Archive of SID

شرایط استخراج روی توان آنتی اکسیدانی و ترکیب بیوشیمیایی آرتیمیزیا آفسنطین

ریحانه سریری[۱*]، حسین غفوری[۱] و محمد رضا نقوی[۲]

[۱] رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲] کرج، دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲۵

چکیده

اثرات دما و نوع حلال بر روی استخراج ترکیبات بیوشیمیایی و ظرفیت آنتی اکسیدانی *Artemisia absinthium* مطالعه شدند. تغییر مقدار ترکیبات بیوشیمیایی و ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها در شرایط استخراجی متفاوت شامل دما (۶۰-۳۰ درجه سانتی گراد)، حلال (متانول اتانول و استونیتریل) و غلظت حلال (۱۰۰-۲۵ درصد) مطالعه شد. مقادیر کل فنل (mg GAE/100 g DW ۱۰۳۳-۶۱۲) و توتال فلاونوئید (۳۹۲ mg CE/100 g DW) در نمونه‌ها اندازه گیری شد. ظرفیت شکار رادیکالهای آزاد با استفاده از روشهای مختلف، DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (۷۹-۵۱ درصد)، FRAP (ferric reducing antioxidant power) (۱۵۱-۲۸۷μM TE /100g DW) و ABTS (2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) (۱۷-۳۹ mM TE/g FM) اندازه گیری گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، متانول به عنوان حلال مناسب استخراج انتخاب شد. عصاره های به دست آمده در شرایط متانول ۷۵ درصد و دمای ۴۵ درجه بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان دادند، در حالی که عصارهای به دست آمده با استفاده از متانول ۷۵ درصد و دمای ۶۰ درجه بالاترین سطح فنل را داشتند. آنالیز نمونه‌ها برای ترکیب آرتمیزینین با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) انجام شد اما برخلاف برخی مطالعات، این ترکیب در نمونه‌ها شناسایی نشد . نتایج HPLC وجود بیشترین مقدار ترکیب anabsinthin (۱۶/۵۸ میکروگرم در گرم گیاه) را در متانول ۷۵ درصد و کمترین مقدار (۹/۴۵ میکروگرم در گرم گیاه) را درمتانول ۲۵ درصد نشان داد.

واژه های کلیدی : *Artemisia absinthium* ، ظرفیت آنتی اکسیدانی، *anabsinthin* ، آرتمیزینین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۳۳۳۳۳۳۶۴۷ ، پست الکترونیکی: sariri2@yahoo.co.uk

مقدمه

جهت جلوگیری از بسیاری از بیماریها، مصرف غذاهای مشتق از گیاهان بسیار توصیه شده است. برخی از گیاهان دارای آنتی اکسیدان طبیعی به میزان قابل توجه ای هستند و به دنبال مصرف آنها ملاحظه گردیده است ظرفیت آنتی اکسیدانی پلاسما به طور معنی داری افزایش می‌یابد. آرتمیزیا یکی از گسترده ترین جنسهای مربوط به خانواده Asteraceae (Compositae) با حدود ۳۴ گونه در ایران است. تعداد گونه‌های این جنس در دنیا با توجه به منابع مختلف بین ۵۰۰-۲۵۰ گونه برآورد شده است که بیشتر در آسیا، اروپا و شمال آمریکا پراکنده است (۳و۱۰). با تحقیق در مورد انواع آن در کشور، مشخص شد *A. absinthium* یکی از گونه‌های پراستفاده این جنس در ایران است که بیشتر در شمال ایران پراکندگی دارد. بر اساس مطالعات صورت گرفته، این گونه از نظر ترکیبات آنتی اکسیدانی بسیار غنی است به طوری که ترکیبی مثل کوئورسیتین به مقدار قابل توجهی در آن شناسایی شده است (۴). برخی مطالعات، ویژگی ضد پارازیتی (۶) و همچنین توانایی بهبود نارسایهای کبدی آن را گزارش نموده اند (۱ و ۵). علی رغم وجود روشهای متنوع جهت استخراج ترکیبات فیتوشیمیایی، تا به حال یک روش تکرار پذیر و کامل برای

www.SID.ir

Archive of SID

استخراج ترکیبات مختلف از گیاه کمتر گزارش شده است. از طرفی، نتایج بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی در گیاه شدیداً به نوع حلال و شرایط استخراج وابسته است. به همین دلیل حلالهای مختلف از قبیل متانول، استونیتریل، اتیل استات و اتانول برای عصاره گیری و استخراج آنتی اکسیدان‌ها و فنلها استفاده می شوند (۹،۲و۱۰). هدف اول از این تحقیق بررسی اثر تکنیکها و حلالهای مختلف بر میزان استخراج ترکیبات بیوشیمیایی و آنتی اکسیدانی گیاه *A. absinthium* بود . همچنین، با توجه به اینکه ترکیب مؤثره گیاه مذکور تا به حال گزارش نشده است، هدف دیگر مطالعه حاضر بررسی میزان ترکیب مؤثره این گونه را با استفاده از روش تجزیه ای کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا HPLC برای اولین بار در کشور بود.

مواد و روشها

نمونه مورد مطالعه برگ گیاه *A. absinthium* از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه و بعد از آورده شدن به آزمایشگاه تحقیقاتی بیوشیمی در آون خشک شده و تا انجام مراحل استخراج در ظرف درب بسته و در یخچال نگهداری شد. حلالهای مختلف همه با درجه خلوص بالا از مرک تهیه شدند و بدون تغییر مورد استفاده قرار گرفتند. دستگاههای مورد استفاده در دانشگاههای گیلان و تهران موجود بودند.

روش تهیه عصاره گیاهی: نمونه مورد نظر پس از خشک کردن در دمای ۴۰ درجه، با استفاده از آسیاب پودر شده و وزن مشخص از آن در حجم مورد نظر در غلظتهای (۲۵ ،۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد) از حلالها (متانول، استونیتریل و اتانول) در دماهای (۳۰، ۴۵ و۶۰ درجه) وتحت هم زدن مغناطیسی برای ۲۴ ساعت قرار گرفتند. به از این مدت با استفاده از کاغذ صافی وایتمن شماره ۴ صاف گردیدند و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه نگهداری شدند.

سنجش مقدار فنل تام (TPC): سنجش مقدار فنل تام با استفاده از معرف Folin-Ciocalteu انجام شد و منحنی استاندارد با غلظتهای مختلف اسید گالیک (۱۰۰-۵ میلی گرم بر لیتر) رسم گردید. جذبها در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد و نتایج بر حسب میلی گرم معادل اسید گالیک در صد گرم وزن خشک گیاه بیان گردید (۹)

سنجش مقدار فلاونوئید تام (TFC): سنجش مقدار فلاونوئید تام با استفاده از کلرید آلومینیوم انجام گرفت. مخلوط واکنش شامل ۳۰۰ میکرولیتر عصاره رقیق شده، ۱/۶ میلی لیتر آب و ۱۰۰ میکرولیتر نیتریت سدیم ۵ درصد بود. بعد از ۶ دقیقه، ۱۵۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد اضافه گردیده و در ادامه بعد از ۵ دقیقه ۰/۶ میلی لیتر هیدروکسید سدیم ۱ مولار و ۲۵۰ میکرولیتر آب اضافه شد و با ورتکس به طور کامل مخلوط گردید. جذب مخلوط بلافاصله در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت شد. نتایج بر حسب میلی گرم معادل کاتچین در صد گرم وزن خشک گیاه بیان گردید (۱۰)

تست DPPH: در این روش فعالیت نمونه برای پاکسازی رادیکال DPPH سنجش می شود. اساس عمل کاهش محلول الکلی DPPH در حضور آنتی‌اکسیدان‌های دهنده هیدروژن، مخصوصاً ترکیبات فنلی می باشد. جهت دستیابی به IC_{50} نمونه ها، ۴ غلظت مختلف از عصاره ها تهیه شد و برای رسم نمودار، درصد مهارکنندگی بر علیه غلظت استفاده گردید. در عمل ۳۰۰ میکرولیتر DPPH ا مولار با ۱۰۰ میکرولیتر نمونه رقیق شده ترکیب و با استفاده از متانول به حجم نهایی ۲ میلی لیتر رسانیده شد. بعد از نیم ساعت قرار گرفتن در تاریکی، جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد و با استفاده از فرمول زیر در صد مهارکنندگی به دست آمد (۱۰)

$$\text{درصد مهار DPPH} = (A_{DPPH} - A_{Sample} / A_{DPPH}) * 100$$

A_{DPPH}: جذب DPPH در عدم حضور نمونه

A_{Sample}: جذب DPPH در حضور نمونه

www.SID.ir

Archive of SID

تست FRAP: روش FRAP با استفاده از TPTZ (۲, ۴, ۶- tripyridyl-s-triazine) انجام گرفت. اساس این روش احیای آهن فریک به فروس (Fe^{3+}-TPTZ به Fe^{2+} – TPTZ) در حضور آنتی اکسیدان است. محلول FRAP به ترتیب محتوی بافر استات ۰,۳ مولار (pH 3.6) ، محلول TPTZ ۱۰ میلی مولار در HCl ۴۰ میلی مولار و ۲۰ میلی مولار محلول کلرید آهن (III) با نسبتهای ۱۰-۱-۱ می باشد. محلول FRAP باید بصورت تازه تهیه شود. در این روش ۱۰۰ میکرولیتر عصاره رقیق شده با ۴/۱ میلی لیتر محلول FRAP مخلوط شده و بعد از ۲۰ دقیقه جذب در طول موج ۵۹۳ نانومتر قرائت می شود (۷)

تست ABTS : در این روش ابتدا محلول ABTS با غلظت ۷ میلی مولار تهیه شد، به این محلول پرسولفات پتاسیم اضافه گردید محلول حاصل به مدت یک شب در تاریکی و دمای اتاق قرار داده شد. ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها با ۱۴۸۰ میکرولیتر رادیکال ABTS مخلوط گردید و جذب در طول موج ۷۳۴ نانومتر قرائت شد (۷)

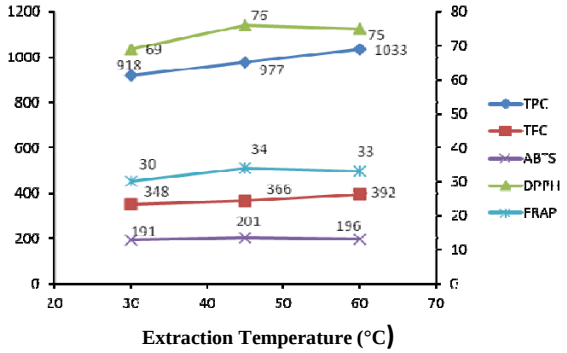
کروماتوگرافی لایه نازک (TLC): الگوی فنلی عصاره های متانولی با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک بررسی شد. در این روش ۱۰ میکرولیتر نمونه بر روی صفحات RP-C18 لکه گذاری شد. فاز متحرک شامل نسبتهای ثابتی از متانول، آب، استونیتریل و اسید استیک (۲۰، ۱۱، ۱/۵ و ۰/۵) می باشد. بعد از اتمام جداسازی و خشک شدن صفحه TLC الگوی باندها در UV_{254nm} مشاهده شد

آنالیز HPLC : گیاه *A. absinthium* برای بررسی وجود ترکیب آرتمیزینین با استفاده از روش RP-HPLC (فاز معکوس) آنالیز گردید. داروهای مشتق از آرتمیزینین یکی از مهم ترین داروها در ارتباط با درمان مالاریا معرفی می شوند. این ترکیب در طول موج ۲۰۳ نانومتر جذب دارد اما با توجه به مشکلات کار کردن در این طول موج، عمل مشتق سازی جهت بالا بردن جذب بیشنه بر روی این ترکیب صورت گرفت با استفاده از RP-HPLC و در طول موج ۲۵۸ نانومتر آنالیز ترکیب انجام پذیرفت. در این روش از HPLC Agilent 1200 با ستون C-18 به عنوان فاز ثابت و از استونیتریل و آب به عنوان فاز متحرک استفاده شد. سرعت جریان برابر یک میلی لیتر بر دقیقه تنظیم شد. ترکیب Anabsinthin نیز با استفاده از این روش آنالیز گردید.

در تمامی تستها، به منظور بررسی تفاوت آماری بین شرایط های مختلف از تجزیه واریانس یک طرفه (One way ANOVA) استفاده گردید، همچنین به منظور مقایسه میانگین از آزمون مقایسه Tukey استفاده شد.

نتایج

نتایج تحقیق حاضر نشان دادند که مقدار قطبیت حلال نقش بسیار مهمی در استخراج ترکیبات بیوشیمیایی و آنتی اکسیدانی از منابع طبیعی دارد. برای همه حلالهای بررسی شده مشخص گردید که افزایش دمای استخراج از ۳۰ به ۶۰ باعث افزایش استخراج مقدار فنل کل و فلاونوئید کل می شود که با مطالعات قبلی همخوانی دارد در صورتی که ظرفیت آنتی اکسیدانی با افزایش دما نتایج متفاوتی نشان می دهد. در اغلب موارد افزایش دما (۶۰ درجه) موجب کاهش ظرفیت آنتی اکسیداتی می شود و بر اساس نتایج به دست آمده دمای ۴۵ درجه دمای مناسب برای فعالیتهای آنتی اکسیدانی می باشد (شکل ۱).



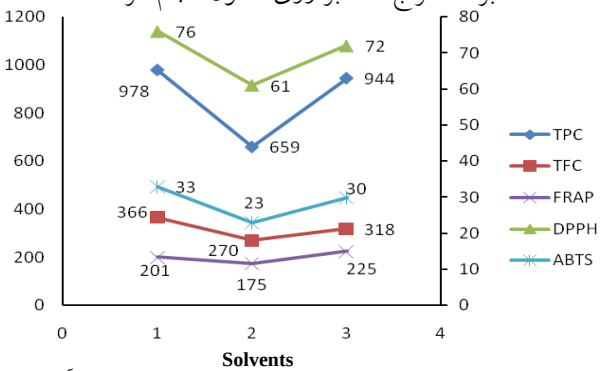
شکل ۱- اثر دمای استخراج (۴۵،۳۰ و ۶۰) در تستهای TPC، TFC، FRAP ، DPPH و ABTS (متانول ۷۵ درصد) (نتایج در ۱۰۰ گرم گیاه خشک بوده و به منظور مقایسه میانگین از آزمون مقایسه

www.SID.ir

Archive of SID

Tukey استفاده شد).

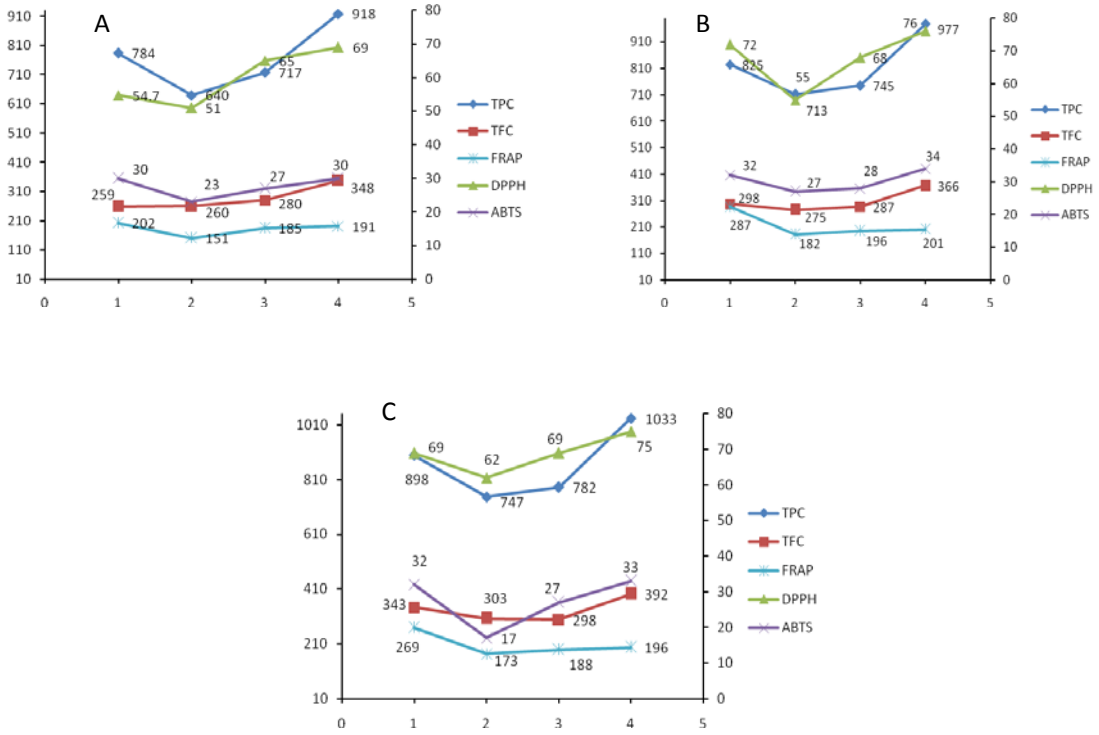
بر اساس نتایج به دست آمده در شکل ۲ متانول نسبت به استونیتریل و اتانول، حلال مناسبتری در استخراج بیشتر ترکیبات معرفی شد و به همین دلیل بررسی تأثیر دماهای مختلف بر استخراج فقط بر روی متانول انجام گرفت.



شکل۲- اثر حلالهای استخراج بر میزان ترکیبات فنولی و ظرفیت آنتی اکسیدانی در دمای ۴۵ درجه (۱- متانول ۷۵ درصد، ۲- اتانول ۷۵ درصد و ۳- استونیتریل ۷۵ درصد) در تستهای TPC، TFC، FRAP ، DPPH و ABTS (نتایج در ۱۰۰ گرم گیاه خشک بوده و به منظور مقایسه میانگین از آزمون مقایسه Tukey استفاده شد).

بر اساس شکل ۳، بالاترین و پایین ترین مقدار آنتی اکسیدانی در تست DPPH به ترتیب در متانول ۷۵ و ۲۵ درصد به دست آمد، در صورتی که در تست FRAP بالاترین مقدار آنتی اکسیدانی در متانول ۱۰۰ درصد حاصل شد (شکل ۳). بطور کلی در این مطالعه ارتباط منطقی بین مقدار فنل کل، فلاونوئیدها و ظرفیت آنتی اکسیدانی مشاهده نشد.

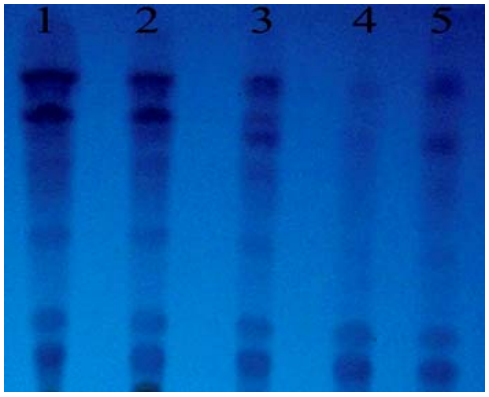
نتایج TLC نشان دادند که حلال استخراج، اثر معنی داری بر مقدار محتوی فنلی عصاره دارد به طوری که بیشترین مقدار در متانول ۷۵ درصد و کمترین مقدار آن در متانول ۲۵ درصد مشاهده گردید (شکل ۴).



شکل ۳- اثر غلظتهای مختلف متانول (۱- متانول ۱۰۰ درصد، ۲- متانول ۲۵ درصد، ۳- استونیتریل ۵۰ درصد و ۴- متانول ۷۵ درصد) در تستهای TPC، TFC، FRAP ، DPPH و ABTS (A: ۳۰C°، B: ۴۵ C°، C: ۶۰C°) (نتایج در ۱۰۰ گرم گیاه خشک بوده و به منظور مقایسه میانگین از آزمون مقایسه Tukey استفاده شد).

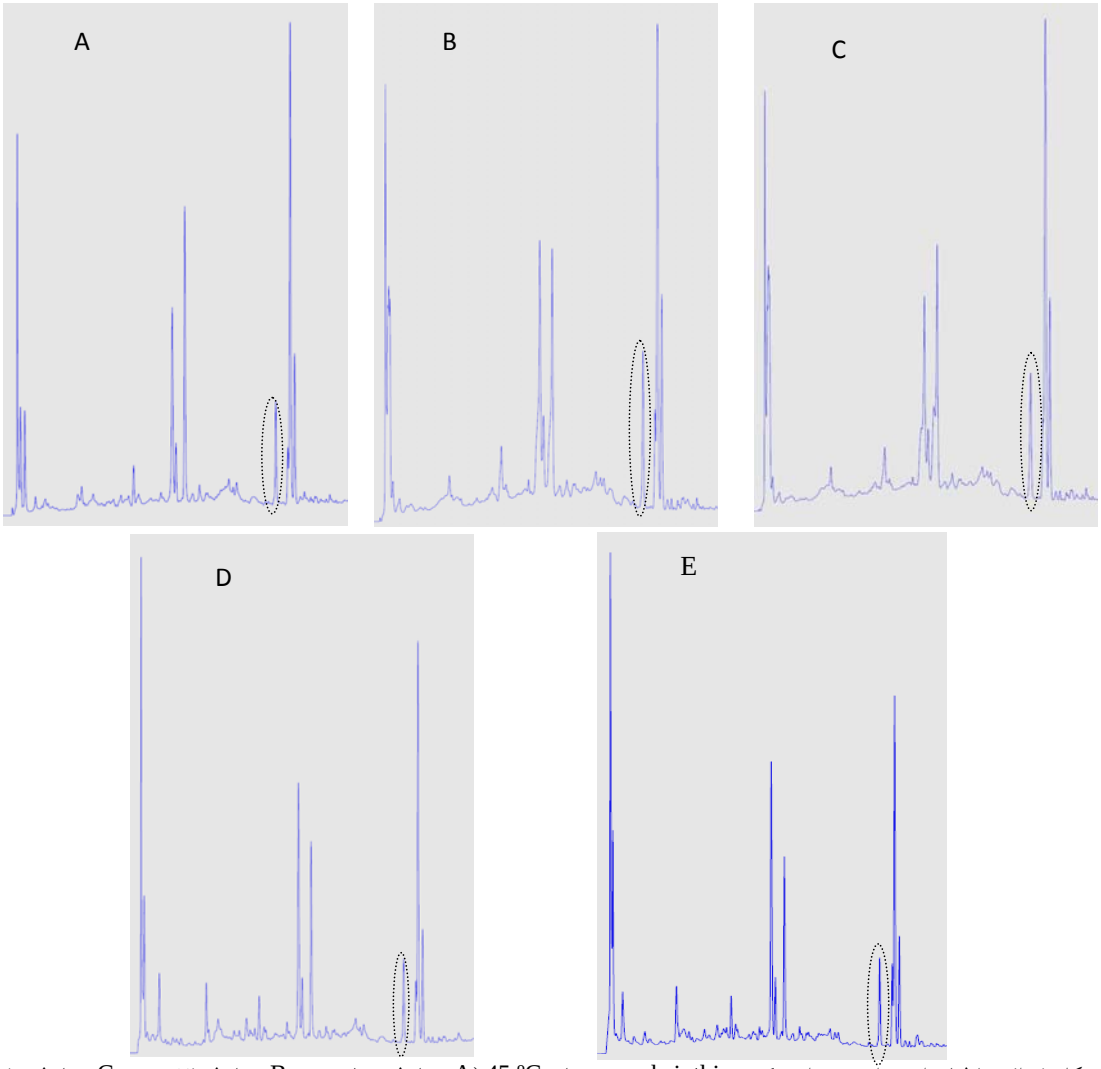
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- اثر حلالهای استخراج بر الگوی TLC در دمای ºC۴۵ (۱- متانول ۷۵ درصد، ۲- متانول ۵۰ درصد، ۳- استونیتریل ۷۵ درصد ،۴- متانول ۲۵ درصد و ۵- متانول ۱۰۰ درصد).

یکی از نتایج بسیار جالب توجه این مطالعه عدم شناسایی ترکیب آرتمیزینین در گونه آرتمیزیای مطالعه شده است. بر اساس نتایج HPLC به دست آمده، هیچ کدام از عصاره ها حاوی ترکیب آرتمیزینین نبودند. این نتایج مخالف با تحقیقاتی بودند که وجود ماده مذکور را گزارش نموده بودند (۸ و ۱۲) بود. در ارتباط با آنالیز ترکیب Anabsinthin با HPLC و بر اساس نتایج به دست آمده در متانول ۷۵ درصد مقدار Anabsinthin بالاترین (۱۶/۵۸ µg/g DW) و در متانول ۲۵ درصد پایین ترین (۹/۴۵ µg/g DW) مشخص گردید (شکل ۵).



شکل ۵- اثر حلالهای استخراج بر میزان ترکیب anabsinthin در دمای 45 ºC (A- متانول ۱۰۰ درصد، B- متانول ۷۵ درصد، C- متانول ۵۰

www.SID.ir

Archive of SID

درصد ،D- متانول ۲۵ درصد و E- استونیتریل ۷۵ درصد).

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که مقدار قطبیت حلال نقش بسیار مهمی در استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از منابع طبیعی دارد. بر اساس نتایج به دست آمده، غلظتهای مختلف متانول تأثیر با اهمیتی در محتوای فنلی (TPC و TFC) و آنتی اکسیدانی (DPPH وABTS, FRAP) نشان می دهد. در این مورد و با توجه به نتایج آماری و مقایسه نتایج ترکیبات فنولی با آنتی اکسیدانی، متانول ۷۵ درصد به عنوان بهترین حلال جهت استخراج انتخاب شد. یکی از نتایج بسیار جالب توجه این مطالعه عدم شناسایی ترکیب آرتمیزینین در گونه آرتمیزیای مطالعه شده است. بر اساس نتایج HPLC به دست آمده، هیچ کدام از عصاره ها حاوی ترکیب آرتمیزینین نبودند. این نتایج مخالف با تحقیقاتی است که وجود ماده مذکور را گزارش کرده بودند (۱۱ و ۱۲).

منابع

1- Amat, N., Upur, H., Blazekovic, B., 2010, In vivo hepatoprotective activity of the aqueous extract of Artemisia absinthium L. against chemically and immunologically induced liver injuries in mice, Journal of ethnopharmacology. 131: 478-484.

2- Bora, K.S., Sharma, A., 2011, The genus Artemisia: a comprehensive review, Pharmaceutical Biology. 49: 101-109.

3- Bremer, k., Humphries, C. J., 1993, Generic monograph of the Asteraceae-Anthemideae, Bulletin of the Natural History Museum Botany series. 23: 71-177.

4- Ghorbani, A., 2005, Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Turkmen Sahra, north of Iran: (Part 1): General results, Journal of ethnopharmacology. 102: 58-68.

5- Gonzalez-Coloma, A., Bailen, M., Diaz, C.E., Fraga, B.M., 2008, Major components of Spanish cultivated Artemisia absinthium populations: Antifeedant, antiparasitic, and antioxidant effects, Industrial Crops and Products. 37: 401-407.

6- Hoffmann, B.Z., Herrmann, K., 1982, Phenolic species 8 Flavonol glycosides of mugwort (Artemisia vulgaris), tarragon (Artemisia dracunculus L.) and absinthe (Artemisia absinthium L.), Z Lebensm Unters-Forsch. 174: 211-215.

7- Kriengsak T., Unaroj B., Kevin C., 2006, Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts, Journal of Food Composition and Analysis 19: 669–675.

8- Mannan, A., Ahmed, I., Arshad, W., Asim, M.F., Qureshi, R.A., Hussain, I., Mirza, B., 2010, Survey of artemisinin production by diverse Artemisia species in northern Pakistan, Malaria journal. 9: 310-319.

9- Naczk, M., Shahidi, F., 2004, Extraction and analysis of phenolics in food, Journal of Chromatography A. 1054: 95-111.

10- Sultana, B., Anwar, F. Ashraf, M., 2009, Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts, Molecules. 14: 2167-2180.

11- Valles, J., McArthur, E. D., 2001, Artemisia systematics and phylogeny: cytogenetic and molecular insights, USDA Forest Service Proceedings RMRS-P, 21: 67-74.

12- Zia, M., Mannan, A., Chaudhary, M.F., 2007, Effect of growth regulators and amino acids on artemisinin production in the callus of Artemisia absinthium, Pakistan Journal of Botany. 39: 799-805.

www.SID.ir

Archive of SID

Extraction Strategy Affects Biochemical Compounds and Antioxidant Capacity of *Artemisia absinthium*!

Ghafoori H.[1], Sariri R.[1] and Naghavi M.[2]

[1] **Biology Dept., Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran**

[2] **Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran**

Abstract

Extraction temperature and solvent type were altered in order to investigate their individual effects on the biochemical compounds and antioxidant capacity of Artemisia absinthium. Therefore, alternations on biochemical composition and antioxidant potential of plant extracts were studied in response to temperatures (30-60 °C), solvent types (methanol, ethanol and acetonitrile) and solvent concentration (25-100%). Total phenolic content (612-1033 mg GAE/100 g DW) and total flavonoid content (239-392 mg CE/100 g DW) were measured using the appropriate chemical procedures. The antioxidant tests including DPPH (51-79%), FRAP (151-287 µM TE /100g DW) and ABTS (17- 39 mM TE/g FM) were performed in triplicate experiments. The results indicated that methanol was the solvent of choice for subsequent extraction procedures. On the other hand, according to HPLC results the highest anabsinthin content was obtained when 75% methanol (16.58 µg/g DW) was used as extraction solvent, while it was lowest by 25% methanol (9.45 µg/g DW).

Key words: Artemisia absinthium, anabsinthin, antioxidant power, extraction

www.SID.ir