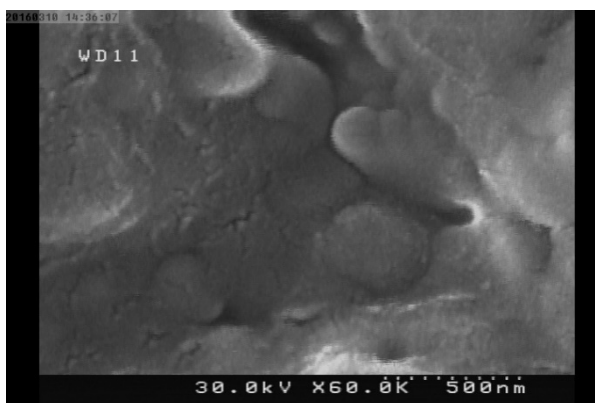
نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که بیشترین درصد بازیافت استویوزید با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر

مولکولی برابر با ۱۰۰۰ میکرومتر حاصل می‌شود. همان‌طور که در تصاویر الکترونی شکل ۳ مشاهده می‌شود. می‌شود سایت‌های قالب دار در فاز جامد استخراج کننده استویوزید تهیه شده‌اند.



ب

الف



ث

شکل ۳: تصویر میکروسکوپ الکترونی بدست آمده از استخراج کننده قالب مولکولی استویوزید (الف) با نسبت ۰/۴ مونومر به اتصال دهنده عرضی (ب) با نسبت ۰/۲ مونومر به اتصال دهنده عرضی (پ) با نسبت ۰/۰۵ مونومر به اتصال دهنده عرضی

جدول ۱: مقایسه کارایی استخراج کننده استویوزید بر حسب مقادیر درصد بازیافت نسبت‌های مختلف منومر عاملی به اتصال دهنده عرضی در مقابل اندازه ذرات فاز جامد.

ردیف	نسبت وزنی منومر به اتصال دهنده عرضی	درصد بازیافت برای درجه ریزش‌دگی ۱۰۰۰ میکرون	درصد بازیافت برای درجه ریزش‌دگی ۲۰۰۰ میکرون
۱	۰,۰۵	(RF3)/۳۰	(RF4)/۱۰
۲	۰,۲	(RF1)/۸۰	(RF2)/۶۰
۳	۰,۴	(RF5)/۳۰	/۲۰

گیاه استویا پس از رقیق‌سازی و انجام فرایند آماده سازی به دستگاه HPLC تزریق شد.

برای اثبات کارایی عمل استخراج کننده، با هدف استخراج استویوزید از عصاره الکلی گیاه استویا به‌عنوان نمونه حقیقی استفاده شد. عصاره هیدروالکلی

## بحث

با توجه به اینکه استویوزید براساس ساختار مولکولی خود (شکل ۱) الکترواکتیو نمی‌باشد (Komorsky et al., 2010). لذا برای فعال کردن آن قبل از آنالیز با دستگاه پلاروگرافی باید تحت شرایط خاص مورد تفکیک مولکولی قرار گیرد. این شرایط در آزمایشگاه تحت اکسایش شدید حاصل می‌شود. ثابت نگهداشتن شرایط آماده‌سازی نمونه‌ها قبل از پلاروگرافی بسیار حساس و تاثیر گذار بر نتایج است. با توجه به محل پیک‌های حاصله که در شکل ۲ نشان داده شده است این مهم به درستی محقق شده است و نشان از صحت و دقت بسیار بالای آزمایشات دارد. با توجه به بررسی‌های صورت گرفته به غیر از تحقیقی که در سال ۲۰۱۰ توسط کومورسکی و همکاران منتشر شده است تاکنون گزارشی مبنی بر اندازه‌گیری استویوزید توسط روش‌های الکتروشیمیایی و از جمله پلاروگرافی پالسی منتشر نشده است و اولین بار است که در این تحقیق استویوزید به کمک روش‌های پیش آماده سازی تحت یونش مولکولی قرار گرفته است.

در این تحقیق جهت سنتز فاز جامد استخراج کننده بر پایه قالب مولکولی از مونومر عاملی MAA و پیوند دهنده عرضی EGDMA در سه نسبت حجمی ۰/۰۵ و ۰/۲ و ۰/۴ استفاده شد. دلیل این کار بدست آوردن بهترین نسبت ترکیب این مواد جهت افزایش کارایی عمل استخراج است. از آنجایی که استخراج کننده‌های قالب مولکولی دارای گزینش پذیری زیاد در فرآیند استخراج هستند لذا افزایش درصد بازیافت آنها در عملیات جداسازی و همچنین فرآیندهای تهیه‌ای بسیار حائز اهمیت است. برای افزایش درصد بازیافت باید بهترین شرایط تهیه قالب ایجاد شود تا از حداکثر فضا و حجم موجود برای افزایش تعداد قالب‌ها بهره ببرد (He et al., 2007). این مهم با رعایت نسبت ترکیب مونومر عاملی به اتصال‌دهنده

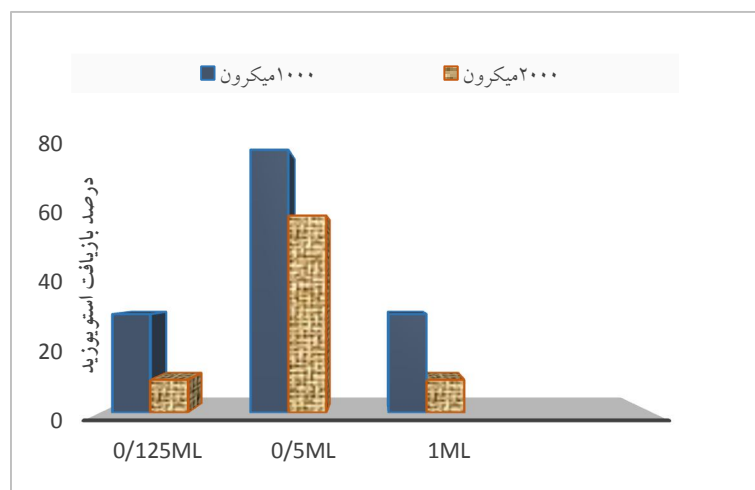
عرضی که با اهمیت ترین اجزای تشکیل دهنده این فاز جامد می‌باشند، به دست می‌آید. اگرچه در تحقیقات اخیر در خصوص این نسبت گزارش‌هایی در دست است ولی نوع آنالیت در مقادیر بهینه ترکیب اجزا تفاوت اساسی ایجاد می‌کند (Wang et al., 2017). از آنجایی که استویوزید یک گلیکوزید استویولی است و دارای ساختاری پیچیده و درشت مولکول بوده و به لحاظ استریوشیمی جزو مولکول‌های خاص می‌باشد. لذا کمترین استرس در شرایط قالب زنی این مولکول می‌تواند تاثیرات فوق‌العاده‌ای را در تعداد سایت‌های قالب دار فاز جامد به عنوان جاذب ایجاد کند و اغلب منجر به کاهش تعداد قالب‌ها می‌گردد. بنابراین شرایط تهیه استخراج کننده بدون استرس و تحت دما و فشار معمول و همچنین زمان دادن به تشکیل این جاذب تنها در صورتی می‌تواند موثر واقع شود که نسبت مواد آمیخته شده تا حد ممکن متناسب با استریوشیمی و اندازه مولکول الگو باشد.

در تحقیقات مبتنی بر استخراج چنانچه درصد بازیافت حدود ۶۰ درصد حاصل شود نتیجه مطلوب خواهد بود (Płotka et al., 2016). این درحالی است که در این تحقیق با رعایت بهترین نسبت تا ۸۰ درصد بازیافت به دست آمده است. نمودار شکل ۴ نیز بیشترین بازیافت‌ها را در نسبت ۰/۵ میلی‌لیتر متاکریلیک اسید نشان داده است. در سایر نسبت‌های اجزای این دو ترکیب تقریباً نتایج یکسان و به مراتب کمتر از مقدار بهینه حاصل شده است. با توجه به نوع واکنش پلیمری شدن که برای تهیه این فاز جامد استخراج کننده صورت می‌گیرد نسبت مونومر عاملی به اتصال دهنده عرضی بیشتر از مقدار حاصل شده در نمودار مذکور تاثیر چندانی بر تعداد و کارایی قالب‌های تولید شده در این فاز جامد ندارد. یکی دیگر از اهداف این تحقیق بررسی تاثیر اندازه ذرات فاز جامد استخراج کننده بر میزان راندمان استخراج



میکرون بدست می‌آید. اگرچه نوع آنالیت نیز تاثیر فراوانی بر این متغیر دارد ولی بر اساس تئوری ایزوترم‌های جذب سطحی، می‌توان پیش بینی نمود که هرچقدر ذرات جاذب کوچک‌تر باشند میزان درصد بازیافت نیز بیشتر است (Ya et al., 2001). البته اندازه ذرات کوچک‌تر از میانگین ۱۰۰۰ میکرون در خصوص استویوزید محدودیت‌های عملیاتی در فرآیند جذب و واجذب ایجاد می‌کند. زیرا با توجه به اینکه یک مرحله آماده‌سازی نمونه استخراج شده قبل از پلاروگرافی هم وجود دارد به همین دلیل و به منظور حصول درصد مطلوب بازدهی استخراج، مقادیر اندازه ذرات کوچکتر از ۱۰۰۰ میکرومتر استفاده نشد.

استویوزید بوده است. اندازه ذرات فاز جامد استخراج کننده به دلیل تفاوت در سطح جذب می‌تواند بر مقدار آنالیت جذب شده توسط قالب‌ها تاثیر گذارد. شایان ذکر است که هرچقدر سطح جذب استخراج کننده وسیع‌تر باشد سینتیک جذب سطحی افزایش می‌یابد و علاوه بر سرعت استخراج و متعاقب آن کاهش زمان استخراج، درصد بیشتری از قالب‌های تولید شده در فاز جامد مورد استفاده قرار می‌گیرند (Chen et al., 2012). در این تحقیق از دو اندازه متفاوت سایز ذرات فاز جامد ماده استخراج کننده استفاده شد. ذرات با میانگین قطر ۱۰۰۰ میکرومتر و ۲۰۰۰ میکرومتر. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که بیشترین تاثیر بر راندمان استخراج برای فاز جامد با اندازه ۱۰۰۰

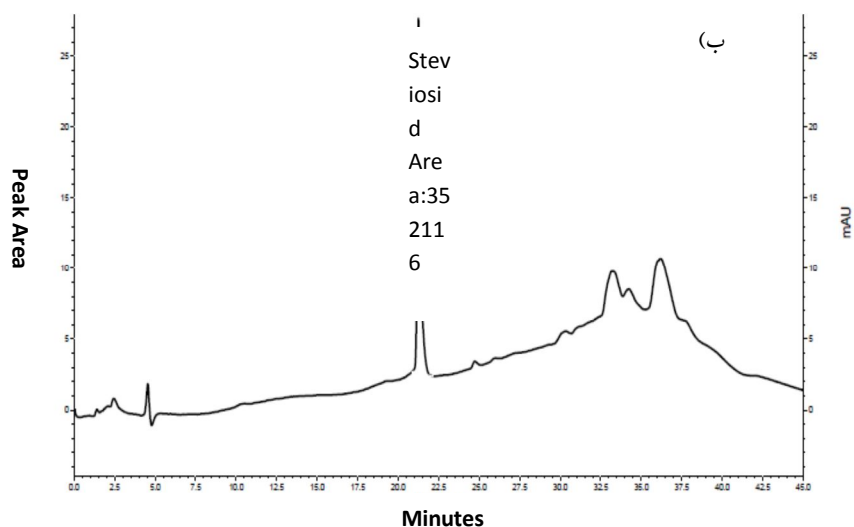
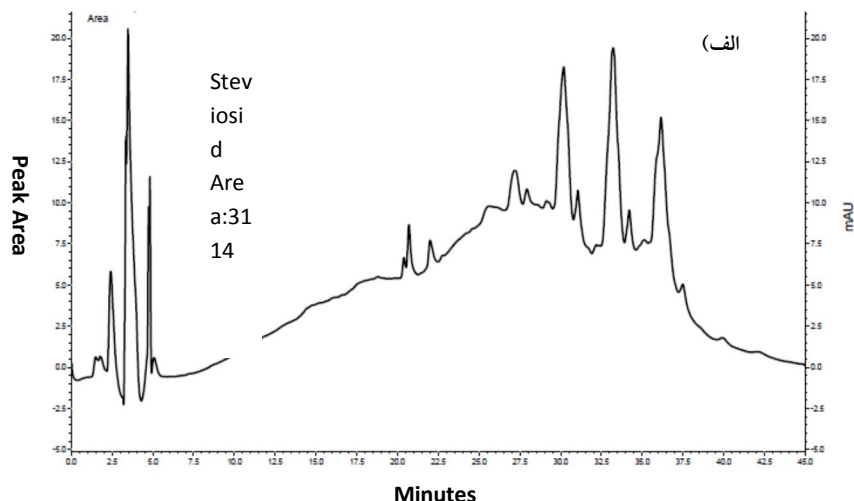


شکل ۴: بررسی مقایسه‌ای میزان درصد بازیافت تغییرات نسبت MAA/EGDMA در مقابل اندازه ذرات استخراج کننده قالب مولکولی استویوزید.

اتصال‌دهنده عرضی که با اهمیت‌ترین اجزای تشکیل‌دهنده این استخراج کننده است میسر می‌گردد (Puri et al., 2013; Yildiz-ozturk et al., 2014). استویوزید استخراج شده از عصاره برگ گیاه استویا با استفاده از فاز جامد قالب مولکولی و تقویت شده با نانولوله کربنی در نهایت توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت.

از سوی دیگر استفاده از ذرات بزرگتر از ۲۰۰۰ میکرومتر به دلیل کاهش متوالی سطح جذب کارایی استخراج را به شدت تنزل می‌دهد. شکل شماره ۴ تاثیر همزمان این دو عامل (اندازه ذرات استخراج کننده و نسبت مونومر به اتصال‌دهنده عرضی) را در یک نمودار نشان می‌دهد. برای افزایش درصد بازیافت باید بهترین شرایط تهیه قالب ایجاد شود و این امر با رعایت نسبت ترکیب مونومر عاملی به





شکل ۵: کروماتوگرام HPLC عصاره گیاه استویا که با استفاده فاز جامد استخراج کننده استویوزید.

الف) قبل از استخراج. ب) بعد از استخراج توسط فاز جامد

این امر یک محلول استاندارد استویوزید با غلظت معین به دستگاه کروماتوگرافی در همان شرایط تزریق شد و تنها یک پیک کروماتوگرام در زمان بازداری مذکور پدیدار گشت. در شکل ۵-ب کروماتوگرام حاصل از تزریق محلول استخراج شده استویوزید پس از استخراج با فاز جامد قالب مولکولی نشان می دهد که عمل جداسازی با حذف سایر پیکهای کروماتوگرام بصورت گزینش پذیر برای استویوزید

همانگونه که در شکل ۵ نشان داده شده است استخراج کننده فاز جامد توانسته است تا حدود زیادی بطور انتخابی استویوزید را از بین سایر ترکیبات موجود در عصاره گیاه استویا جداسازی و استخراج نماید. در شکل ۵-الف عصاره هیدروالکلی استویا به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شد و همانگونه که مشخص است در زمان بازداری حدود ۲۱،۵ دقیقه استویوزید خارج شده است. جهت اثبات

مولکولی استوار می باشد. استفاده از فاز جامد استخراج کننده با استفاده از تکنیک قالب مولکولی برای اولین بار است که در استخراج استویوزید بکار می رود و تا کنون گزارش علمی در این خصوص منتشر نشده است. این تحقیق نشان داد استخراج و پیش تغلیظ استویوزید بر اساس فاز جامد قالب مولکولی به آسانی امکان پذیر است. همچنین نتایج حاکی از تاثیر اندازه ذرات ریزتر فاز استخراج کننده بر راندمان استخراج می باشد. رعایت نسبت ترکیب اجزای تشکیل دهنده در فاز جامد توانست تاثیر چشمگیری بر میزان درصد بازیافت استویوزید بگذارد. همچنین قابل ذکر است که این تحقیق نشان داده شد که در اندازه گیری استویوزید امکان به کارگیری روش های الکتروشیمیایی مانند پلاروگرافی نیز وجود دارد و با انجام عملیات پیش آماده سازی نمونه، قبل از پلاروگرافی این امر به خوبی قابل انجام است. اندازه گیری استویوزید حاصل از استخراج به روش پیشنهادی در این تحقیق از عصاره گیاه استویا نشان داد که مقدار به دست آمده با آنچه که در گیاه انتظار می رفت و در گزارش های علمی به آن اشاره شده است تا حدود زیادی قابل مقایسه است. چنانچه این روش بهبود و توسعه بیشتری یابد امکان به کارگیری آن برای بسیاری از ترکیبات موثره گیاهی پیشنهاد می گردد.

#### سپاسگزاری

نویسندگان مراتب سپاس صمیمانه خود از دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان به جهت در اختیار گذاردن امکانات و تجهیزات لازم و همچنین شرکت داروسازی گیاه اسانس به جهت تامین برخی مواد اولیه را دارند.

عمل کرده است (Puri et al., 2013). این موضوع به دلیل اهمیت در علوم خالص سازی به طور گسترده در صنایع دارویی و غذایی مورد استقبال قرار می گیرد. با توجه به اینکه هم اکنون در صنایع غذایی بسیاری از کشورهای توسعه یافته استویوزید به عنوان شیرین کننده بدون کالری در دستور مصرف یا جایگزینی با شکر گلکوز قرار گرفته است و از طرفی روش های معمول استخراج اغلب بر پایه استخراج با حلال است به نظر می رسد این روش جدید می تواند چشم انداز مطلوبی را برای صنایع مرتبط مصرف کننده این محصول به دنبال داشته باشد. همچنین قابل ذکر است که استفاده از این روش به دلیل عدم استفاده از حلال های آلی با شیمی سبز مطابقت داشته و از نظر زیست محیطی بسیار کم آلاینده تر نسبت به سایر روش های رقیب است. بنابراین استخراج کننده تهیه شده در این تحقیق بر اساس فاز جامد و تکنیک قالب مولکولی که با نانولوله کربنی تقویت شده است قابلیت مناسبی در خالص سازی استویوزید به عنوان شیرین کننده بدون کالری در گیاه دارویی استویا دارد. براساس نتایج بدست آمده از تزریق عصاره متانولی برگ گیاه استویا به دستگاه HPLC و انجام محاسبات مربوطه بر اساس رسم منحنی کالیبراسیون استاندارد، و همچنین محاسبه آن در مقدار اولیه وزن گیاه اولیه به کار رفته در انجام این تحقیق مقدار درصد استویوزید بدست آمده در گیاه معادل ۱۱/۱۶ درصد به دست آمد (Anvari and Khayati, 2016).

#### نتیجه گیری نهایی

تحقیق حاضر مبتنی بر ایجاد و بهینه سازی فرآیند جدید استخراج استویوزید از گیاه استویا به عنوان یک ترکیب بسیار ارزشمند در صنایع نوین داروسازی و غذایی است که بر پایه تشکیل فاز جامد قالب

## References

- Anvari, M. and Khayati, G. 2016. Separation and purification of rebaudioside A from extract of *Stevia Rebaudiana* leaves by macroporous adsorption resins. Chemical Technology, 18: 127-132.
- Abolghasembeyk, T., Shahriari, S., Salehifar, M. 2016. Extraction of stevioside using aqueous two-phase systems formed by choline chloride and K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Food and Bioproducts Processing, 102:107-115.
- Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V., Cerdà, V. 2016. Solid-phase extraction of organic compounds: a critical review (part I). TrAC Trends in Analytical Chemistry, 80: 641-654.
- Ashley, J., Shahbazi, M.A., Kant, K., Chidambara, V.A., Wolff, A., Bang, D. D., Sun, Y. 2017. Molecularly imprinted polymers for sample preparation and biosensing in food analysis: Progress and Perspectives. Biosensors and Bioelectronics, 91: 606-615.
- Atteh, J.O., Onagbesan, O.M, Tona, K., Decuyper, E., Geuns, J.M et al 2007. Evaluation of supplementary *stevia (stevia rebaudiana* Bertoni) leave and stevioside in broiler diets: effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters and growth performance. Anim. Physiol. Anim. Nutr., 92:640-649.
- Brandle, J.E. and Telmar, P.G. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. Phytochemistry, 68:1855-1863.
- Chen, X., Zhang, Z., Yang, X., Li, J., Liu, Y., Chen, H., Yao, S. 2012. Molecularly imprinted polymers based on multi-walled carbon nano tubes for selective solid-phase extraction of oleanolic acid from the roots of kiwi fruit samples. Talanta, 99: 959-965.
- Deshmukh, S. R and Kedari, V. R. 2014. Isolation, purification and characterization of sweeteners from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) for their anti cancerous activity against colon cancer. Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 3:1394-1410.
- Erkuk, K., Akgun, I.H., Yesil-Celiktas, O. 2009. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of glycosides and optimization. Supercritical Fluids, 51:29-35.
- Ebarvia, B.S., Binag, C.A. and sevilla, F. 2004. Biomimetic piezoelectric quartz sensor for caffeine based on a molecularly imprinted polymer. Analytical and Bioanalytical chemistry, 378: 1331-1337
- Fuh, W.Sh. and Chiang, B.H. 1990. Purification of steviosides by membrane and ion exchange processes. Food Science. 55:1454-1457
- Gama, M.R and Bottoli, C.B.G. 2016. Molecularly imprinted polymers for bioanalytical sample preparation. Chromatography B. 1043:107-121
- Gardana, C., Simonetti, P., Canzi, E., Zanchi, R., Pietta, P. 2003. Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *stevia rebaudiana* extracts by human microflora. AgriFood Chem, 51:6618-6622.
- He, C., Long, Y., Pan, J., Li, K., Liu, F. 2007. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. Biochemical and Biophysical Methods, 70: 133-150.
- Komorsky-Lovric, S., Novak, I., Novak, B. 2010. Measurement of stevioside by square-wave polarography. Electroanalysis, 22(19): 2211-2215.
- Lorenzo, C., Serrano, Dlaz J., Plaza, M., Quintanilla, C. 2014. Fast methodology of analyzing major steviol glycosides from *stevia rebaudiana* leaves. Food Chem. 157: 518-523.
- Ma, Ya., Shen, X. L., Zeng, Q., Wang, H.S., Wang, L.S. 2017. A multi-walled carbon nanotubes based molecularly imprinted polymers electrochemical sensor for the sensitive determination of HIV-p24. Talanta, 164:121-127.
- Mondase, R.L., Antonio, V.G., Liliana, Z.B., Kong, A.H-Hen. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chemistry, 132: 1121-1132.

19. Pol, J., Hohnova, B. and Hyotylainen, T. 2007. Characterisation of *stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Chroma*, 1150: 85-92.
20. Pol, J., Varadova Ostra, E., Karasek, P., Roth, M., Benesova K et al 2007. Comparison of two different solvents employed for pressurized fluid extraction of stevioside from *stevia rebaudiana*: methanol versus water. *Anal Bioanal. Chem.*, 388:1847-1857
21. Puri, M., Sharma, D., Barrow, C.J., Tiwary, A.K 2013. Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *stevia rebaudiana* leaves. *Food Chem*, 132:1113-1120.
22. Płotka-Wasyłka, J., Szczepańska, N., de la Guardia, M., Namieśnik, J. 2016. Modern trends in solid phase extraction: new sorbent media. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 77: 23-43.
23. Quaglia, M., De Irenzi, E., Sulitzkyc., Massolini, G., Sellergren, B. 2001. Surface initiated molecularly imprinted polymer films: a new approach in chiral capillary electromatography. *Analyst*, 126:1495-1498.
24. Striedner, J., Czygan, F.C., Braunegg, G. 1991. Contributions to the biotechnological production of sweeteners from *stevia rebaudiana* Bertoni. A method for the serials Analysis of diterpene glycosides by HPLC. *Acta Biotechnol*, 11:495-499.
25. Teo, C.C., Tan, S.N., Hong Yong, J.W., Hew, C.S. 2009. Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of *stevia rebaudiana* bertoni. *Separation Science*, 32:613-622.
26. Tianwei, T., Xiaojing, H., Weixia, D. 2001. Adsorption behaviour model of metal ion on imprinting chitosan resin. *Chem. Technol. Biotechnol.*, 76:191-195
27. Wang, H., Yao, S., Liu, Y., Wei, S., Su, J., Hu, G. 2017. Molecularly imprinted electrochemical sensor based on Au nano particles in carboxylated multi-walled carbon nano tubes for sensitive determination of olaquinox in food and feedstuffs. *Biosensors and Bioelectronics*, 87: 417-421.
28. Weiss, R., Molinelli, A., Jakusch, M., Mizaikoff, B. 2001. Molecular imprinting and solid phase extraction of flavonoid compounds. *Bioseparation*, 10: 379-87.
29. Wuff, G., and sarhan, A. 1972. The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemate. *Angewandte chemie International Edition*, 11: 341-345.
30. Yildiz-ozturk, E., Nalbantsoy, A., Tag, O., Yesil-Celiktas, O. 2015. A comparative study on extraction processes of *Stevia rebaudiana* leaves with emphasis on antioxidant, cytotoxic and nitricoxide inhibition activities. *Industrial Crops and Products*, 77: 961-971.
31. Ye, L. and Mosbach, K. 2001. Molecularly imprinted microspheres as antibody binding mimics. *Reactive and Functional Polymers*, 48: 149-157.
32. Yildiz-ozturk, E., Tag, O., Yesil-Celiktas, O. 2014. Subcritical water extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves and characterization of the raffinate phase. *Supercritical Fluids*, 95:422-430.

**Quantitative and qualitative extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana* Bertoni. using solid phase molecularly imprinted technique****Aghabeik, S.<sup>1</sup>, Ahmadi Golsefidi, M.<sup>2\*</sup>, Soleimani, M.H.<sup>3</sup>**<sup>1,2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran<sup>3</sup>Essential Oil Pharmacy, Gorgan, Iran

Received: 27-1-2017 ; Accepted: 9-5-2017

**Abstract**

*Stevia rebaudiana* Bertoni. with non-calorie steviol glycoside is an effective drug to decrease of blood glucose in treat of diabetics. The goal of this study is obtaining of a novel method in order to a quantitative and qualitative extraction of stevioside as a non-calorie sweetener from *Stevia*. In this study the dry leaves of *Stevia* was prepared from Golsaran Shomal company and then in order to extraction of stevioside a solid phase molecularly imprinted extractor was prepared and some parameters affective on extraction of stevioside were optimized. An acrylate functional monomer and a cross linker were used to preparation of stevioside extractor polymer. Functional monomer to cross linker ratio and size and fining degree of the extractor were studied and evaluated. In this study analysis of the stevioside beside of HPLC was accrued by polarography method. The best ratio of functional monomer to cross linker was obtained in 0.2, also the best polymer particle size was obtained in 1000 micron for extraction of stevioside by the extractor and the amount of stevioside was determined 11.6% w/w in this plant.

**Keywords:** Molecularly imprinted, Polarography, Solid phase, *Stevia rebaudiana* Bertoni, stevioside