بررسی فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و بهینه‌سازی روش‌های مختلف عصاره‌گیری به‌منظور تعیین بهترین روش استخراج کورکومین از عصاره‌های اتانولی گیاه *Curcuma longa* L.

سمانه نوری[۱]، علیرضا کیاست[۲]، مریم کلاهی*[۳]، رویا میرزاجانی[٤]، سیدمنصور سیدنژاد[٥]

[۱،۲،٤]گروه شیمی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز ایران

[۳،٥]گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۰۷ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۵/۰۸/۲٦

چکیده

زردچوبه با نام علمی *Curcuma longa* L. به سبب ویژگی‌های منحصر به فرد غذایی و دارویی در سراسر جهان از ارزش زیادی برخوردار است. در این پژوهش عصاره اتانولی ریزوم گیاه با استفاده از سه روش ماسراسیون، اولتراسونیک و سوکسله استخراج گردید، میزان کورکومین و کورکومینوییدها به‌ترتیب با استفاده از روش‌های دستگاه HPLC و همچنین به منظور شناسایی کورکومینوییدها از کروماتوگرافی لایه نازکTLC استفاده گردید . محتوای فنلی عصاره‌ها با استفاده از معرف فولین سیوکالتو سنجیده شد و به‌منظور بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها از روش DPPH استفاده گردید. بیشترین راندمان وزنی عصاره مربوط به عصاره مستخرج از روش سوکسله بود. بیشترین محتوای فنل و مقدار کورکومین جداسازی شده از ریزوم زردچوبه از عصاره حاصل از روش ماسراسیون به‌دست آمد. ولی حضور کورکومینوییدها در هر سه نوع روش عصاره‌گیری تایید شد. بیشترین خواص آنتی‌اکسیدانی مربوط به در عصاره‌های ماسراسیون و اولتراسونیک بود. لذا نتایج بدست آمده بیانگر توجه به اهمیت تعیین روش‌های عصاره‌گیری به منظور جداسازی کورکومین و سایر ترکیب‌های فعال زیستی پرکاربرد و مهم در درمان بسیاری بیماری‌ها و سنتز داروهای نوین می‌باشد و از لحاظ بیشترین مقدار کورکومینویید، خواص آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی، عصاره ماسراسیون در اولویت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان طبیعی ، زرد چوبه، عصاره‌گیری، فنل کل، کورکومین.

*نویسنده مسئول: m.kolahi@scu.ac.ir

مقدمه

مطابق گزارش سازمان جهانی بهداشت، گیاهان دارویی می‌توانند بهترین منبع برای بدست آوردن انواع مختلفی از داروها باشند (Aggarwal et al., 2007). در حال حاضر، هزاران متابولیت گیاهی به‌طور موفقیت آمیزی برای درمان بیماری‌های مختلفی استفاده می‌شوند. استفاده از گیاهان دارویی در بسیاری از کشورها در حال افزایش است به گونه‌ای که ۳۵ درصد داروها در برگیرنده ترکیبات طبیعی هستند (Eisenberg et al., 1993; Akerele, 1993).

زردچوبه[1] با نام علمی *Curcuma longa* L. و متعلق به تیره زنجبیل[2] می‌باشد. قسمت مورد استفاده این گیاه ریزوم‌های آن است. زردچوبه بیش از ۲۵۰۰ سال است که در هند، به‌عنوان رنگ مورد استفاده قرار می‌گیرد و با گذشت قرن‌ها، خاصیت دارویی این ادویه نیز آشکار شد. رنگ زرد که مشخصه ریزوم زردچوبه است به حضور ۳ تا ۵ درصدی کورکومینوییدها مربوط می‌گردد که شامل کورکومین، د-متوکسی کورکومین و بیس د-متوکسی کورکومین می‌باشد که کورکومین فعالترین جزء زیستی این گیاه می‌باشد (Wakte et al., 2011) که در سال ۱۹۱۰ و ۱۹۱۳ میلادی توسط Lampe به صورت شیمیایی سنتز و مورد تایید قرار گرفت (Lampe et al., 1913). کورکومین با فرمول مولکولی $C_{21}H_{20}O_6$، نقطه ذوبی برابر ۱۸۳ درجه سانتی‌گراد و وزن مولکولی برابر ۳۶۸/۳۷ g/mol دارا می‌باشد (Shen and Ji, 2007). این ماده در pH= 2.5-7 به رنگ زرد و در pH ≥ ۷ به رنگ قرمز در می‌آید (Ansari et al., 2005).

با وجود کاربردهای غذایی و درمانی کورکومین برای چندین سال در کشورهای مختلف، خصوصیات بیولوژیک کورکومین تا اواسط قرن ۲۰ به‌طور علمی مشخص نشد تا این که برای اولین بار در سال ۱۹۴۹ در مقاله منتشر شده‌ای در Nature گزارش شد که کورکومین یک جزء فعال بیولوژیک است که خواص ضد باکتریایی دارد (Singh, 2007). بررسی‌ها نشان می‌دهد که علاوه بر کورکومین ترکیبات شیمیایی متعدد از جمله روغن فرار، زینجیبرن، آلفا و بتا تورمرین و مواد دیگر از جمله آرابینوز، فروکتوز، گلوکز و نشاسته در ریزوم گیاه زرد چوبه وجود دارد (Yang et al., 2009).

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شامل ٤ دسته پلی‌فنول‌های فلاونوئیدی، پلی فنول‌های غیر فلاونوئیدی، اسیدهای فنولی یا دی ترپن‌های فنولی و ترکیبات آلی گوگرد دار هستند که کورکومین در دسته پلی فنول‌های غیر فلاونوئیدی جای می‌گیرد (Kelsey et al., 2010). این ماده که از ریزوم زردچوبه حاصل می‌شود، خاصیت ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهد (Ganguli et al., 2000).

در سال‌های اخیر، مطالعات متعددی در زمینه اثرات بیولوژیک کورکومین صورت گرفته است. طی چند سال اخیر بیش از ۳۰۰۰ مطالعه نشان داده است که کورکومین اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی، ضدالتهابی و پروآپوپتوزی است و ظرفیت درمانی بالایی علیه بیماری‌های مختلف به‌ویژه سرطان دارد (Aggarwal and Harikumar, 2009; Aggarwal et al., 2003; Singh, 2007; Shishodia et al., 2005) در ایران نیز تحقیقات مختلفی روی اثرات بیولوژیکی زردچوبه انجام شده است (Bahrami et al., 2013).

جهت استخراج مواد موثره گیاهان دارویی، روش‌های متفاوتی وجود دارد که می‌توان به عصاره‌گیری به روش‌های سوکسله، اولتراسونیک و ماسراسیون اشاره نمود که هر کدام از این روش‌ها مزایا و معایب خاص خود را داراست. از مهم ترین

1. Turmeric
2. Zingiberaceae

مزایای عصاره گیری به روش سوکسله می‌توان به ساده و آسان بودن روش، در تماس بودن مداوم حلال تازه با پودر گیاهی، عدم فیلتراسیون و استفاده از دمای بالا که منجر به افزایش حلالیت ترکیبات کم محلول در دمای پایین می‌شود، اشاره کرد. اما علیرغم مزایای اشاره شده، این روش دارای معایبی می‌باشد که از جمله آن می‌توان به زمان بر بودن فرایند و آسیب رساندن به ترکیبات حساس به حرارت اشاره کرد (De Castro and Garcıa-Ayuso, 1998). از مزایای روش ماسراسیون نیز می‌توان به ساده و آسان بودن روش و امکان استخراج ترکیبات حساس نسبت به دما اشاره نمود. همچنین نیاز به فیلتراسیون و زمان بر بودن روش، از معایب این روش قلمداد می‌شوند (Handa et al., 2008). در روش اولتراسونیک، دمای کمتری برای عصاره‌گیری لازم است در نتیجه به ترکیبات حساس به حرارت، کمتر آسیب می رسد. از معایب روش حاضر می‌توان نیاز به فیلتراسیون و انتخاب‌گری پایین روش را برشمرد. اگرچه می‌توان با به کار بردن حلال‌های اختصاصی تا حدودی روش را انتخابی کرد اما به هر حال چون در این روش سلول گیاهی پاره شده و کلیه محتویات سلولی در تماس با حلال قرار می‌گیرند، این روش به طورکلی غیر انتخابی تلقی می‌شود (Luque-Garcia and De Castro, 2003).

به منظور مقایسه سه روش عصاره گیری سوکسله، اولتراسونیک و ماسراسیون و همچنین انتخاب بهترین روش جهت استخراج کورکومین، عملیات آزمایشگاهی متفاوتی بر روی گیاه زردچوبه صورت گرفت. هدف از این پژوهش انتخاب بهترین روش از لحاظ بیشترین راندمان وزنی بود، سپس مقدار کورکومین حاصله از طریق HPLC و در نهایت محتوای فنلی عصاره‌ها سنجیده و به‌منظور بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها از روش DPPH استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه: پس از تهیه ریزوم زردچوبه از بازار اهواز و شناسایی آن توسط بخش گیاه‌شناسی گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز، نمونه با استفاده از آسیاب پودر گردید.

عصاره گیری به روش ماسراسیون: در ابتدا ۱۰ گرم از پودر زرد چوبه وزن گردید. سپس ۱۲۰ سی سی اتانول ۹۶ درصد به‌عنوان حلال به آن افزوده شد. پودر گیاه به مدت ٤٨ ساعت در تماس با حلال بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت (Zetterström, 2012).

عصاره گیری به روش اولتراسونیک: در ابتدا ۱۰ گرم از پودر زرد چوبه وزن گردید. سپس ۱۲۰ سی سی اتانول ۹٦ درصد به‌عنوان حلال به آن افزوده شد. و در معرض امواج صوتی با فرکانس ٤٠khz قرار گرفت. به‌منظور تعیین زمان بهتر برای عصاره گیری، این روش در زمان‌های ٦، ۱۲ و ۱۸ دقیقه انجام شد (Rouhani et al., 2009; Wakte et al., 2011).

عصاره‌گیری به روش سوکسله: در ابتدا ۱۰ گرم از پودر زرد چوبه وزن گردید و درون انگشتانه قرار داده شد. سپس ۱۲۰ سی‌سی اتانول ۹٦ درصد درون بالن ریخته وسپس بالن درون حمام روغن و تحت شرایط رفلاکس قرار داده شد و عمل عصاره‌گیری به مدت ٤ ساعت ادامه یافت (Popuri and Pagala, 2013).

تعیین خلوص کورکومین با استفاده از HPLC[1]: بدین‌منظور نمونه‌های با غلظت ۵ ppm از نمونه استاندارد کورکومین (Acros، هند) و عصاره‌های بدست آمده در حلال اتانول (Merck، آمریکا) با درجه HPLC ساخته و به دستگاه تزریق شد. از دستگاه Knauer HPLC (Berlin, Germany) حاوی پمپ K-1001 و آشکار ساز UV k-۲۵۰۱ استفاده گردید. ستون دستگاه از نوع ٤/٦mm × ۲۵۰mm , C۱۸ و دمای ستون

1.High Performance Liquid Chromatography

دمای اتاق ۲۵ ^{o}C تنظیم شد. فاز متحرک A (THF) با نسبت ۵ درصد و فاز متحرک B (آب حاوی سیتریک اسید ۱ v/v درصد بافری شده در pH=۳ با KOH) با نسبت ۹۵ درصد انتخاب شد. سرعت جریان آن ۱ ml/min، طول موج آشکار ساز ۳۸۰nm و حجم تزریقی ۱۰µl انتخاب شد. از pH متر (pH lab, ۸۲۷Metrohms, Herisau, Switzerland) برای تنظیم pH آب استفاده گردید(Wakte et al., 2011).

جداسازی کورکومینوییدها با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک TLC[1]: نمونه استاندارد و عصاره اتانولی از سه عصاره مختلف برای تایید حضور کورکومینوییدهای مختلف بر روی صفحه TLC مورد بررسی قرار گرفت. نمونه استاندارد و عصاره بدست آمده در کلروفرم حل گردید و بر روی صفحه TLC لکه گذاری صورت گرفت. ترکیب کلروفرم:متانول با نسبت۱:۱۹ به‌عنوان فاز متحرک انتخاب شد (Kulkarni et al., 2012).

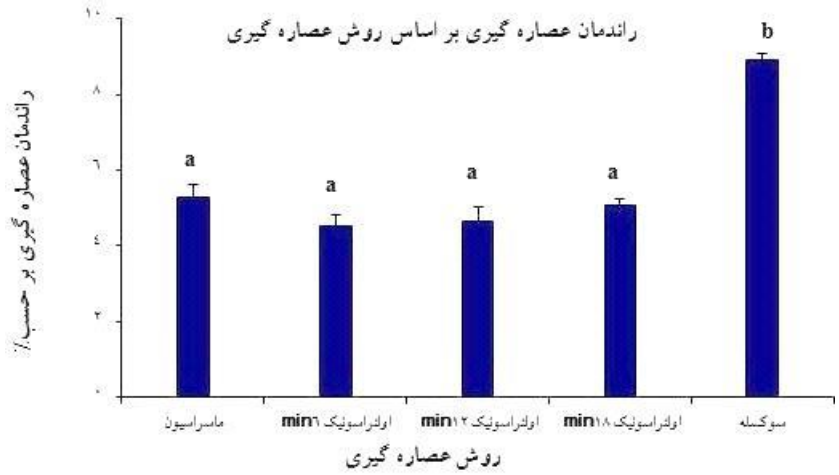
اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی: برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی از روش Hossain و همکاران (Hossain et al., 2013)، استفاده گردید. به کمک منحنی استاندارد گالیک اسید، محتوای فنلی عصاره‌ها بر حسب میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد.

بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی با استفاده از محلول DPPH[2]: فعالیت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌ها با استفاده از روش Norhaiza و همکاران (Norhaiza et al., 2009) با اصلاحاتی انجام شد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد به‌صورت IC_{50} بر حسب میلی گرم بر لیتر بیان گردید.

آنالیز آماری داده‌ها: آزمون نرمال داده‌های به دست آمده با نرم افزار SPSS انجام گردید، مقایسهٔ میانگین داده‌ها با روش دانکن انجام شد. نمودارهای مقایسه میانگین با نرم‌افزار (۲۰۱۰) Excel رسم شدند.

نتایج

راندمان عصاره گیری: بررسی مقدار عصاره‌های بدست آمده از روش‌های مختلف عصاره گیری، نشان داد که روش ماسراسیون و اولتراسونیک در زمان‌های ٦، ۱۲ و ۱۸ دقیقه با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند. این در حالی است که راندمان عصاره‌گیری به روش سوکسله اختلاف معنی‌داری با روش‌های دیگر عصاره‌گیری داشت (p <۰/۰۵) (شکل ۱).

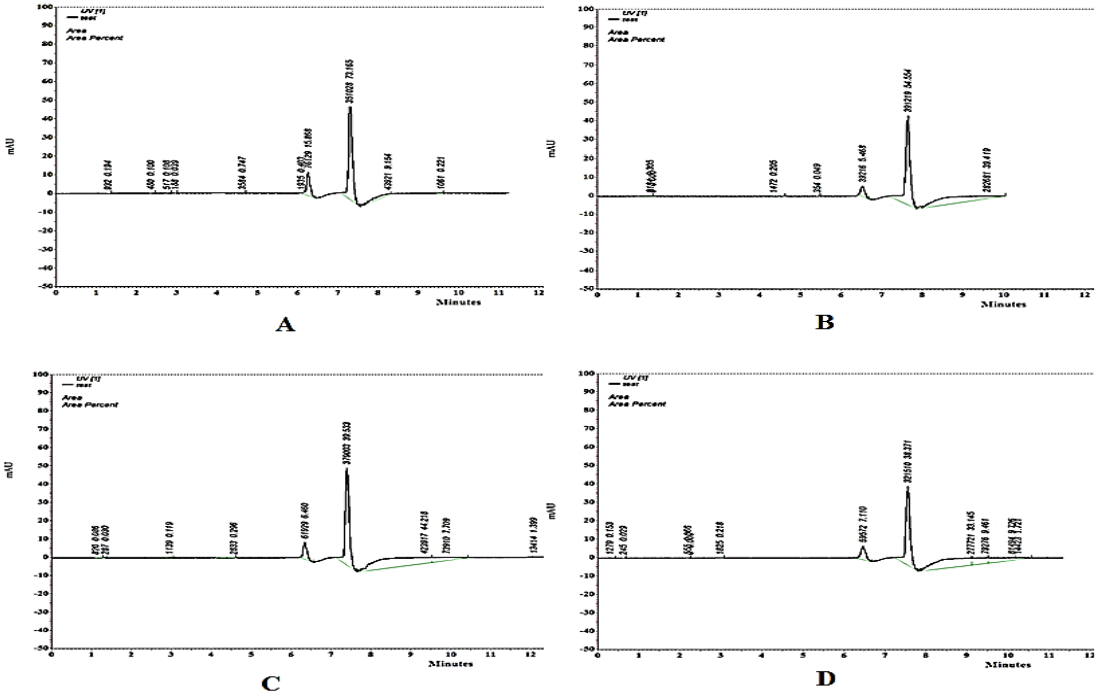


شکل ۱: راندمان عصاره‌گیری. مقادیر ذکر شده میانگین دوبار تکرار ± خطای استاندارد می‌باشد. حروف مشابه در بالای ستون‌ها معرف عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های راندمان از روش‌های مختلف عصاره‌گیری می‌باشد.

1.Thin Layer Chromatography

2. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

تعیین خلوص کورکومین با استفاده از HPLC: نتایج آنالیز HPLC برای نمونه استاندارد کورکومین نشان داد که پیک حاصله در زمان بازداری ۷/۵ دقیقه نشان دهنده کورکومین در نمونه استاندارد می‌باشد (شکل A-۲). مقدار کورکومین در روش ماسراسیون، با اختلاف معنی‌داری نسبت به روش‌های سوکسله و اولتراسونیک بیشتر بود (p <۰/۰۵) (شکل ٤).

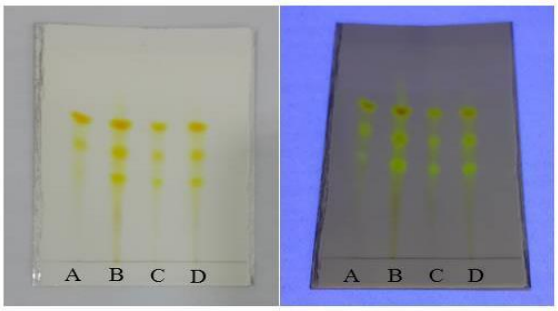


شکل ۲: **آنالیز کورکومین با روش HPLC. A. نمونه استاندارد کورکومین. B. عصار گیری به روش ماسراسیون. C. عصاره گیری به روش اولتراسونیک. D. عصاره گیری به روش سوکسله**

شناسایی کورکومینوییدها با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک TLC: یافته‌های حاصل از کروماتوگرافی لایه نازک با توجه به ماهیت محتویات عصاره زردچوبه در مقایسه با استاندارد مشخص کرد که R_f نمونه استاندارد و عصاره‌ها با یکدیگر همخوانی داشت (شکل ۳). R_f برای هر سه عصاره ماسراسیون، اولتراسونیک و سوکسله برای جزء کورکومین، دمتوکسی کورکومین و بیس دمتوکسی کورکومین به ترتیب برابر ۰/٦٤، ۰/۵۱و ۰/٤۱ گزارش شد. R_f برای هر سه عصاره مستخرج از ماسراسیون، اولتراسونیک و سوکسله برای جزء کورکومین، د-متوکسی کورکومین و بیس د-متوکسی کورکومین به‌ترتیب برابر ۰/٦٤، ۰/۵۱و ۰/٤۱ گزارش شد.

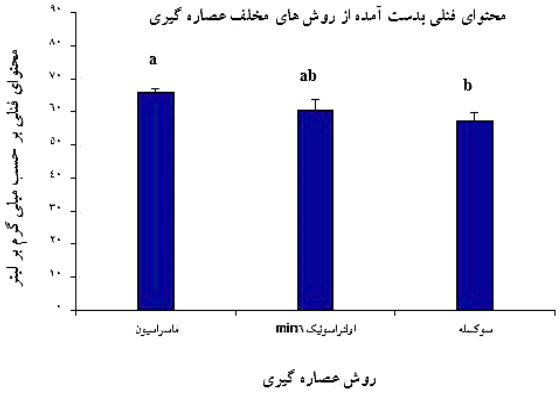
اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنلی: یافته‌های حاصل از بررسی محتوای پلی‌فنلی نشان داد که بیشترین مقدار ترکیبات فنلی، از روش ماسراسیون بدست آمد. همچنین محتوای فنلی بدست‌آمده از روش ماسراسیون با اختلاف معنی‌داری نسبت به روش سوکسله بیشتر می‌باشد. (p <۰/۰۵) (شکل ٦).

بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی: بررسی IC_{50} بدست آمده از نمونه استاندارد و عصاره‌ها نشان داد که نمونه استاندارد کورکومین با اختلاف معنی‌داری نسبت به عصاره‌ها کمترین IC_{50} را به خود اختصاص داد. این در حالی است که عصاره‌های بدست آمده از روش ماسراسیون و اولتراسونیک با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند. (p<۰/۰۵) (شکل۵).

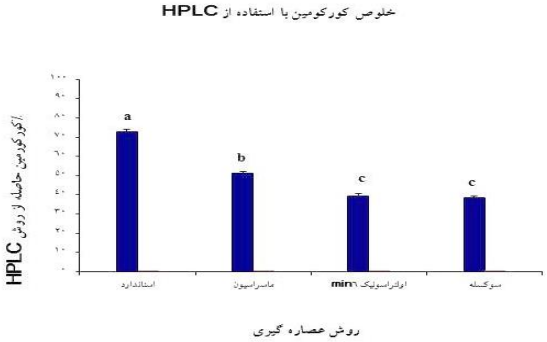


ب الف

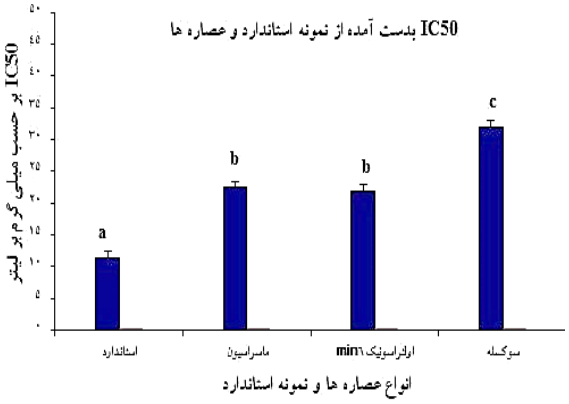
شکل ۳: تجزیه و تحلیل کیفی محتوای کورکومینویدی عصاره زرد چوبه با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک. الف) در حضور نور UV ب) در عدم حضور نور UV. A. نمونه استانداردB . عصاره ماسراسیون C. عصاره اولتراسونیک D. عصاره سوکسله.



شکل ۵: محتوای فنلی بدست آمده از عصاره‌های مختلف. مقادیر ذکر شده میانگین دوبار تکرار ± خطای استاندارد می‌باشد. حروف مشابه در بالای ستون‌ها معرف عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های محتوای فنلی هر نمونه در روش‌های مختلف عصاره گیری می‌باشد.



شکل ٤: درصد خلوص کورکومین تعیین شده از روش HPLC . مقادیر ذکر شده میانگین دوبار تکرار±خطای استاندارد می‌باشد. حروف مشابه در بالای ستون ها معرف عدم تفاوت معنی دار بین میانگین‌های مقادیر کورکومین هر نمونه در روش های مختلف عصاره گیری می باشد.



شکل ٦: غلظت موثر برای ایجاد ۵۰ درصد بازدارندگی (IC50) از فعالیت رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره‌های مختلف زردچوبه. مقادیر ذکر شده میانگین دوبار تکرار ± خطای استاندارد می‌باشد. حروف مشابه در بالای ستون‌ها معرف عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر نمونه در روش‌های مختلف عصاره‌گیری می‌باشد.

بحث

در این پژوهش سعی بر آن بوده است که راندمان عصاره‌گیری از سه روش ماسراسیون، اولتراسونیک و سوکسله مورد بررسی قرار گیرد و سپس مقادیر کورکومین حاصله از این سه روش از طریق HPLC تعیین گردد. طبق بررسی‌های صورت گرفته، روش سوکسله بیشترین راندمان به میزان ۸/۹۲ درصد عصاره را نشان داد. علت این پدیده را بدین صورت می‌توان بیان کرد که احتمالا عصاره جداسازی شده به روش سوکسله به دلیل استفاده از حلال داغ علاوه بر مواد موثره مورد نظر، ترکیبات دیگری چون پروتئین و کربوهیدرات‌ها را نیز خارج کرده است. طبق بررسی براگا و همکارانش (Braga et al., 2003) عصاره سوکسله نیز بیشترین راندامان را به خود اختصاص داد که این عصاره ترکیب متفاوتی با عصاره‌های حاصله از روش‌های استخراج حلال در فشار کم،

سیال فوق بحرانی و تقطیر با بخار آب داشت. نتایج راندمان عصاره‌گیری به روش اولتراسونیک در زمان‌های مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. این مسأله به‌دلیل تخریب دیواره سلولی و قابلیت خروج و در دسترس بودن بیشتر ترکیبات تحت امواج صوتی می‌باشد؛ در مقابل زمان‌های کمتر، افزایش معنی‌داری در روند استخراج در مقایسه با استخراج معمولی نداشت و لذا مستلزم به کارگیری شدت‌های صوتی بالاتر بود. راندمان استخراج با گذشت زمان افزایش می‌یابد تا تعادل بین اجزای مورد نظر در سلول‌های گیاه و حلال برقرار گردد. اما زمانی که تعادل برقرار می‌شود دیگر افزایش زمان جداسازی بیشتری را موجب نمی‌شود (Song et al., Rouhani et al., 2009 ;2015).از آن‌جا که ترکیبات فعال زیستی موجود در مواد گیاهی از مخلوط چندین جزء تشکیل شده است، جداسازی و تعیین آن‌ها مشکل‌ساز می‌باشد. عملاً بسیاری از آن‌ها را با ترکیب چندین تکنیک کروماتوگرافی و روش‌های مختلف خالص‌سازی برای جداسازی ترکیبات فعال زیستی، می‌توان خالص سازی نمود (Huie, 2002). استفاده از روش HPLC برای دست‌یابی به مقادیر دقیق کورکومین استخراج شده و مقایسه روش‌های مختلف ضروری بود. کروماتوگرام به‌دست آمده از HPLC پیک شارپی را در زمان بازداری ۷/۵ دقیقه در نمونه استاندارد نشان داد که این پیک در کروماتوگرام HPLC سه روش عصاره‌گیری نیز مشاهده شد که بیانگر وجود کورکومین می‌باشد. بررسی نتایج حاصله از HPLC حاکی از آن است که روش ماسراسیون، حاوی بیشترین مقدار کورکومینویید (۵۱/۳۳ درصد) می‌باشد. طبق بررسی صورت گرفته توسط واکتی و همکارانش (wakte et al., 2011)، مقدار کورکومین استخراجی از عصاره اتانولی زردچوبه در زمان‌های ۱ تا ۵ دقیقه به‌ترتیب برابر ٦/٥٧ تا ۳۲/۸۵ درصد بوده و بعد از آن افزایش بیشتری در مقدار کورکومین حاصله دیده نشد که این مقدار با مقدار بدست آمده از این گزارش هم‌خوانی دارد. در پژوهش انجام شده توسط پریت–المیداو همکاران (Péret-Almeida et al., 2005) و ریواتی و همکاران (Revathy et al., 2011)، برروی کورکومین استخراجی از زردچوبه با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک، مشتقات آن ترکیب به این ترتیب جداسازی شدند: کورکومین، د–متوکسی کورکومین و بیس د–متوکسی کورکومین که کورکومین بیشترین R_f و بیس د–متوکسی کورکومین کمترین R_f را به خود اختصاص داده این پدیده می‌تواند به علت قطبیت کمتر ساختار کورکومین باشد که این نتایج با یافته‌های حاصل از این گزارش هم خوانی دارد. بررسی‌هایی که جهت تعیین مقدار پلی‌فنل‌های موجود در زردچوبه انجام شده متعدد بوده و نتایج آن نیز بسیار متفاوت است (Kaur and Kapoor, 2002؛ Surojanametakul et al., 2010؛ Krishnaraj et al., 2012؛ Nampoothiri et al., 2012). بررسی مقدار محتوای فنلی بدست آمده با معرف فولین نشان داد که بیشترین مقدار ترکیبات فنلی در عصاره حاصله از روش ماسراسیون و کمترین مقدار آن مربوط به روش سوکسله می‌باشد. کائور وکاپور (Kaur and Kapoor, 2002) گزارش کردند هر ۱۰۰ گرم پودر خام زردچوبه حاوی ۱۷۵ میلی‌گرم ترکیبات فنلی است. تجزیه و تحلیل مناسب ترکیبات پلی‌فنلی به عوامل متعددی از جمله طبیعت شیمیایی آن‌ها، اندازه نمونه مورد بررسی، زمان و شرایط نگهداری، نحوه استخراج و کیفیت روش آن، انتخاب استاندارد و حضور مواد مداخله کننده بستگی دارد (Shahidi and Nackz, 2003).

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی، نشان داد IC_{50} برای عصاره ماسراسیون و اولتراسونیک تقریبا یکسان می‌باشد. اما این مقدار برای عصاره سوکسله به‌طور

معنی‌داری افزایش پیدا کرده است (IC_{50}=۳۲/۰۶) که قابل مقایسه با مقدار عدد ۲٤ گزارش شده برای این پارامتر در نتایج ناهک و ساهو (Nahak and Sahu, 2011) می‌باشد. علت آن می‌تواند مدت زمان بیشتر تماس گیاه با حلال و دمای اعمال شده به عصاره به منظور تبخیر حلال باشد (Anonymous, 1966). مقایسه نتایج میزان آنتی‌اکسیدان و مقادیر فنل کل در روش‌های عصاره‌گیری مورد مطالعه نشان می‌دهد در روش ماسراسیون به‌دلیل جداسازی مقادیر بیشتر ترکیبات فنلی و نقش آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات میزان IC_{50} کمتر آن دور از انتظار نمی‌باشد. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که نمونه استاندارد به‌دلیل خلوص بیشتر از IC_{50} کمتری برخوردار است و از بین عصاره‌های مورد مطالعه، اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره اولتراسونیک و ماسراسیون با توجه به IC_{50} کمتر آن‌ها، از عملکرد بهتر آنتی‌اکسیدانی برخوردارند. امروزه روش استخراج با امواج اولتراسونیک، با توجه به بازده بالاتر، انرژی و مصرف آب کمتر، تبدیل به یک روش جایگزین مناسب نسبت به روش‌های استخراج معمولی شده است و یک روش تایید شده در روند استخراج مواد موثره ترکیبات گیاهی به خصوص ترکیباتی با وزن مولکولی کمتر می‌باشد (Rodrigues and Pinto, 2007). اثر افزایش امواج فراصوت درسرعت استخراج مواد گیاهی که به شکستن دیواره سلول‌ها و آزاد سازی اجزای آن‌ها در محیط استخراج مربوط می‌شود (Lingyun et al., 2007). تحقیق در مورد استفاده از روش اولتراسونیک در استخراج اسانس نشان‌دهنده افزایش بهره‌وری و کیفیت بهتر آن نسبت به روش‌های متداول می‌باشد. امواج اولتراسونیک برای کاربردهای صنعتی در استخراج دارویی برای طیف گسترده‌ای از استخراج‌های گیاهی شناخته شده است (Ji et al., 2006). طبق بررسی ویدوواتی و همکارانش (Widowati et al., 2013)، نمونه کورکومین، اثر آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به عصاره‌های زردچوبه را داراست که در این گزارش نیز همین امر مشاهده گردید. این یافته‌ها نشان می‌دهد که رفتار متغیرهای مختلف بر روی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان با خواص مختلف تاثیر می‌گذارد. روش استخراج عصاره از گیاه می‌تواند بازده استخراج، درصد و نوع ترکیبات شیمیایی، و فعالیت‌های بیولوژیکی در آن‌ها را تغییر دهد (Wang et al., 2010). در تایید این قضیه می‌توان به اثر امواج اولتراسونیک بر بافت گیاهی که با استفاده از میکروسکوپ SEM گرفته شده‌است، اشاره نمود (Riera et al., 2004). نتایج این پژوهش نشان داد که بیشترین راندمان عصاره‌گیری مربوط به روش سوکسله می‌باشد. در بررسی سانگ و همکارانش (Song et al., 2007)، اتانول به واسطه خواص فیزیکی منحصر به فرد خودش از جمله قطبیت بالا، فشار بخار مناسب و ویسکوزیته کم، تمایل زیادی به استخراج کورکومین دارد. طی استخراج با امواج اولتراسونیک، فروپاشی سلول‌های گیاهی مقدار زیادی از انرژی در مکان‌های متعدد در حلال را منتشر می‌کند که موجب افزایش سطح تماس حلال با مولکول‌های حل شونده (کورکومین) می‌شود. عملکرد در دمای پایین‌تر، کاهش زمان استخراج و همچنین مصرف آب و انرژی کمتر مزیت‌های عمده روش اولتراسونیک در مقابل روش‌های مرسوم می‌باشد (Vinatoru, 2001). سنجش راندمان عصاره‌گیری، تعیین خلوص کورکومین با روش HPLC، بررسی میزان فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش‌های مختلف عصاره‌گیری نشان داد که روش‌های مختلف منجر به جداسازی مقادیر متفاوت از کورکومین، تفاوت در میزان ترکیبات فنلی و تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه زردچوبه می‌شود. ترکیبات فنلی مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند

و مقادیر فنل کل رابطه مستقیم با فعالیت آنتی اکسیدانی دارد. نتایج نشان می‌دهد که به کارگیری عصاره ماسراسیون به‌دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا و همچنین اکتساب بیشترین مقدار کورکومین می‌تواند به‌عنوان یک روش مناسب و ارزان در استفاده از کورکومین به‌عنوان دارو، همراه با داروهای شیمیایی و همچنین در رژیم‌های غذایی برای کاهش استرس اکسیداتیو سلول‌ها مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری نهایی

بررسی‌ها نشان داد که عصاره مستخرج از روش سوکسله تنها از لحاظ راندمان عصاره‌گیری، نسبت به روش‌های دیگر بیشترین راندمان وزنی را نشان داد و این در حالی است که از لحاظ بیشترین مقدار کورکومینویید، خواص آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی عصاره ماسراسیون در اولویت می‌باشد. همچنین روش اولتراسونیک با توجه به مزایای آن از جمله کاهش مصرف حلال آلی و تخریب نمونه، بهبود در بازده استخراج، انتخاب‌پذیری، سرعت استخراج و همچنین سهولت خودکار بودن این تکنیک‌ها برای استخراج ترکیبات گیاهی می‌تواند به‌عنوان روش مناسب برای استخراج کورکومین از زردچوبه در زمان ٦ دقیقه مورد توجه قرار گیرد. نتایج بدست آمده بیانگر توجه به اهمیت تعیین روش عصاره‌گیری به‌منظور جداسازی کورکومین به عنوان یک ترکیب فعال زیستی پرکاربرد و مهم در درمان بسیاری بیماری‌ها و سنتز داروهای نوین می‌باشد، لذا توصیه می‌گردد که روش ماسراسیون به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا، سادگی روش و همچنین اکتساب بیشترین مقدار کورکومین که هدف اصلی این پژوهش بوده است، به‌عنوان یک روش مناسب و ارزان در استفاده از کورکومین به‌عنوان دارو، همراه با داروهای شیمیایی و همچنین در رژیم‌های غذایی برای کاهش تنش اکسیداتیو سلول‌ها مورد توجه قرار گیرد.

قدردانی : نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ تامین هزینه‌های این پژوهش (پژوهانه‌های شماره۳۱۵۷۹ /۹٤/۳/۰۲ و شماره۳۱۵۸۰ /۹٤/۳/۲) در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد تشکر و قدردانی می‌نمایند

References

1. Aggarwal, B.B. and Harikumar, K.B. 2009. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 41(1): 40-59.
2. Aggarwal, B.B., Kumar, A. and Bharti, A.C. 2003. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. Anticancer Research, 23(1A): 363-398.
3. Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Malani, N. and Ichikawa, H. 2007. Curcumin: the Indian solid gold. The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease. Springer US, pp: 1-75.
4. Akerele, O. 1993. Natures medicinal bounty: Dont throw it away. World Health Forum, 14(4): 390-395.
5. Anonymous. 1966. The Indian Pharmacopoeia. Movement of India publication, New Delhi, 947-950.
6. Ansari, M. J., Ahmad, S., Kohli, K., Ali, J. and Khar, R. K. 2005. Stability-indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 39(1): 132-138.
7. Bahrami, M., Afshari, Z., Ahmadi, F., Mohiti, M., Jalali-Khanabadi, B. and Moradi, A. 2013. Evaluation of phenolic content of turmeric hydroalcoholic extract in iran by singleton method. Journal of Shahid Sadoughi University

Comparison of yield, composition, and antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts obtained using various techniques. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(22): 6604-6611.

9. De Castro, M. L. and Garcıa-Ayuso, L. E. 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. Analytica chimica acta, 369(1): 1-10.
10. Eisenberg, D.M., Kessler, R.C. and Foster, C. 1993.Unconventional medicine in the United States: prevalence, costs and patterns of use. The New England journal of medicine (NCBI), 328: 246-252.
11. Ganguli, M., Chandra, V., Kamboh, M. I., Johnston, J. M., Dodge, H. H., Thelma, B. K., Juyal, R.C., Pandav, R., Belle, S.H. and DeKosky, S. T. 2000. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer disease: the Indo-US cross-national dementia study. Archives of Neurology, 57(6): 824-830.
12. Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G. and Rakesh, D.D. 2008. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. United Nations Industrial Development Organization, Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies, Italy, 266 p.
13. Hossain, M.A., AL-Raqmi, K.A., AL-Mijizy, Z.H., Weli, A.M. and Al-Riyami, Q. 2013. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 3(9): 705-710.
14. Huie, C.W. 2002. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 373(1-2): 23-30.
15. Ji, J.B., Lu, X.H., Cai, M.Q. and Xu, Z.C. 2006. Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound. Ultrasonics Sonochemistry, 13(5): 455-462.
16. Kaur, C. and Kapoor, H.C. 2002. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. of medical sciences and health services, 21(3): 281-290.
8. Braga, M.E., Leal, P.F., Carvalho, J.E. and Meireles, M.A.A. 2003. International Journal of Food Science and Technology, 37(2): 153-161.
17. Kelsey, N.A., Wilkins, H.M. and Linseman, D.A. 2010. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. Molecules, 15(11): 7792-7814.
18. Krishnaraj, M., Manibhushanrao, K. and Mathivanan, N. 2012. A comparative study of phenol content and antioxidant activity between non-conventional *Curcuma caesia* Roxb. and *Curcuma amada* Roxb. International Journal of Plant Production, 4(3): 169-174.
19. Kulkarni, S.J., Maske, K.N., Budre, M.P. and Mahajan, R.P. 2012. Extraction and purification of curcuminoids from Turmeric (*Curcuma longa* L.). International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Technology, 1: 2277-3436.
20. Lampe, V. and Milobedeska, J. 1913. Studien uber Curcumin. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 46: 2235-2240.
21. Lingyun, W., Jianhua, W., Xiaodong, Z., Da, T., Yalin, Y., Chenggang, C., Tianhua, F. and Fan, Z. 2007. Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. Journal of Food Engineering, 79(3): 1087-1093.
22. Luque-Garcıa, J. L. and De Castro, M. L. 2003. Ultrasound: a powerful tool for leaching. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 22(1): 41-47.
23. Nahak, G. and Sahu, R.K. 2011. Evaluation of antioxidant activity in ethanolic extracts of five *Curcuma* species. International Research Journal of Pharmacy, 2(12): 243-248.
24. Nampoothiri, S.V., Lekshmi, P.C., Venugopalan, V.V. and Menon, A.N. 2012. Antidiabetic and antioxidant potentials of spent Turmeric oleoresin, a by-product from curcumin production industry. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2: S169-S172.
25. Norhaiza, M., Maziah, M. and Hakiman, M. 2009. Antioxidative properties of

leaf extracts of a popular Malaysian herb, *Labisia pumila*. Journal of Medicinal Plants Research, 3(4): 217-223.

26. Péret-Almeida, L., Cherubino, A.P., Alves, R.J., Dufossé, L. and Gloria, M.B. 2005. Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. Food Research International, 38(8): 1039-1044.
27. Popuri, A.K., and Pagala, B. 2013. Extraction of curcumin from Turmeric roots. International journal of innovative research and studies, 2(5): 289-299.
28. Revathy, S., Elumalai, S. and Antony, M.B. 2011. Isolation, purification and identification of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa* L.) by column chromatography. Journal of Experimental sciences, 2(7): 21-25.
29. Riera, E., Golas, Y., Blanco, A., Gallego, J.A., Blasco, M. and Mulet, A. 2004. Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. Ultrasonics Sonochemistry, 11(3): 241-244.
30. Rodrigues, S. and Pinto, G.A. 2007. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder. Journal of Food Engineering, 80(3): 869-872.
31. Rouhani, S., Alizadeh, N., Salimi, S. and Haji-Ghasemi, T. 2009. Ultrasonic assisted extraction of natural pigments from rhizomes of *curcuma longa* L. extraction, 6: 103-113.
32. Shahidi, F. and Nackz, M. 2003. Phenolics in food and nutraceuticals. Washington DC: CRC Press, 576 p.
33. Shen, L. and Ji, H.F. 2007. Theoretical study on physicochemical properties of curcumin. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 67(3): 619-623.
34. Shishodia, S., Sethi, G. and Aggarwal, BB. 2005. Curcumin: getting back to the roots. Annals of the New York Academy of Sciences, 1056: 206-217.
35. Singh, S. 2007. From exotic spice to modern drug. Cell, 130(5): 765-768.
36. Song, W., Qiao, X., Liang, W.F., Ji, S., Yang, L., Wang, Y., Xu, Y.W., Yang, Y., Guo, D.A. and Ye, M. 2015. Efficient separation of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin from turmeric using supercritical fluid chromatography: From analytical to preparative scale. Journal of Separation Science, 38(19): 3450-3453.
37. Surojanametakul, V., Satmalee, P., Saengprakai, J., Siliwan, D. and Wattanasiritham, L. 2010. Preparation of curcuminoid powder from turmeric root (*Curcuma* L*onga* L.) for food ingredient Use. Kasetsart Journal- Natural Science, 44: 123-130.
38. Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrasonics Sonochemistry, 8(3): 303-313.
39. Wakte, P.S., Sachin, B.S., Patil, A.A., Mohato, D.M., Band, T.H. and Shinde, D.B. 2011. Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from *Curcuma longa*. Separation and Purification Technology, 79(1): 50-55.
40. Wang, H.W., Liu, Y.Q., Wei, S.L., Yan, Z.J. and Lu, K. 2010. Comparison of microwave-assisted and conventional hydrodistillation in the extraction of essential oils from mango (*Mangifera indica* L.) flowers. Molecules, 15(11): 7715-7723.
41. Widowati, W., Mosef, T., Risdian, C. and Yellianty Y. 2013. Anticancer and free radical scavenging potency of *Catharanthus roseus*, Dendrophthoe petandra, *Piper betle* and *Curcuma manga* extracts in breast cancer cell lines. Oxidants and Antioxidants in Medical Science, 2(2): 137-142.
42. Yang, C., Zhang, X., Fan, H. and Liu, Y. 2009. *Curcumin upregulates* transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against *Focal ischemia*. Brain Research, 1282: 133-141.
43. Zetterström, S. 2012. Isolation and synthesis of curcumin. Bachelor's Thesis, Linköping University Department of Physics, Chemistry and Biology, 26 p.