

شرایط استخراج روی توان آنتی‌اکسیدانی و ترکیب بیوشیمیایی آرتیمیزیا آفسنطین

ریحانه سریری^{۱*}، حسین غفوری^۱ و محمد رضا نقوی^۲

^۱ رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

^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 آنتی‌اکسیدانی *Artemisia absinthium* مطالعه شدند. تغییر مقدار ترکیبات بیوشیمیایی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در شرایط استخراجی متفاوت شامل دما (۶۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد)، حلال (متانول اتانول و استونیتریل) و غلظت حلال (۱۰۰-۲۵ درصد) مطالعه شد. مقادیر کل فنل (GAE/100 g mg)، حلال (متانول اتانول و استونیتریل) و غلظت حلال (۱۰۰-۲۵ درصد) مطالعه شد. مقادیر کل فنل (GAE/100 g mg) و توتال فلاونوئید (DW ۱۰۳۳-۶۱۲) و FRAP (ferrous reducing) (۳۹۲ mg CE/100 g DW) در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. ظرفیت شکار رادیکالهای آزاد با استفاده از روشهای مختلف، DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (۷۹-۵۱ درصد)، ABTS (2,2-azino-bis 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic) (۲۸۷-۱۵۱ μM TE/100g DW) و antioxidant power (acid) (۱۷-۳۹ mM TE/g FM) اندازه‌گیری گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، متانول به عنوان حلال مناسب استخراج انتخاب شد. عصاره‌های به دست آمده در شرایط متانول ۷۵ درصد و دمای ۴۵ درجه بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان دادند، در حالی که عصاره‌های به دست آمده با استفاده از متانول ۷۵ درصد و دمای ۶۰ درجه بالاترین سطح فنل را داشتند. آنالیز نمونه‌ها برای ترکیب آرتیمیزین با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی 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 در متانول ۲۵ درصد نشان داد.

واژه‌های کلیدی: *Artemisia absinthium*، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، anabsinthin، آرتیمیزین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۳۳۳۳۳۳۳۶۴۷، پست الکترونیکی: sariri2@yahoo.co.uk

مقدمه

در مورد انواع آن در کشور، مشخص شد *A. absinthium* یکی از گونه‌های پرستفاده این جنس در ایران است که بیشتر در شمال ایران پراکندگی دارد. بر اساس مطالعات صورت گرفته، این گونه از نظر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی 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 نموده‌اند (۱ و ۵). علی‌رغم وجود روشهای متنوع جهت استخراج ترکیبات فیتوشیمیایی، تا به حال یک روش تکرار پذیر و کامل برای

جهت جلوگیری از بسیاری از بیماریها، مصرف غذاهای مشتق از گیاهان بسیار توصیه شده است. برخی از گیاهان دارای آنتی‌اکسیدان طبیعی به میزان قابل توجهی هستند و به دنبال مصرف آنها ملاحظه گردیده است ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. آرتیمیزیا یکی از گسترده‌ترین 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 (۳ و ۱۰). با تحقیق

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 نیتريت 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 می‌شود. اساس عمل کاهش محلول الکی DPPH در حضور آنتی‌اکسیدان‌های دهنده هیدروژن، مخصوصاً ترکیبات فنلی می‌باشد. جهت دستیابی به IC₅₀ نمونه‌ها، ۴ غلظت مختلف از عصاره‌ها تهیه شد و برای رسم نمودار، درصد مهارکنندگی بر علیه غلظت استفاده گردید. در عمل ۳۰۰ میکرولیتر DPPH ۱ 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)

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

A_{DPPH}: جذب DPPH در عدم حضور نمونه

A_{Sample}: جذب DPPH در حضور نمونه

استخراج ترکیبات مختلف از گیاه کمتر گزارش شده است. از طرفی، نتایج بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 عصاره‌گیری و استخراج آنتی‌اکسیدان‌ها و فنل‌ها استفاده می‌شوند (۲، ۹، ۱۰). هدف اول از این تحقیق بررسی اثر تکنیک‌ها و حلال‌های مختلف بر میزان استخراج ترکیبات بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی 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 کارایی 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 آن 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 و ۶۰ درجه) و تحت هم زدن مغناطیسی برای ۲۴ ساعت قرار گرفتند. به از این مدت با استفاده از کاغذ صافی و ایتمن شماره ۴ صاف گردیدند و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه نگهداری شدند.

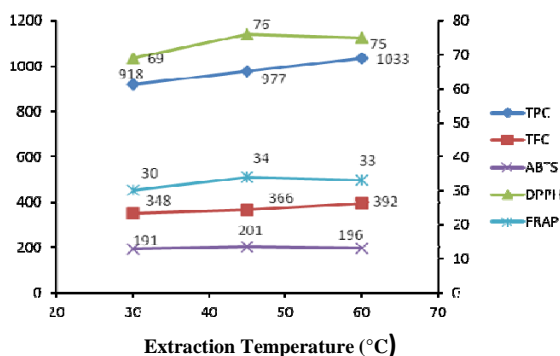
سنجش مقدار فنل تام (TPC): سنجش مقدار فنل تام با

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

تست **FRAP**: روش FRAP با استفاده از TPTZ (۲، ۴، ۶-triaryridyl-s-triazine) انجام گرفت. اساس این روش احیای آهن فریک به فرس (Fe³⁺-TPTZ به Fe²⁺) (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 ۱-۱-۱۰ 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 آرتیمیزینین با استفاده از روش RP-HPLC (فاز معکوس) آنالیز گردید. داروهای مشتق از آرتیمیزینین 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

ABTS و DPPH، FRAP (نتایج در ۱۰۰ گرم گیاه خشک بوده و

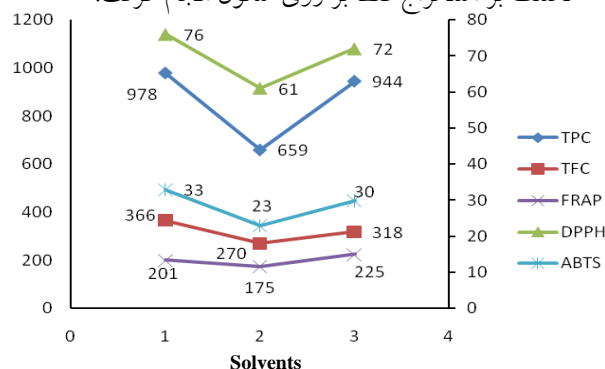
به منظور مقایسه میانگین از آزمون مقایسه Tukey استفاده شد).

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

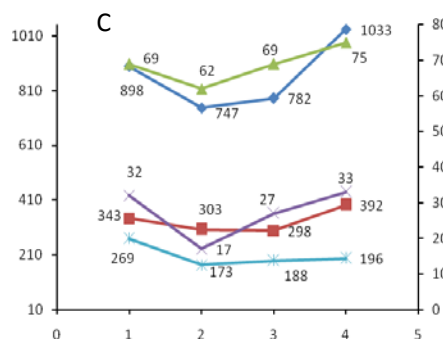
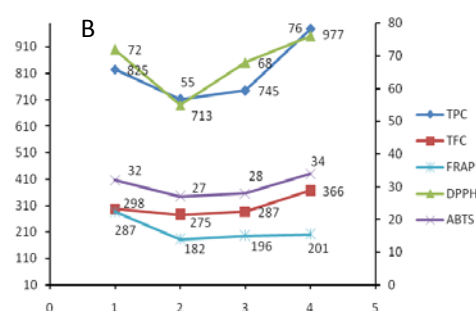
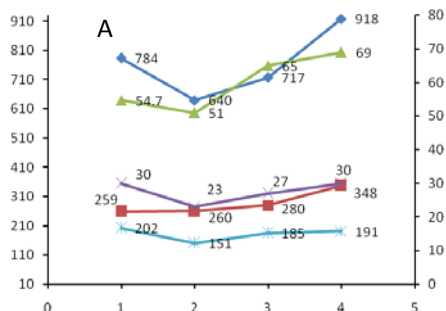
نتایج TLC نشان دادند که حلال استخراج، اثر معنی‌داری بر مقدار محتوی فنلی عصاره دارد به طوری که بیشترین مقدار در متانول ۷۵ درصد و کمترین مقدار آن در متانول ۲۵ درصد مشاهده گردید (شکل ۴).

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.

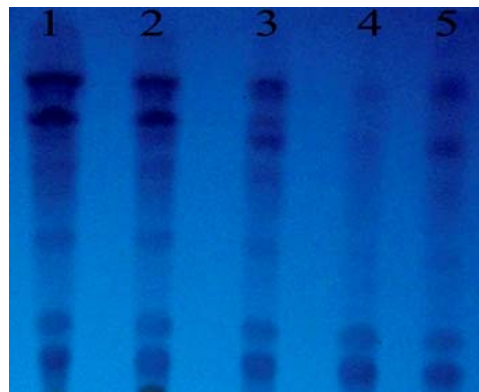


شکل ۲- اثر حلالهای استخراج بر میزان ترکیبات فنولی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در دمای ۴۵ درجه (۱- متانول ۷۵ درصد، ۲- اتانول ۷۵ درصد و ۳- استونیتریل ۷۵ درصد) در تستهای TFC، TPC.

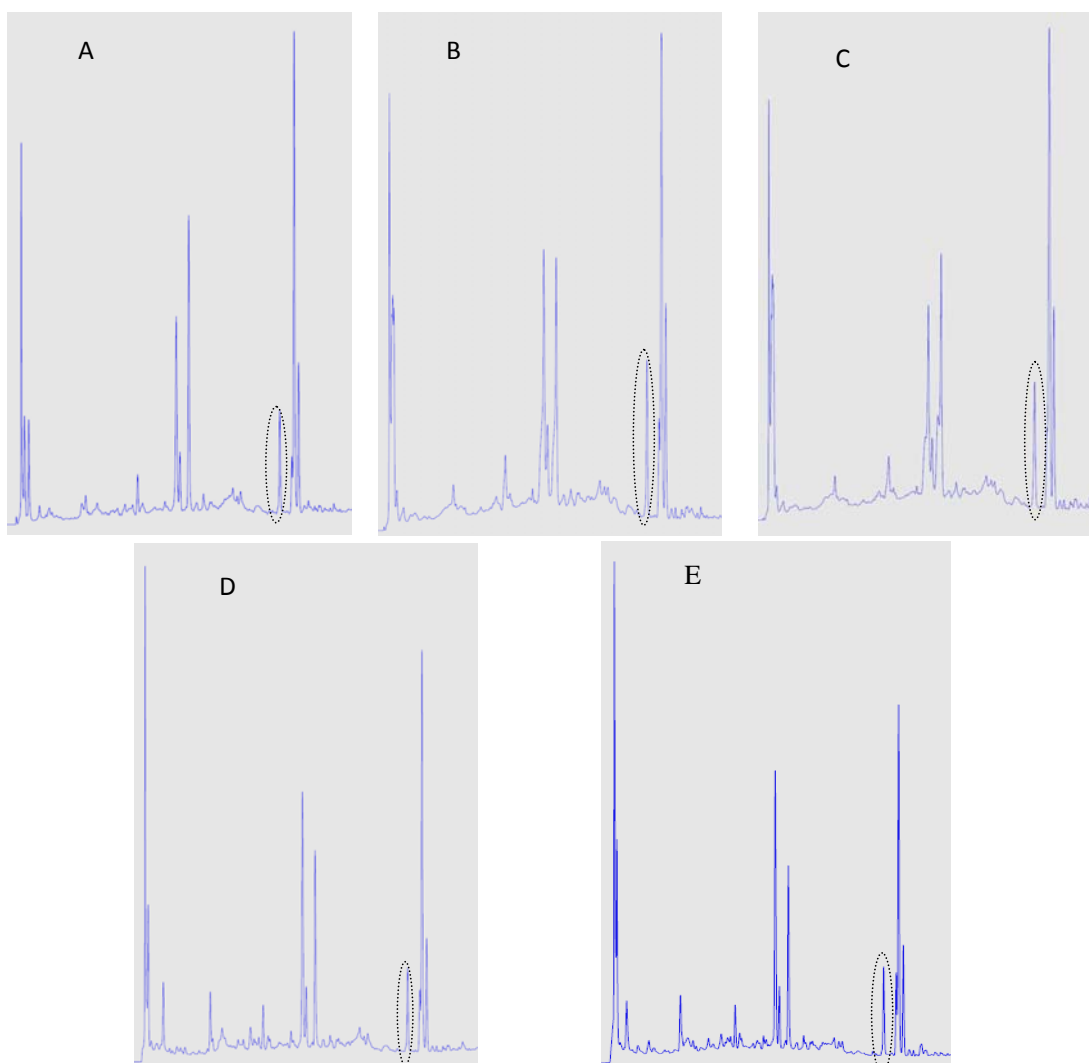


شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف متانول (۱- متانول ۱۰۰ درصد، ۲- متانول ۷۵ درصد، ۳- استونیتریل ۵۰ درصد و ۴- متانول ۲۵ درصد) در تستهای TPC، TFC، FRAP، DPPH و ABTS (A: ۳۰°C، B: ۴۵°C، C: ۶۰°C) (نتایج در ۱۰۰ گرم گیاه خشک بوده و به منظور مقایسه میانگین از آزمون مقایسه Tukey استفاده شد).

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 عصاره‌ها 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 $\mu\text{g/g DW}$) و در متانول ۲۵ درصد پایین‌ترین (۹/۴۵ $\mu\text{g/g DW}$) مشخص گردید (شکل ۵).



شکل ۴- اثر حلال‌های استخراج بر الگوی TLC در دمای 45°C (۱)-
متانول ۷۵ درصد، ۲- متانول ۵۰ درصد، ۳- استونیتریل ۷۵ درصد، ۴-
متانول ۲۵ درصد و ۵- متانول ۱۰۰ درصد).



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

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

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 عصاره‌ها حاوی ترکیب آرتمیزینین نبودند. این نتایج مخالف با تحقیقاتی است که وجود ماده مذکور را گزارش کرده بودند (۱۱ و ۱۲).

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که مقدار قطبیت حلال نقش بسیار مهمی در استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از منابع طبیعی دارد. بر اساس نتایج به دست آمده، غلظت‌های مختلف متانول تأثیر با اهمیتی در محتوای فنلی (TPC و TFC) و آنتی‌اکسیدانی (DPPH و FRAP و ABTS) نشان می‌دهد. در این مورد و با توجه به نتایج آماری و مقایسه نتایج ترکیبات فنولی با آنتی‌اکسیدانی، متانول ۷۵ درصد به

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 dracunculoides* L.) and absinthe (*Artemisia absinthium* L.), *Z Lebensm Unters-Forsch*. 174: 211-215.
- 7- Kriengsak T., Unaraj 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- Naczka, 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.

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