مقایسه عصاره گیری به کمک ریزموج و عصاره گیری سنتی از *Urtica dioica* L. و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن به روش HPLC و DPPH

غلامرضا مطلب[1*]، محمدرضا لهراسبی دشتکی[2] و مسعود نجاتی یزدی نژاد[2]

[1] زابل، دانشگاه زابل، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[2] زابل، دانشگاه زابل، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۲۸

چکیده

در چند سال گذشته استخراج به کمک ریزموج (MAE) به طور قابل توجهی افزایش یافته است چنانکه مزایای اصلی آن (کاهش زمان استخراج و حجم حلال) بیشتر از روشهای استخراج سنتی می‌باشد. در این تحقیق، تاثیرات دو نوع روش استخراج شامل استخراج به کمک ریزموج (MAE) و سنتی روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزنه مورد بررسی قرار گرفت. عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی از برگ و ساقه گزنه از هر دو روش سنتی و ریزموج به دست آمدند و برای تعیین ظرفیت مهار رادیکال آزاد (RSC) به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، آنتی‌اکسیدان‌های جدا شده توسط رادیکال ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از رادیکال آزاد ۱،۱-دی‌فنیل-۲-پیکریل‌هیدرازیل تعیین شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره-های برگ و ساقه (عصاره اتانولی) گزنه بدست آمده از روش ریزموج در مقایسه با روش سنتی بیشتربود، در حالی که اختلاف معنی‌دار نبود ($P>0.05$). البته روش های HPLC و DPPH نشان دادند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ و ساقه گزنه، با روش-های MAE و سنتی اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد.

واژه های کلیدی: فعالیت آنتی اکسیدانی ،ام آ ای ،اچ پی ال سی-دی پی پی اچ ،گزنه

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۸۶۹۰۲۲۰۱ ، پست الکترونیکی: rezamotalleb@gmail.com

مقدمه

گیاهان دارویی منابع طبیعی ارزشمندی هستند که امروزه مورد توجه قرار گرفته و به عنوان مواد اولیه برای تبدیل به داروهای بی‌خطر برای انسان تلقی می‌شوند. در این زمینه ایران یکی از غنی‌ترین منابع گیاهان دارویی جهان به شمار می‌رود که دارای تنوع بالای زیستگاهی برای انواع گیاهان می‌باشد (۵). بنابراین گیاهان را می‌توان به عنوان منبعی از مواد شیمیایی مفید دانست که تنها بخشی از آن مورد بهره-برداری قرار گرفته است. این مواد شیمیایی را نه تنها به عنوان دارو، بلکه می‌توان به عنوان الگو و نقطه شروعی برای ساخت آنالوگ‌های دارویی به کار برد و همچنین از آنها به عنوان مدلی سودمند به منظور فهم و درک بهتر پدیده‌های زیست‌شناختی استفاده کرد (۱۲). بسیاری از تحقیقات پزشکی و علمی بر این پایه استوار است که حضور رادیکال‌های آزاد کنترل نشده در بدن علت مستقیم برخی از مشکلات جسمی است. رادیکال‌های آزاد، اتم‌ها یا مولکول‌هایی با یک الکترون جفت نشده هستند که باعث ناپایداری و تمایل شدید به کسب الکترون می‌گردد. از این رو، به مولکول‌های ساختمانی بدن حمله می‌کنند تا کمبود الکترونی خود را جبران نمایند. البته لازم به ذکر است که رادیکال‌های آزاد به اجزای سلولی مثلا یک رشته پروتئینی

یا یک رشته DNA حمله می کنند و از یکی از اتم‌های موجود در آمینواسید رشته پروتئینی یا نوکلئوتیدهای رشته-ی DNA الکترون می‌گیرند و بنابراین ساختمان سلول دچار تغییر خواهد شد(۱۰). مواد مختلفی مانند پوشش دانه‌ها، هسته انگور(۱۰)، زیتون (۱۷)، ضایعات کاکائو (۲)، ضایعات پالپ هویج و غیره به عنوان منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. گزنه، گیاهی دارویی است که از دوران ما قبل تاریخ نیز وجود داشته و مردم از آن جهت تغذیه استفاده می‌کردند. تاریخ استفاده درمانی از آن نیز به زمان‌های دور باز می‌گردد که برای درمان سرماخوردگی، زخم‌های چرکین، درد ناشی از گزش مار، درد معده و مفاصل، خونریزی، بیماری‌های پوستی (اگزما)، التهاب‌های دهانی و کم‌خونی مورد استفاده قرار می‌گرفته است (۱۸). گزنه با نام علمی *Urtica dioica* L. و نام انگلیسی Common nettle, Stinging nettle, Nettle، گیاهی از تیره *Polygonaceae* یا *Urticaceae*، جنس *Urtica* و گونه *Dioica* است. این گیاه دوپایه، علفی، چند ساله، پایا، سبز و ایستاده به ارتفاع ۵۰ تا ۱۲۰ سانتی‌متر بوده و دارای کرک‌های گزنده می‌باشد. از ریشه‌های خزنده آن پاجوش‌هایی در تمام جهات خارج می‌گردد که باعث می‌شود گیاه به صورت پایه‌های متعدد در آمده و محل رویش خود را به طور کامل فرا گیرد. قسمت‌های مورد استفاده گزنه، برگ‌های تازه، ریشه و شیره حاصل از آن است. دانه آن نیز کم و بیش به مصارف درمانی می‌رسد (۱۵). گیاه گزنه ادرارآور، قابض، ضد انگل و کرم‌کش بوده و در درمان التهاب کلیه، وجود خون در ادرار، مفرط بودن خون عادت ماهیانه، ازدیاد شیر مادران، ادرار و عرق نافع است. همچنین در علاج بیماری‌های قند و صفراوی، تب زرد و نیز بند آوردن خون مؤثر می‌باشد. برای ورم‌های پروستات (سرطان پروستات)، بیماری‌های پوست و مو، آسم، آکنه، کمبود ویتامین C، تسکین درد طحال و کلیه مفید می‌باشد (۱ و ۱۸). در این گیاه استرول‌ها، ساپونین‌ها، آمینواسیدها، کومارین‌ها، ترکیبات حاوی نیتروژن و مواد فنولی در اندام‌های هوایی و استرول‌ها و تری‌ترپنوییدها در ریشه گزنه شناسایی شده‌اند (۹). گزنه همچنین دارای تانن، لسیتین، لعاب، فورمیک‌اسید، نیترات‌پتاسیم و کلسیم، ترکیبات آهن، آلومینیم، گوگرد و ویتامین C است (۱۸). یکی از مطمئن ترین و کارآمدترین روشها برای استخراج ترکیبات موجود در بافتهای گیاهی استخراج به کمک امواج مایکروویو (MAE) است که از روشهای سریع و مؤثر به شمار می رود (۱۰). این روش دارای مزایای زیادی نسبت به روشهای مرسوم استخراج میباشد از جمله میتوان به دمای پایین تر،حلال مصرفی بسیار کمتر و راندمان استخراج بالاتر اشاره کرد (۶). روش MAE به عنوان روش استخراج به همراه تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی توسط معرف DPPH و روش HPLC دارای سرعت عمل و دقت خوبی در غلظتهای پایین آنتی اکسیدان نیز قابل استفاده است (۸). با توجه به انجام عصاره گیری سنتی این گیاه از دیرباز و عدم وجود سابقه پژوهش در مورد مقایسه میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره سنتی و عصاره استخراج شده به کمک امواج مایکروویو گیاه گزنه، در این تحقیق ضمن مقایسه عصاره گیری به کمک امواج ماکروویو (ریزموج) و عصاره گیری سنتی از برگ و ساقه گیاه گزنه فعالیت آنتی اکسیدانی آنها به روش HPLC-DPPH (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا) ارزیابی گردید.

مواد و روشها

مواد مصرفی گیاه خشک شده گزنه (*Urtica dioica*) جمع‌آوری شده از منطقه قمصرکاشان، DPPH (سیگما– آمریکا)، متانول (مرک – آلمان)، اتانول (مرک – آلمان)، آب مقطر می باشد

تجهیزات آزمایشگاهی: دستگاه مایکروویو (MILESTONE–ایتالیا)، دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC- JASCO مجهز به سیستم تزریق اتوماتیک به حجم ۱۰۰ میکرولیتر– ژاپن)، دستگاه

اسپکتروفتومتر UV-Vis. دو پرتویی (RAYLEIGH UV-2100، همزن برقی،پارافیلم.

روش انجام آزمایش: ابتدا برگهای گیاه از ساقه جدا گردید و هر یک به طور جداگانه تحت شرایط طبیعی محیطی و با استفاده از جریان هوابه مدت ده روز در سایه خشک شده و با استفاده از دستگاه آسیاب بصورت پودر درآمدند. سپس جهت استفاده در مراحل بعدی در دمای ۴°C نگهداری شدند.در این طرح، میزان آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره برگ و ساقه گیاه گزنه که در شرایط بهینه با روش مایکروویو استخراج شده بود، به طور غیرمستقیم توسط روش HPLC ارزیابی شد و با میزان آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره سنتی مورد مقایسه قرار گرفت. بدین منظور از DPPH بعنوان یک عامل اکسنده استفاده می‌شود که در ناحیه مرئی دارای جذب بوده و از قانون بیر–لامبرت پیروی می‌کند. در حضور ترکیبات آنتی اکسیدان (دارای ویژگی احیاء کنندگی) این معرف واکنش داده و میزان جذب آن کاهش می‌یابد. همین کاهش در میزان جذب، مبنای ارزیابی محتوای آنتی‌اکسیدانی عصاره نمونه گیاهی خواهد بود که در کروماتوگرام HPLC بصورت کاهش سطح زیر پیک ظاهر می‌گردد. برای عصاره‌گیری، پارامترهای نوع حلال (اتانولی، متانولی وآبی)، توان دستگاه مایکروویو، زمان عصاره‌گیری و دمای استخراج بهینه شد.

تهیه محلول DPPH: جهت تهیه محلول ۵۰۰ µM از DPPH، ۰/۰۰۱۹۷ گرم از ماده جامد را برداشته و با اتانول به حجم ۱۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم (۱۷).

بررسی طیف جذبی معرف DPPH: برای بررسی کروماتوگرام DPPH، محلول استاندارد تهیه شده به دستگاه HPLC تزریق شد. چنانکه شرایط کاری HPLC بصورت زیر تنظیم شده است:سرعت جریان فاز متحرک: ml/min ۱، طول‌موج دتکتور: nm ۵۱۷، آب: متانول به نسبت (۷۰:۳۰) v/v، ستون: Finepak sil C18-10 (4.6 x 250 mm, Jasco, Tokyo, Japan) حجم تزریق: µl ۱۰۰ به صورت اتوماتیک.

تهیه عصاره گزنه: از پودر گیاه گزنه تهیه شده در مرحله قبل (برگ و ساقه) استفاده شد.

۰/۵ گرم از آن توسط ترازو، اندازه‌گیری شده و در سل دستگاه مایکروویو قرار گرفت. به ظرف حاوی گیاه، ۱۰ میلی‌لیتر حلال (اتانولی، متانولی وآبی) اضافه شد. پارامترهای دستگاه بصورت پیش‌فرض تنظیم شد: توان ۳۰۰ وات، دما C ۷۵° و زمان ۱۵ دقیقه. در پایان استخراج، محلول فوق توسط کاغذ صافی۱۵۰ میلی‌متری صاف گردید. عصاره تهیه شده بلافاصله مورد استفاده قرار گرفت و یا اینکه تا زمان استفاده در دمای ۴°C در تاریکی قرار داده شد (۳).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه گزنه: پس از عصاره‌گیری، ۱ میلی‌لیتر از محلول DPPH، به ۱ میلی‌لیتر از عصاره مورد نظر اضافه شد. پس از ۲۰ دقیقه تکان دادن در محیطی تاریک، محلول فوق به دستگاه HPLC تزریق شد.حجم تزریق شده به دستگاه برابر ۲۰ میکرولیتر عصاره‌های به‌دست آمده از هر سه حلال (برگ و ساقه نیز به طور جداگانه) به صورت بالا واکنش داده و آنالیز شد. سپس بر اساس سطح زیر پیک کروماتوگرام مربوطه، بهینه-سازی نوبتی انجام شد.

بهینه‌سازی توان دستگاه مایکروویو: عصاره گیری از برگ و ساقه، در توان‌های ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ ، ۵۰۰ و ۶۰۰ وات طی ثابت نگه داشتن سایر عوامل انجام شد. سپس نمونه‌ها با DPPH وارد واکنش شده و مورد بررسی قرار گرفتند (۱۴).

بهینه‌سازی زمان عصاره‌گیری: عصاره‌گیری با انتخاب توان مناسب و ثابت نگه داشتن سایر عوامل در زمان‌های ۲، ۵، ۱۰، ۱۵و ۲۰ دقیقه انجام شد (۷).

بهینه‌سازی دمای استخراج: عصاره‌گیری در دماهای ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد با انتخاب توان و زمان مناسب و ثابت نگه داشتن سایر عوامل انجام شد. سپس عصاره‌ها با DPPH واکنش داده شده و بررسی گردیدند (۳).

عصاره‌گیری سنتی: ۲/۵ گرم پودر گیاه خشک شده گزنه (برگ یا ساقه) به ۵۰ میلی‌لیتر از هر حلال (معادل نسبت نمونه و حلال در روش مایکروویو) درون بشر اضافه شده و به مدت ۴۸ ساعت روی همزن برقی با سرعت rpm ۴۰۰ قرار گرفت. پس از جدا کردن ذرات جامد توسط کاغذ صافی عصاره ها برای انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای $4^{\circ}C$ نگهداری شد (۱۳).

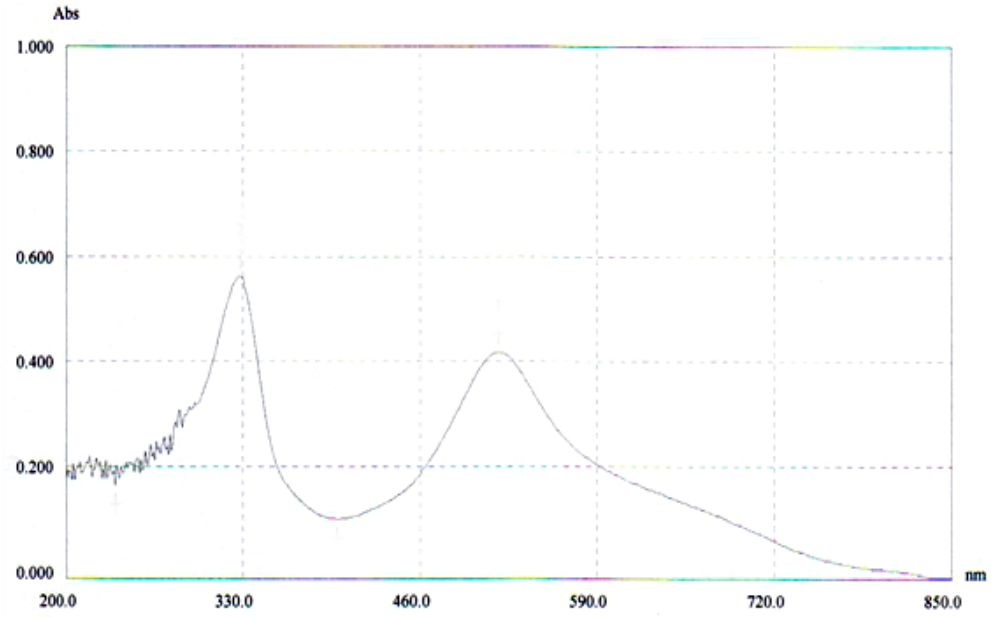
مقایسه عصاره‌گیری سنتی با عصاره‌گیری توسط مایکروویو: ۱ میلی‌لیتر از عصاره سنتی را با محلول DPPH به نسبت ۱:۱ وارد واکنش کرده و مخلوط واکنش توسط HPLC مورد آنالیز قرار گرفت. سپس نتایج مربوطه با نتایج مربوط به عصاره استخراج شده توسط مایکروویو، مقایسه گردید.

برای آنکه بهترین شرایط کاری برگزیده شوند، لازم است که متغیرهای آزمایشگاهی را در سطوح مختلف مورد ارزیابی آماری قرار دهیم.

بدین منظور، از نسخه ۱۶ نرم افزار SPSS برای اجرای آنالیز واریانس از One-Way ANOVA و Multiple Comparison استفاده شد (هر اندازه گیری سه بار تکرار گردید).

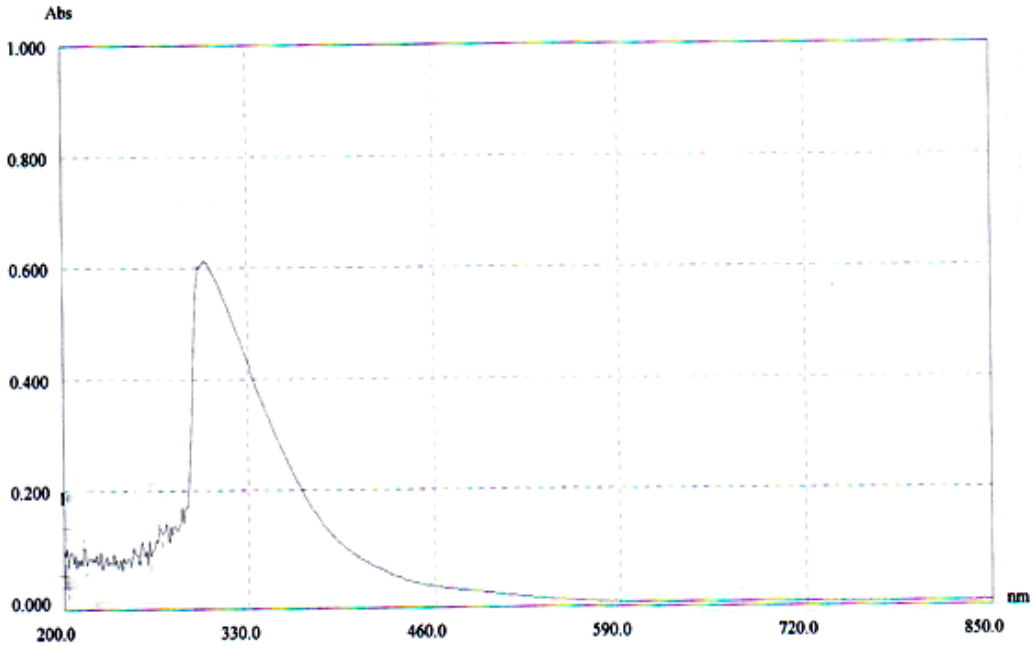
نتایج

در این مطالعه، پس از بهینه کردن عوامل مؤثر بر فرآیند استخراج توسط امواج مایکروویو، میزان خاصیت آنتی-اکسیدانی عصاره برگ و ساقه استخراج شده توسط روش مایکروویو با یکدیگر و همچنین با عصاره سنتی مقایسه گردید.



شکل۱- طیف جذبی محلول DPPH استاندارد

پیک جذبی قوی مشاهده شده در طول موج ۵۱۷nm مربوط به تک الکترون جفت نشده روی ساختار رادیکال آزاد می‌باشد که توانایی رزونانس با حلقه‌های کناری خود را دارد و محل انجام واکنش احیاء می‌باشد. با انجام واکنش، این الکترون آزاد توسط تک الکترون آنتی‌اکسیدان جفت می‌شود و در واقع رادیکال آزاد خنثی می‌گردد. این حالت در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است.



شکل۲- طیف جذبی محلول DPPH احیاء شده توسط آنتی‌اکسیدان

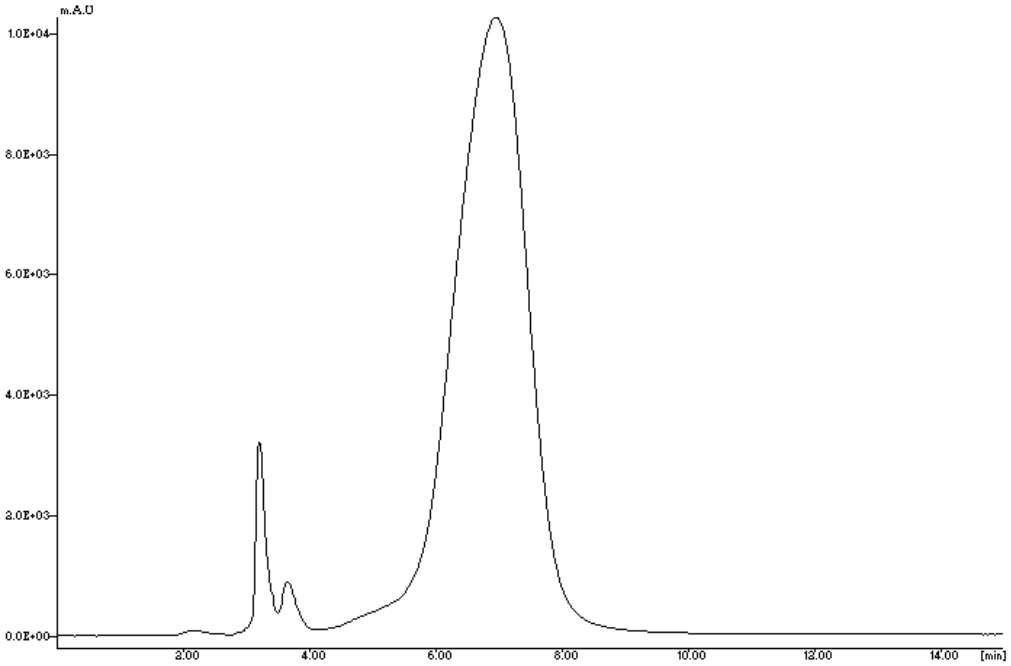
این فرایند در کروماتوگرام HPLC بصورت کاهش ارتفاع و سطح زیر پیک ظاهر می‌گردد که طبق فرمول زیر برای محاسبه میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها بکار می‌رود (۱۷).

$$\Delta S = S_{blank} - S_{sample}$$

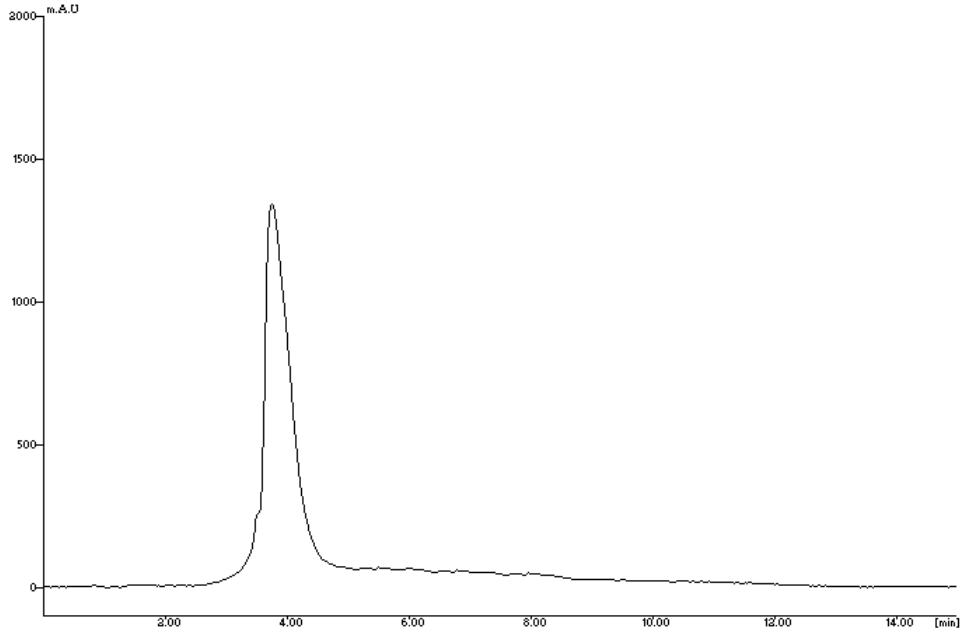
پارامترهای موجود بصورت زیر تعریف می‌شوند:

تفاضل سطح زیر پیک (میزان خاصیت آنتی‌اکسیدان) ΔS = سطح زیر پیک محلول استاندارد DPPH $= S_{blank}$ سطح زیر پیک محلول استاندارد DPPH بعد از واکنش با عصاره گیاهی $= S_{sample}$

استخراج عصاره برگ گزنه به کمک مایکروویو: استخراج عصاره برگ گزنه جهت دست‌یابی به شرایط بهینه، توسط آب مقطر و حلال‌های آلی اتانول و متانول، در توان، زمان و دماهای مختلف انجام شد(۱۴). ابتدا محلول ۰/۵ میلی مولار DPPH به HPLC تزریق شد و پس از ۳ بار آنالیز، میانگین سطح زیر پیک آن به عنوان مرجع به دست آمد. سپس هر یک از عصاره‌ها با محلول استاندارد DPPH وارد واکنش شده و میزان آنتی‌اکسیدان هر عصاره مشخص شد. پیک مشاهده شده در بازه زمانی ۳ تا ۴ دقیقه مربوط به اتانول می‌باشد (شکل۴).



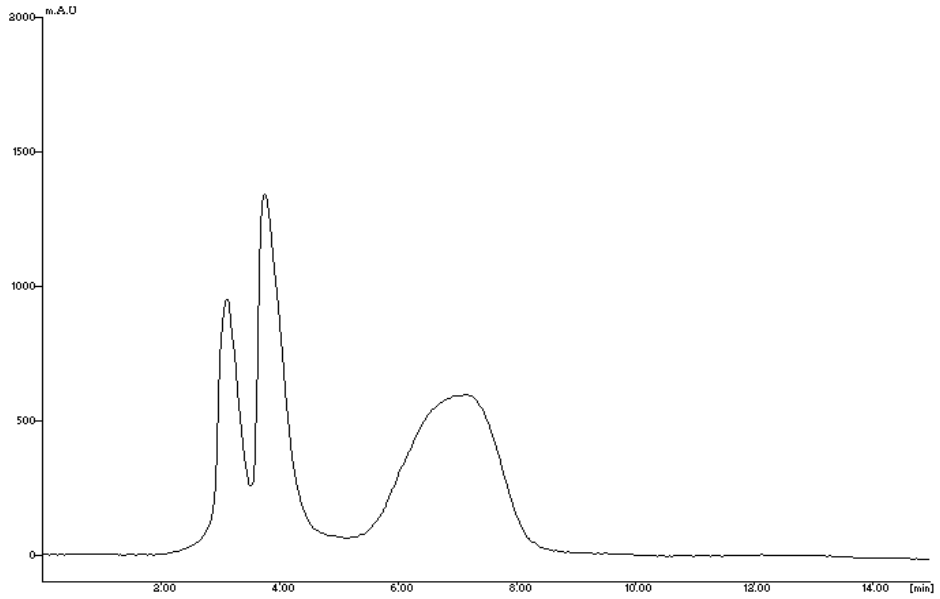
شکل ۳-کروماتوگرامDPPHاستاندارد(طول موج ۵۱۷ nmسرعت جریان ۱ml/min)



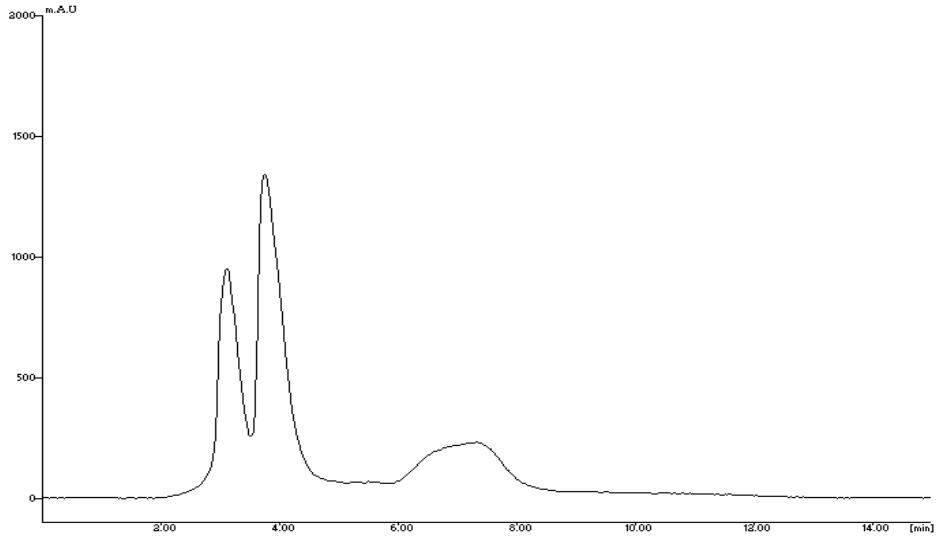
شکل ۴- کروماتوگرام اتانول (طول موج ۵۱۷ nmسرعت جریان ۱ml/min)

پس از آن، سطح زیر پیک عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی پس از واکنش با DPPH، با سطح زیر پیک DPPH استاندارد مقایسه گردید. تفاوت سطح زیر پیک‌ها، برابر با میزان آنتی‌اکسیدانی است که برای خنثی کردن رادیکال آزاد DPPH صرف شده است (۱۷).

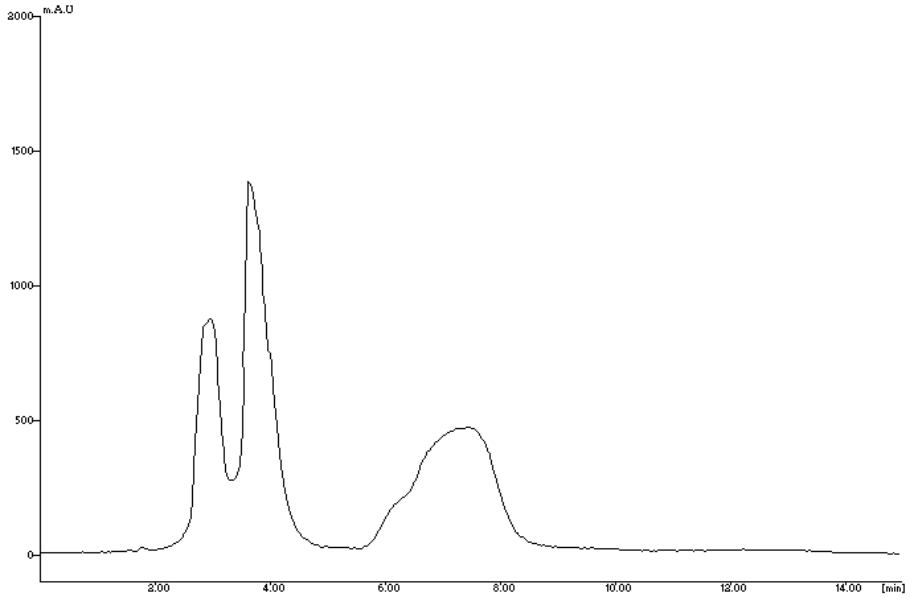
بهینه‌سازی نوع حلال استخراج: ابتدا برای انتخاب حلال مناسب، استخراج به کمک حلال‌های مذکور (متانول- اتانول و آب) انجام شد که کروماتوگرام‌های مربوطه در ادامه آمده است (به ترتیب شکلهای ۷ ،۶ ،۵).



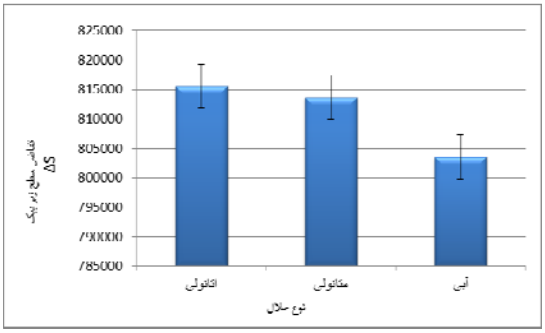
شکل ۵- کروماتوگرام عصاره متانولی بعد از واکنش با DPPH (طول موج ۵۱۷ nm،سرعت جریان۱ ml/min)



شکل ۶- کروماتوگرام عصاره اتانولی بعد از واکنش با DPPH (طول موج ۵۱۷ nm، سرعت جریان ۱ ml/min)



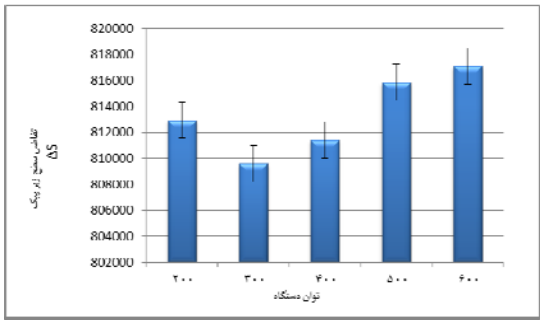
شکل ۷- کروماتوگرام عصاره آبی با DPPH (طول موج ۵۱۷ nmسرعت جریان ۱ml/min)



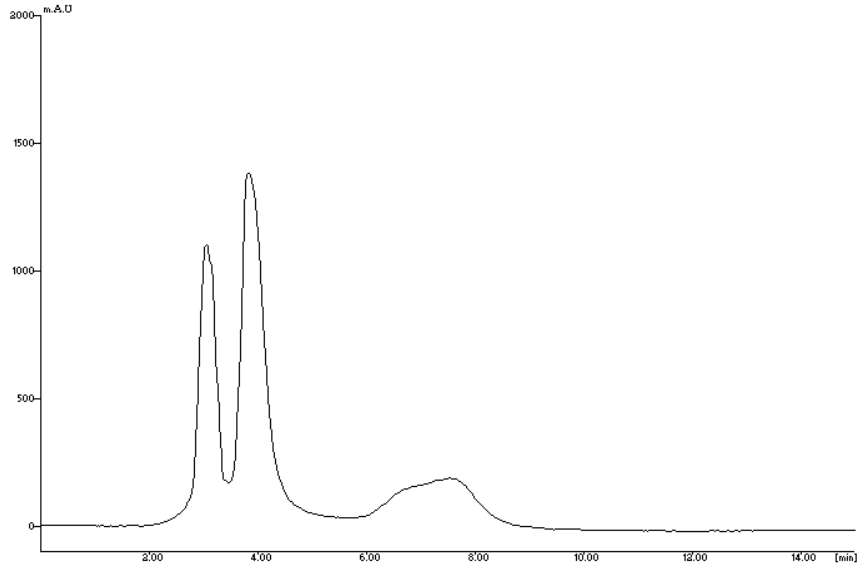
شکل۸- میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی استخراج شده به روش مایکروویو.

نتایج نشان می‌دهند که میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره حلال‌های آلی به مراتب بیشتر از محتوای عصاره آبی می‌باشد. با توجه به شکل۸ تفاوت سطح زیر پیک در عصاره اتانولی بیشترین میزان بوده و بیانگر بالاترین میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در بین سه عصاره اتانولی، متانولی و آبی در برگ گزنه است. آنالیز واریانس (ANOVA) ، بین حلال‌های آلی و آب تفاوت معنی‌داری نشان داد ($p<0.05$). اما تفاوت معنی‌داری بین حلال‌های آلی وجود نداشت ($P>0.05$). در عین حال در حلال اتانول میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدان بیشتری وجود دارد. بنابراین، در ادامه بهینه‌سازی فرایند استخراج از اتانول به عنوان حلال استخراجی استفاده شد.

بهینه‌سازی توان دستگاه مایکروویو: استخراج در توان‌های ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ وات انجام شده و بررسی گردیدند. نتایج نشان دادکه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در توان ۶۰۰ وات حداکثر می‌باشد.کروماتوگرام عصاره استخراج شده در توان ۶۰۰ (شکل ۹)، حداکثر میزان کاهش سطح زیر پیک را دارد که نشان دهنده بیشترین میزان محتوای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در این عصاره است (حلال:اتانول).

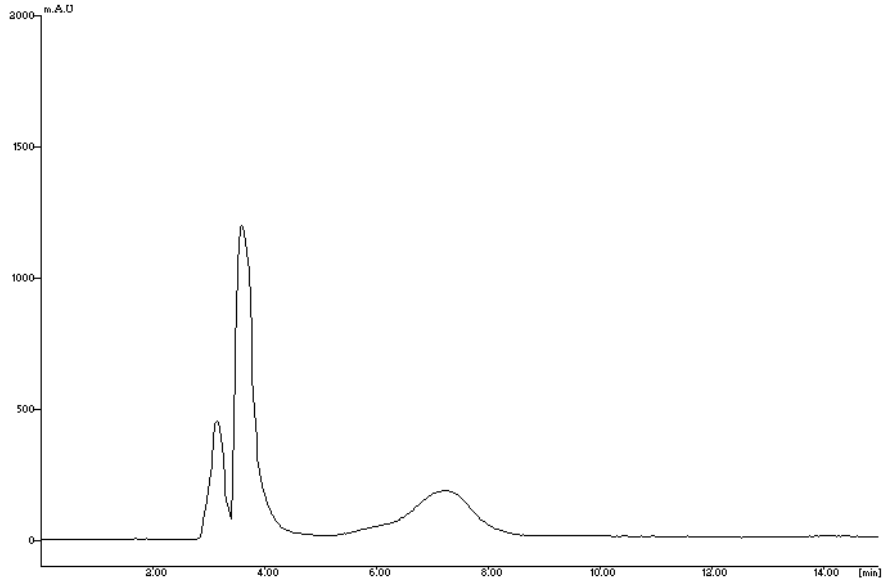


شکل ۱۰- مقایسه توان مایکروویو بر روی میزان خاصیت آنتی-اکسیدانی عصاره اتانولی

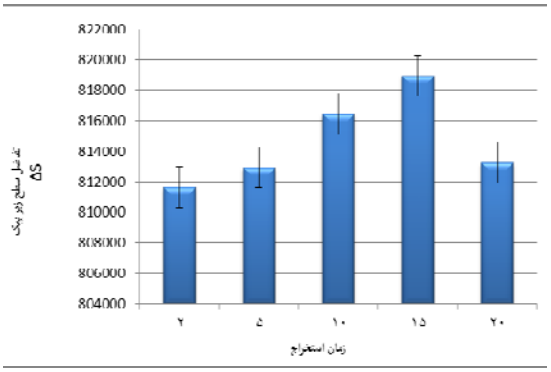


شکل ۹- کروماتوگرام عصاره گرفته شده در توان ۶۰۰ وات(حلال اتانول، طول موج ۵۱۷ nm،سرعت جریان ۱ml/min)

هر چندآنالیز واریانس (ANOVA) تفاوت معنی‌داری بین توان‌های مختلف نشان نداد ($P> 0.05$). این در حالی است که میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی در توان ۶۰۰ وات بیشترین می‌باشد. لذا در ادامه کار از توان ۶۰۰ وات برای عصاره‌گیری استفاده گردید.عصاره‌گیری در زمان‌های ۲، ۵، ۱۰، ۱۵و ۲۰ دقیقه انجام شد و نتایج نشان دادکه عصاره-گیری در۱۵ دقیقه بیشترین بازدهی را دارد (شکل۱۱)و نشان دهنده بیشترین میزان محتوای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در این عصاره است. البته بازده استخراج به مرور زمان در توان۶۰۰ وات افزایش می‌یابد.

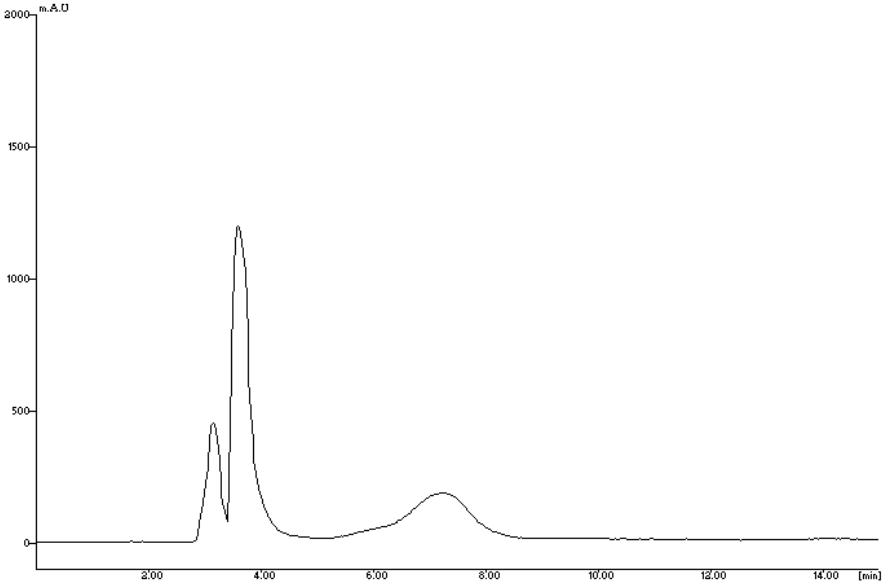


شکل ۱۱- کروماتوگرام عصاره استخراج شده پس از ۱۵ دقیقه (حلال اتانول،توان۶۰۰ وات،طول موج ۵۱۷ nm،سرعت جریان ۱ ml/min)

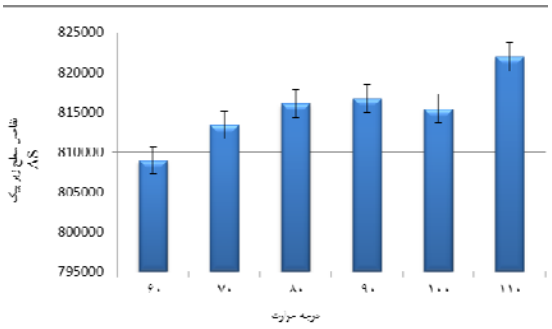


شکل ۱۲- مقایسه زمان استخراج با توان ۶۰۰ وات بر روی میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی

میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ در ۱۵ دقیقه بیشترین می‌باشد. آنالیزواریانس(ANOVA) نیز بین زمان-های مختلف به ویژه ۲ و ۱۵دقیقه اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P>0.05$). بنابراین،درادامه کارزمان ۱۵ دقیقه بعنوان زمان بهینه برای عمل استخراج استفاده گردید. عصاره‌گیری در درجه حرارت‌های ۶۰،۷۰،۸۰،۹۰ ،۱۰۰و۱۱۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. نتایج نشان داد که میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره استخراجی در دمای ۱۱۰°C بیشتر ازدماهای دیگراست.



شکل۱۳- کروماتوگرام عصاره‌ای که در دمای ۱۱۰°C استخراج شده و با DPPH وارد واکنش شده است (طول موج ۵۱۷ nm، سرعت جریان ۱ ml/min)

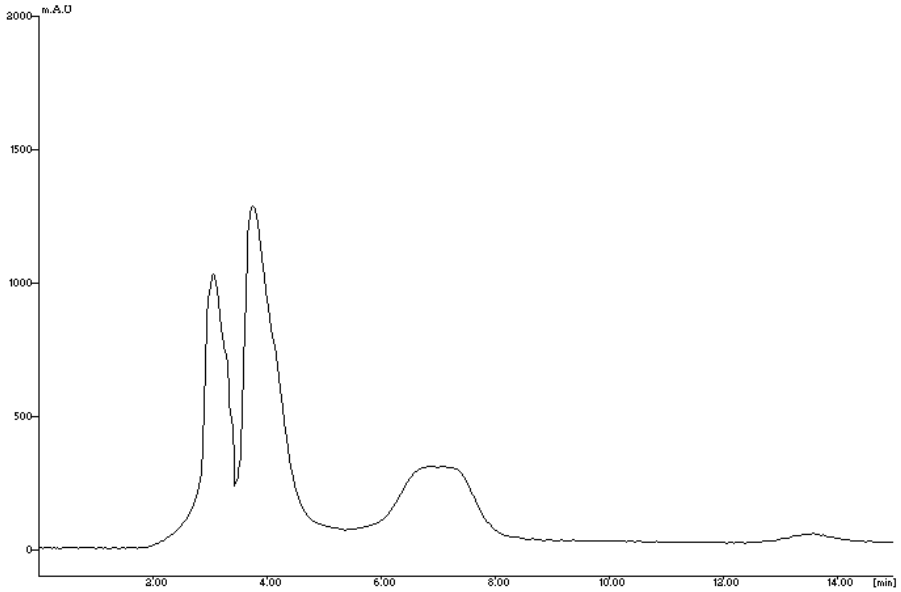


شکل۱۴- استخراج میزان آنتی‌اکسیدان عصاره‌ها در درجه حرارت ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد با دستگاه مایکروویو

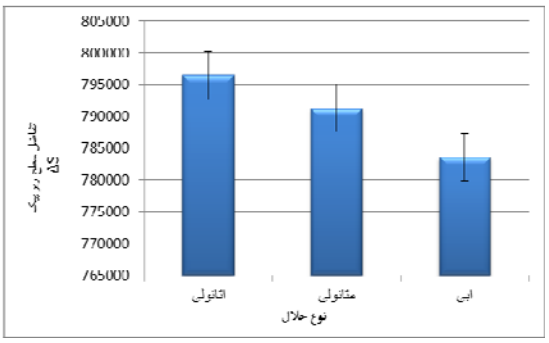
گرچه آنالیزواریانس(ANOVA)ارتباط معنی‌داری بین دماها نشان نداد ($P> 0.05$). اما در عین حال در دمای ۱۱۰°C میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بیشتری وجود دارد؛ لذا این دما بعنوان درجه حرارت بهینه برای عمل استخراج استفاده گردید.

استخراج عصاره ساقه گزنه به کمک مایکروویو: بهینه-سازی نوع حلال استخراج: آنالیزواریانس (ANOVA) بین حلال‌های اتانول وآب تفاوتی معنی‌دار نشان داد ($P<0.05$) اما تفاوت معنی‌داری بین حلال‌های آلی وجود نداشت

($P>0.05$). در عین حال در حلال اتانول میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدان بیشتری وجود دارد. بنابراین، در ادامه بهینه-سازی فرایند استخراج از اتانول به عنوان حلال استخراجی استفاده گردید.



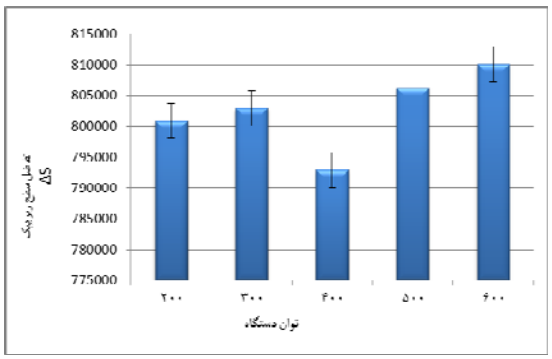
شکل۱۵- کروماتوگرام عصاره اتانولی بعد از واکنش با DPPH (طول موج ۵۱۷ nm، سرعت جریان ۱ ml/min)



شکل۱۶- میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی استخراج شده به روش مایکروویو.

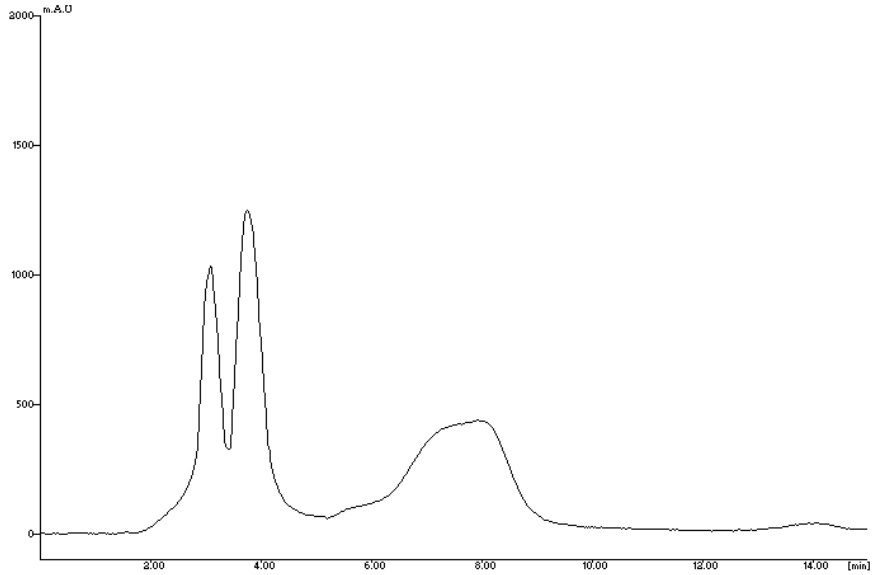
بهینه‌سازی توان دستگاه مایکروویو: نتایج نشان داد که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی درتوان ۶۰۰ وات حداکثر می باشد(شکل۱۷).

با افزایش توان دستگاه مایکروویو از ۳۰۰ به ۴۰۰ وات، میزان ترکیبات استخراج شده از ساقه گیاه کاهش می‌یابد که می‌تواند ناشی از تخریب برخی ترکیبات مؤثره حساس به ویژه گلیکوزیدها در این توان و دمای متناسب باآن باشد (۳). اما در توان‌های بالاتر از ۴۰۰ وات با افزایش این ترکیبات مواجه می‌شویم و این امر می‌تواند به دلیل افزایش استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره ساقه در دمای بالای حاصل از امواج مایکوویو باشد(۷). گرچه آنالیز واریانس (ANOVA) تفاوت معنی‌داری بین توان‌های مختلف نشان نداد ($P>0.05$). اما میزان خاصیت آنتی-اکسیدانی در توان ۶۰۰ وات بیشینه می‌باشد؛ لذا در ادامه از توان مذکور برای عصاره‌گیری استفاده گردید.

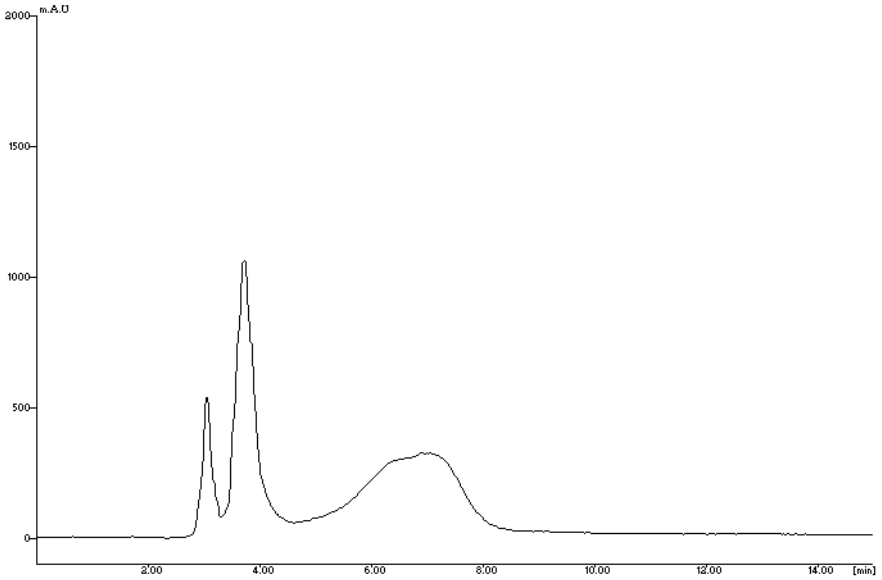


شکل۱۸- مقایسه توان مایکروویو بر روی میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی ساقه گزنه

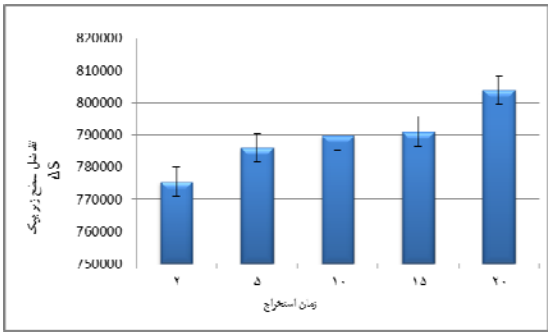
بهینه‌سازی زمان عصاره‌گیری: نتایج نشان داد عصاره‌گیری این عصاره است.
در زمان ۲۰ دقیقه دارای بیشترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در



شکل۱۷- کروماتوگرام عصاره گرفته شده در توان ۶۰۰ وات (حلال اتانول، طول موج ۵۱۷ nm، سرعت جریان ۱ ml/min)



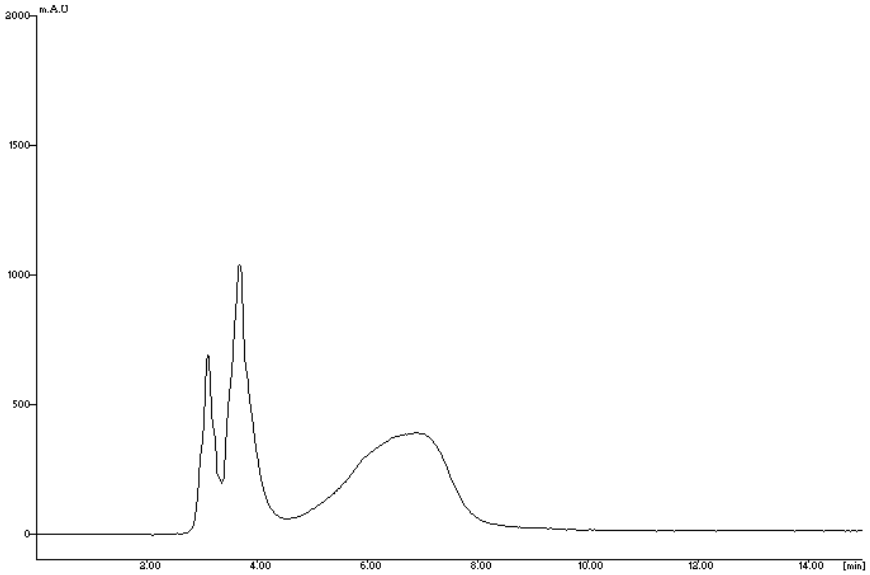
شکل۱۹-کروماتوگرام عصاره استخراج شده پس از ۲۰ دقیقه (حلال اتانول، توان ۶۰۰ وات ، طول موج ۵۱۷ nm، سرعت جریان ۱ ml/min)



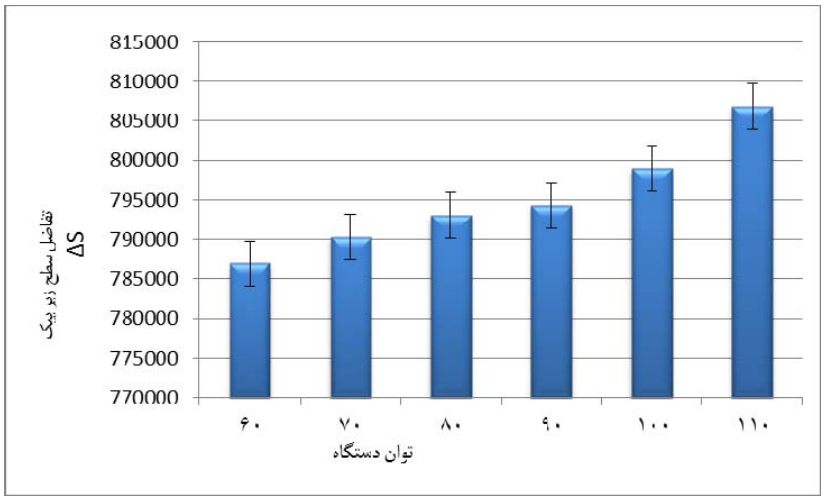
شکل۲۰-مقایسه زمان استخراج با توان ۶۰۰ وات بر روی میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی ساقه گزنه

بازده استخراج به مرور زمان در توان ۶۰۰ وات افزایش می‌یابد. با افزایش زمان تا ۲۰ دقیقه، میزان ترکیبات آنتی-اکسیدانت استخراج شده از ساقهٔ گیاه به حداکثر می‌رسد (۷) گرچه آنالیز واریانس (ANOVA) بین زمان‌های مختلف اختلاف معنی‌داری نشان نداد($P> 0.05$).

بهینه سازی دمای استخراج: نتایج نشان داد که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره استخراجی در دمای ۱۱۰°C بیشتر از محتوای عصاره در دماهای دیگر است.



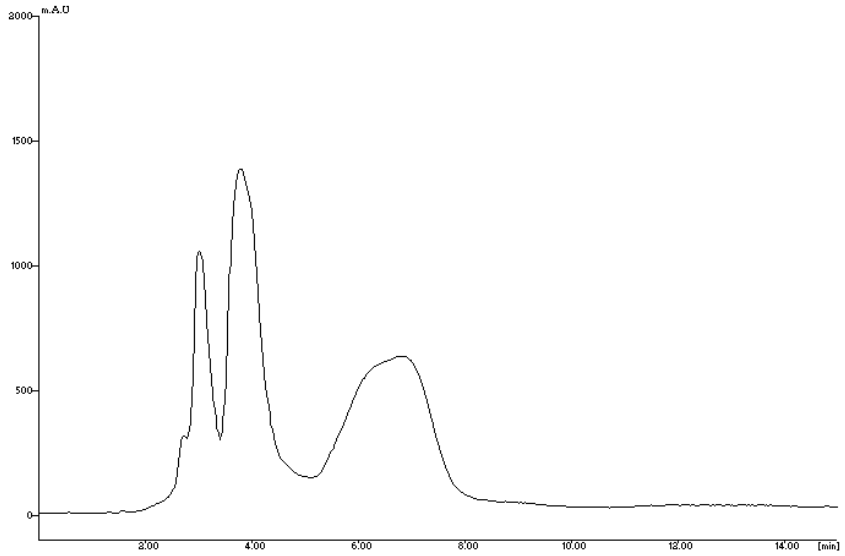
شکل۲۱- کروماتوگرام عصاره‌ای که در دمای ۱۱۰°C استخراج شده و با DPPH وارد واکنش شده است (طول موج ۵۱۷ nm، سرعت جریان ۱ ml/min)



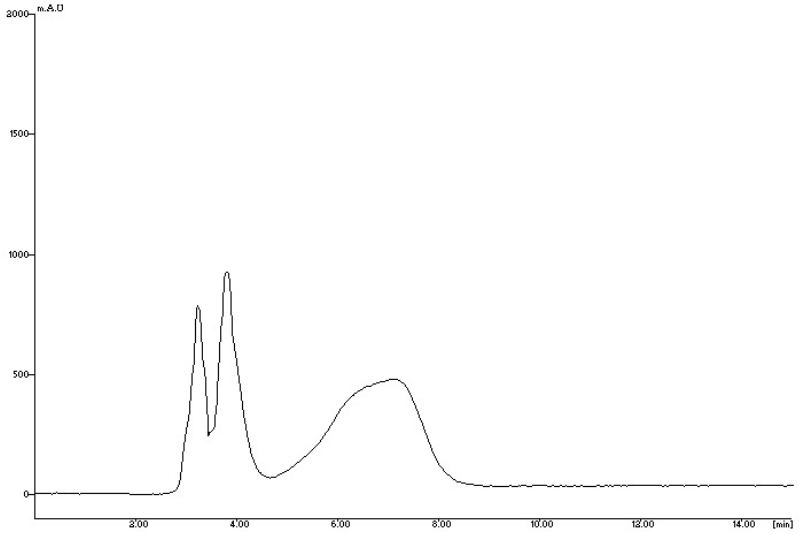
شکل۲۲-میزان آنتی‌اکسیدان عصاره‌هایی که در درجه حرارت ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد با دستگاه مایکروویو استخراج شدند.

آنالیز واریانس (ANOVA) ارتباط معنی‌داری بین دماها نشان نمی‌دهد ($P>0.05$). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت دمای استخراج تأثیر چندانی در فرایند عصاره‌گیری ندارد. در عین حال در دمای ۱۱۰°C میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بیشتری وجود دارد؛ لذا این دما بعنوان درجه حرارت بهینه برای عمل استخراج استفاده شد.

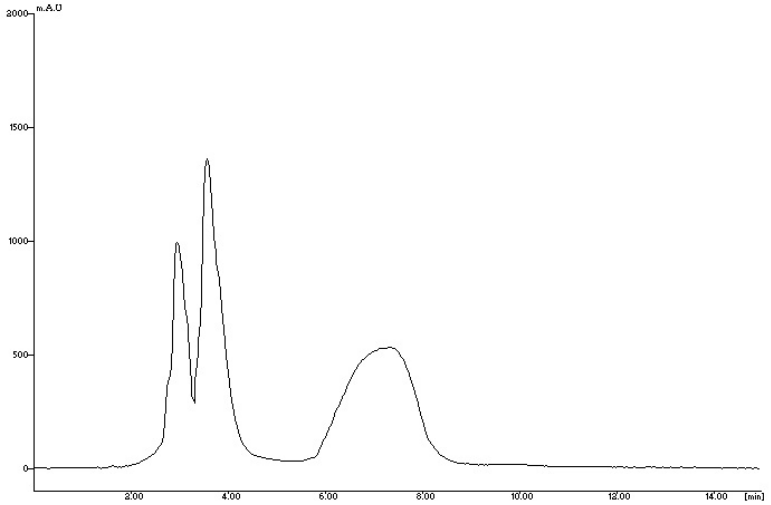
استخراج عصاره برگ و ساقه گزنه به روش سنتی: استخراج عصاره‌ها توسط حلال‌های اتانول، متانول و آب انجام شد تا حالت بهینه هر یک از اندام‌ها برای مقایسه با عصاره حاصل از روش مایکروویو بدست آید.



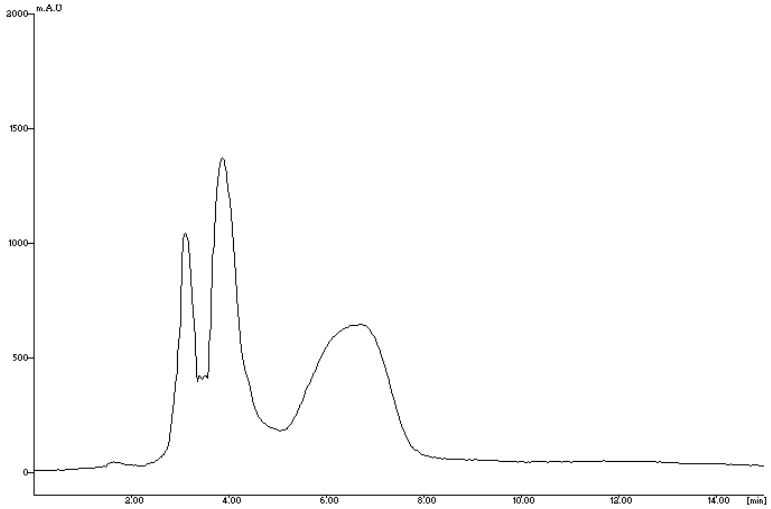
شکل۲۳- کروماتوگرام عصاره اتانولی برگ به روش سنتی که با DPPH وارد واکنش شده‌است (طول موج ۵۱۷ nm، سرعت جریان ۱ ml/min)



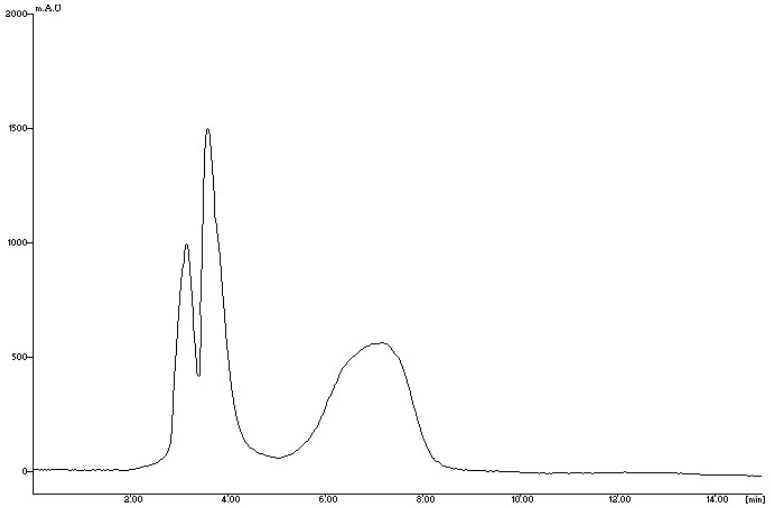
شکل۲۴- کروماتوگرام عصاره متانولی برگ به روش سنتی که با DPPH وارد واکنش شده‌است (طول موج ۵۱۷ nm، سرعت جریان ۱ ml/min)



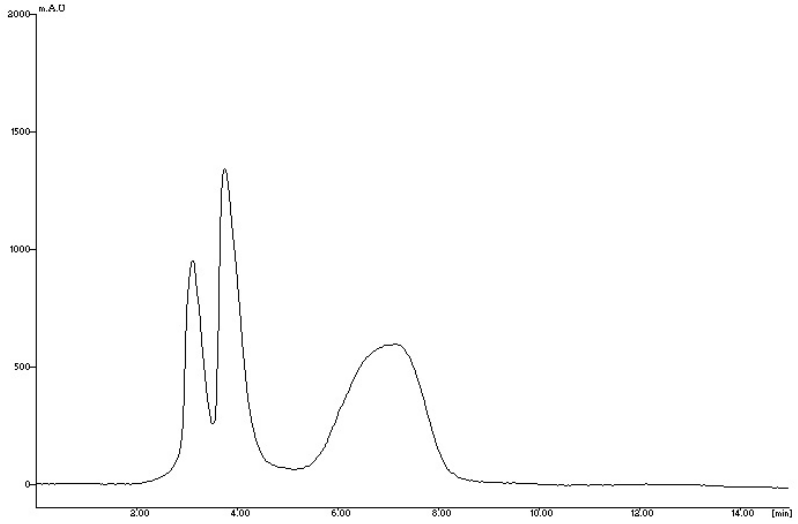
شکل۲۵- کروماتوگرام عصاره آبی برگ به روش سنتی که با DPPH وارد واکنش شده‌است (طول موج ۵۱۷ nm، سرعت جریان ۱ ml/min)



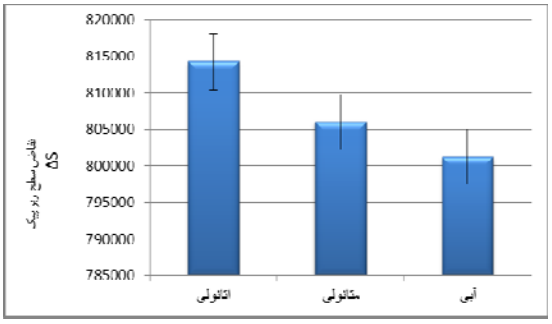
شکل۲۶-کروماتوگرام عصاره اتانولی ساقه به روش سنتی که با DPPH وارد واکنش شده‌است (طول موج ۵۱۷ nm، سرعت جریان ۱ ml/min)



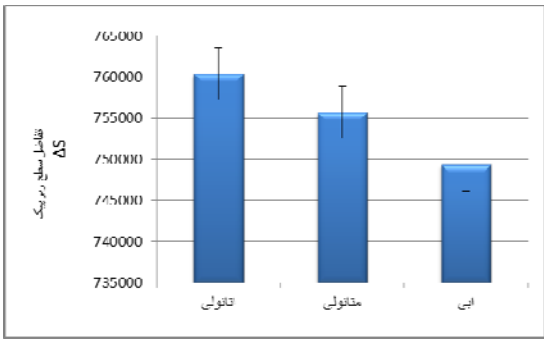
شکل۲۷-کروماتوگرام عصاره متانولی ساقه به روش سنتی که با DPPH وارد واکنش شده‌است (طول موج ۵۱۷ nm، سرعت جریان ۱ ml/min)



شکل۲۸-کروماتوگرام عصاره آبی ساقه به روش سنتی که با DPPH وارد واکنش شده‌است (طول موج ۵۱۷ nm، سرعت جریان ۱ ml/min)



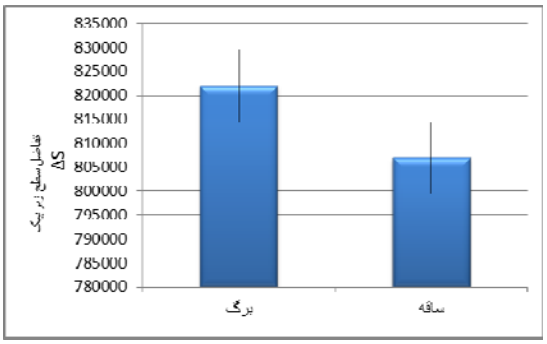
شکل۲۹-مقایسه عصاره‌های برگ بدست آمده به روش سنتی که با DPPH وارد واکنش شده‌است (طول موج ۵۱۷ nm، سرعت جریان ۱ ml/min)



شکل۳۰-مقایسه عصاره‌های ساقه بدست آمده به روش سنتی که با DPPH وارد واکنش شده‌است (طول موج ۵۱۷ nm، سرعت جریان ۱ ml/min)

نتایج نشان دادکه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی ساقه گزنه بیشتر از سایر حلال‌ها می‌باشد شکل-های(۲۹و۳۰).همچنین، خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی برگ گزنه به مراتب بیشتر از عصاره اتانولی ساقه می‌باشد. البته آنالیز واریانس (ANOVA) ارتباط معنی داری بین این دو عصاره نشان داد ($P< 0.05$).

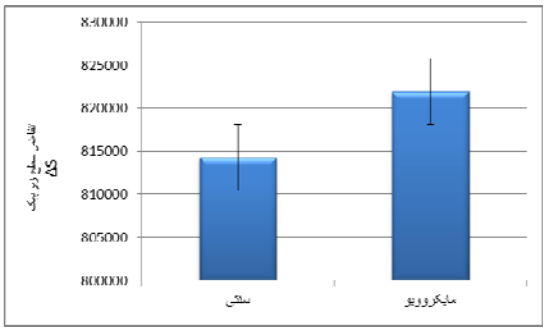
مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ و ساقه در روش مایکروویو: پس از بهینه‌سازی شرایط استخراج عصاره از هر دو اندام گیاه گزنه، کروماتوگرام‌های مربوطه از نظر تفاضل سطح زیر پیک کروماتوگرام مقایسه شدند.نتایج نشان دادکه میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدان برگ بیشتر از ساقه می‌باشد.



شکل۳۱-مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ و ساقه گزنه

گرچه آنالیز واریانس (ANOVA) تفاوت معنی داری میان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام‌های گیاه نشان نداد($P> 0.05$).

مقایسه میزان آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره سنتی با مایکروویو: عصاره گرفته شده توسط دستگاه مایکروویو در شرایط بهینه، با عصاره سنتی مقایسه گردید.نتایج نشان دادکه میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره استخراجی توسط دستگاه مایکروویو بیشتر از عصاره سنتی می‌باشد.



شکل۳۲-مقایسه روش‌های استخراج

با توجه به نتایج بدست آمده، روش مایکروویو نسبت به روش سنتی عصاره‌گیری باعث استخراج بهتر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌شودولی در عین حال آنالیز واریانس اختلاف معنی‌داری بین عصاره‌گیری به روش مایکروویو و سنتی نشان نداد ($p> 0.05$).

بحث

در این مطالعه، پس از بهینه کردن عوامل مؤثر بر فرآیند استخراج توسط امواج مایکروویو، میزان خاصیت آنتی-اکسیدانی عصاره برگ و ساقه استخراج شده توسط روش مایکروویو با یکدیگر و همچنین با عصاره سنتی مقایسه گردید. نتایج نشان می‌دهند که میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره حلال‌های آلی به مراتب بیشتر از محتوای عصاره آبی می‌باشد. برای سیستم‌هایی که از حلال‌های آلی جهت استخراج استفاده می‌کنند، اتانول بسیار قوی‌تر عمل می‌کند. زیرا اتانول تمام انرژی امواج مایکروویو را جذب کرده و تأثیر مستقیمی روی بافت نمونه وارد می‌کند.این افزایش جذب، سبب افزایش دمای حلال و سپس گیاه شده که باعث شکستن دیواره سلول‌ها می‌گردد. در طی این فرایند، اجزاء درون سلول‌ها به سرعت در محیط اطراف استخراج می‌شوند (۱۰). استخراج در توان‌های ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ وات انجام شده و بررسی گردیدند. نتایج نشان دادکه ترکیبات آنتی-اکسیدانی برگ و ساقه در توان ۶۰۰ وات حداکثر می‌باشد. نشان دهنده بیشترین میزان محتوای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در این عصاره است (حلال:اتانول). باافزایش توان دستگاه مایکروویو از ۲۰۰ به ۳۰۰ وات،میزان ترکیبات استخراج شده از برگ گیاه کاهش می‌یابد که می‌تواند ناشی از تخریب برخی ترکیبات مؤثره حساس در این توان و دمای متناسب با آن باشد (۳). اما در توان بالاتر از ۳۰۰ وات با افزایش این ترکیبات مواجه می‌شویم و این امر می‌تواند به دلیل افزایش استخراج ترکیبات فوق در دمای بالای حاصل از امواج مایکروویو باشد (۷). عصاره‌گیری در زمان‌های ۲، ۵، ۱۰، ۱۵و ۲۰ دقیقه انجام گرفت و نتایج نشان دادکه عصاره‌گیری در۱۵ دقیقه بیشترین بازدهی رادارد. با افزایش زمان تا ۱۵ دقیقه، میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانت استخراج شده از گیاه به حداکثر می‌رسد (۷). انتظار می‌رود با گذشت زمان،غلظت ترکیبات استخراج شده افزایش یابد اما چنین اتفاقی نمی‌افتد. این کاهش به علت تخریب ترکیبات فنولیک‌اسیدو گلیکوزیدی بافت گیاه به دلیل افزایش زمان تابش الکترومغناطیسی می‌باشد.احتمالاً زمان کافی برای تابش امواج مایکروویووافزایش درجه حرارت تا دمای جوش حلال در توان مذکور،۱۵ دقیقه می‌باشد. لذا طی این مدت زمان، ترکیبات اصلی گیاه به سرعت آزاد می‌شوند و پس از آن ممکن است به دلیل تخریب ترکیبات مؤثره بافت گیاه توسط حرارت حاصل از امواج مایکروویو،بازده استخراج کاهش یابد (۳). به عبارت دیگرمیزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ در ۱۵ دقیقه بیشترین می‌باشد. نتایج نشان داد که میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره استخراجی در دمای $110^{\circ}C$ بیشتر ازدماهای دیگراست. با افزایش درجه حرارت سرعت آزاد شدن ترکیبات اصلی گیاه افزایش می‌یابد. پس از آن سرعت این

فرایند ثابت مانده تا زمانی که حلال از عصاره اشباع شود.دردمای ۱۰۰°C بعلت تخریب برخی ترکیبات فنولی و گلیلوزیدی، میزان آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش می‌یابد (۱۵ و۳). در نهایت با افزایش دما تا ۱۱۰°C ترکیبات مؤثرهٔ دیگری نیز از گیاه استخراج می‌گرددکه خاصیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد. لذا این دما بعنوان درجه حرارت بهینه برای عمل استخراج استفاده گردید. استخراج به کمک حلال‌های آب، اتانول و متانول انجام شد. نتایج نشان داد که میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره حلال‌های آلی بیشتر از محتوای عصاره آبی می‌باشد و تفاوت سطح زیر پیک در عصاره اتانولی بیشترین میزان بوده که بیانگر بالاترین میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در بین سه عصاره اتانولی، متانولی و آبی در ساقه گزنه است(شکل۱۵).این افزایش جذب امواج،سبب افزایش دمای حلال شده که باعث شکستن دیواره سلول‌ها می‌گردد.در طی این فرایند، مواد مؤثرهٔ بافت ساقه در محیط اطراف استخراج می‌شوند (۱۰). بنابراین، در ادامه بهینه‌سازی فرایند استخراج از اتانول به عنوان حلال استخراجی استفاده گردید. نتایج نشان داد که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره استخراجی در دمای ۱۱۰°C بیشتر از محتوای عصاره در دماهای دیگر است. با افزایش درجه حرارت تا نقطه جوش حلال و عصاره گیاه، سرعت آزاد شدن ترکیبات اصلی گیاه افزایش می‌یابد. پس از آن با افزایش دما تا چند درجه سانتی‌گراد، سرعت این فرایند ثابت مانده تا زمانی که حلال از عصاره اشباع شود. در نهایت با افزایش دما تا ۱۱۰°C ترکیبات مؤثرهٔ دیگری نیز از گیاه استخراج می‌گردد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن افزایش می‌یابد در عین حال، در دمای ۱۱۰°C میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بیشتری وجود دارد. نتایج نشان دادکه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی ساقه گزنه در روش سنتی بیشتر از سایر حلال‌ها می‌باشد. عصاره گرفته شده توسط دستگاه مایکروویو در شرایط بهینه، با عصاره سنتی مقایسه گردید. نتایج نشان دادکه میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره استخراجی توسط دستگاه مایکروویو بیشتر از عصاره سنتی می‌باشد.در عمل استخراج به کمک امواج مایکروویو،از پدیده‌های فیزیکی و شیمیایی استفاده می‌شود و همین امر تفاوت اساسی آن با دیگر روش‌های مرسوم می‌باشد.برهمکنش مستقیم امواج مایکروویوباآب موجود در گیاه سبب افزایش استخراج عصاره می‌گردد.بنابراین در عصاره‌گیری از گزنه(*Urtica dioica*) بهترین نتایج مربوط به عصاره‌گیری توسط دستگاه مایکروویو بود (۷و۴). نتایج این تحقیق تأیید کننده نتایج مدرسی و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۱۱) است که نشان دادند عصاره حاصل از بوتانل و اتیل استات استخراج شده از گزنه بیشترین توانایی مهار رادیکال DPPH با استفاده از روش سوکسله بود. با توجه به نتایج بدست آمده، روش مایکروویو نسبت به روش سنتی عصاره‌گیری باعث استخراج بهتر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌شود ولی در عین حال آنالیز واریانس اختلاف معنی‌داری بین عصاره‌گیری به روش مایکروویو و سنتی نشان نداد ($p> 0.05$).

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

با توجه به نتایج میانگین میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده به روش مایکروویو بیشتر از روش سنتی است. در روش مایکروویو، میزان حلال آلی کمتری استفاده می‌گردد و زمان عصاره‌گیری نیز بشدت کاهش می‌یابد که از مزایای این تکنیک می‌باشد که بهترین شرایط شامل: حلال اتانولی ، توان مایکروویو ۶۰۰ وات، زمان استخراج با توان ۶۰۰ وات برای برگ ۱۵ دقیقه و برای ساقه ۲۰ دقیقه،دمای دستگاه برای برگ و ساقه ۱۱۰درجه سانتیگرادبود. اما با توجه به آنالیز واریانس و معنادار نبودن تفاوت دو روش، می‌توان روش کم هزینه‌تر یعنی سنتی را پیشنهاد داد. در روش سنتی که همان خیساندن می‌باشدزمان استخراج بسیار افزایش یافته و میانگین میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز کاهش می‌یابد که از معایب این روش می‌باشداماحتیاج به تجهیزات ساده‌تری دارد و می تواند از لحاظ اقتصادی مقرون بصرفه‌تر باشد.

در پایان، با توجه به نتایج بدست آمده پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده از روش GC-MS برای مشخص کردن اجزاء عصاره‌های استخراج شده استفاده شده و مقادیر نسبی آنها در دو روش فوق مقایسه گردد.

منابع

1. Ahandani, I.A., Asadisamani, M., Biranvand, M. (2010) The introduction of nettle. Monthly of Barzegar 1042:43.
2. Azizah, A.H., Ruslawati, N.M., Swee Tee, T.(1999) Extraction and characterization of antioxidant from cocoa byproducts. Food Chemistry 64:199-202.
3. Chemat, S., Ait-Amar,H., Lagha, A.,Esveld, D.C.(2005) Microwave assisted extraction kinetics of terpenes from caraway seeds. Chemical Engineering and Processing 44:1320-1326.
4. Craveiro, A.A., Matos, F.J.A., Alencar, J.W.(1989) Microwave extraction of an essential oil. Flavour Fragrance Journal 4:43-44.
5. Haghirossadat, F., Bernard, F., Kalantar, M., Sheikhha, M., Hokmollahi, F., Azimzadeh M. (2010) Bunium Persicum(Black Caraway) of Yazd province: Chemical assessment and Evaluation of its Antioxidant Effects. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences 18(3):284-291.
6. Handley, A.J.(1999) Extraction methods in organic analysis. John Wiley and Sons, Incorporated, 320pp.
7. Hayat, Kh.(2010) Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of *citrus mandarin pomace.* Food Chemistry 123:423-429.
8. Hemwimon, S., Pavasant, P., Shotipruk, A. (2007) Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of Morinda citrifolia. Separation and Purification Technology 54:44-50.
9. Kavtaradze, N., Alaniya, M.D., Aneli, N.J.(2001) Chemical Components of *Urtica dioica*, growing in GEORGIA. Chemistry of Natural Compounds 37:305-308.
10. Keshavarzi, F. (2002) Free radicals and antioxidants. Aeij Press, 67pp.
11. Modarresi Cahardehli, A., Ibrahim, D., Sulayman, S.H.F.(2009) Antioxidant activity and total phenolic content of some medicinal plants in *Urticaceae* family. Journal of applied Biological Sciences 3(2):27-31.
12. Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., Mahdavi, M., Rahimi, F. (2007) Antimicrobial effects of methanolic extracts of some species of Stachys and Phlomis. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 17(57):57-66.
13. Nickavar, B., Alinaghi, A., Kamalinejad, M.(2008) Evaluation of the antioxidant properties of five Mentha species. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 7(3): 203-209.
14. Pan., Y., He, Ch., Hengshan, W., Xiaowen, J., Kai, W., Peizhen, Liu. (2010). Antioxidant activity of microwave-assisted extract of *Buddleia officinalis* and its major active component. Food Chemistry 121:497-502.
15. Visioli, F., Romani, A., Mulinacci, N., Zarini, S., Conte, D., Vincieri, F. F., Galli, C. (1999) Antioxidant and other biological activities of olive mill wastewaters. Journal of Agriculture Food Chemistry 47:3397-3401.
16. Wang, L., Weller, C.L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science and Technology 17:300-312.
17. Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., Terao, J.(1998) HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of Foods by using 1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl. Bioscience Biotechnology Biochemistry 62(6):1201-1204.
18. Zargari, A. (2000) Medicinal Plants. University of Tehran Press, 340pp.

Comparison of microwave assisted and traditional extraction of *Urtica dioica* L. and evaluation of its antioxidant activity by HPLC- DPPH assay

Motalleb Gh.R.[1], Lohrasbi Dashtaki M.R.[2] and Nejati Yazdi Nejad M.[2]

[1] **Biology Dep., Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran**

[2] **Chemistry Dep., Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran**

Abstract

In the present study, the effects of two types of extraction methods: traditional and microwave-assisted extraction (MAE) on antioxidant activity of *Urtica dioica L*. was investigated. Water, methanol and ethanol extracts of leaf and stem of *Urtica dioica* L. were obtained from both traditional and MAE methods and evaluated for their radical scavenging capacity (RSC) by high performance liquid chromatography (HPLC)-separated antioxidants with the 2,2‘-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals (DPPH$^{\bullet}$). The antioxidant activities of all the extracts were determined by high performance liquid chromatography at 517nm using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH). It was determined that antioxidant activity of leaf and stem (ethanol extracts) of *Urtica dioica* L. by MAE method was higher compared to traditional method, however, was not significantly different ($p>0.05$). In conclusion, HPLC and DPPH assay did not show significant difference between MAE and traditional methods in antioxidant activity of leaf and stem of *Urtica dioica* L.

Key words: Antioxidant activity, MAE, HPLC-DPPH, *Urtica dioica L*.