

مطالعه و بهینه‌سازی شرایط استخراج بربرین از ریشه زرشک بی‌دانه توسط دی‌اکسید کربن فوق بحرانی

نرگس رحیمی^{1*}، عبدالمجید مسکوکي²، سید علی مرتضوی³، امیر حسین الهامی راد⁴، قدیر رجب زاده⁵

1- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار
*نویسنده مسئول (n.rahimi@iaubir.ac.ir)

2- دانشیار گروه فرآوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد

3- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

4- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار

5- دانشیار گروه نانو فناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد

چکیده

تاریخ دریافت: 92/07/13

تاریخ پذیرش: 92/12/25

واژه‌های کلیدی

استخراج

بربرین

دی‌اکسید کربن فوق بحرانی

تکنیک سطح پاسخ

زرشک بی‌دانه

باتوجه به روند روبه رشد جایگزینی داروهای گیاهی به جای داروهای سنتزی و شیمیایی، استخراج مواد موثره گیاهان دارویی با استفاده از روش‌های سالم و بی‌ضرر برای سلامت انسان و محیط زیست ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی شرایط استخراج بربرین از ریشه زرشک بی‌دانه توسط دی‌اکسید کربن فوق بحرانی بود. میزان وابستگی بازده بربرین استخراج شده به دو متغیر مورد مطالعه، فشار و زمان، توسط تکنیک سطح پاسخ تعیین و میزان تأثیر این متغیرها و کفایت مدل پیشنهادی بررسی گردید. ضریب همبستگی ارائه شده مبین این است که محدوده وسیعی از تغییرات، با استفاده از مدل تجربی به دست آمده قابل توضیح می‌باشد. فشار بیشترین تأثیر را بر غلظت بربرین استخراج شده داشت و تأثیر متقابل زمان- فشار بر میزان بربرین استخراج شده از نظر آماری معنی‌دار بود. همچنین محدوده فشار 300 تا 400 بار و زمان 40 تا 75 دقیقه منجر به بیشترین بازده استخراج (بیشتر از 400µg/gr) با تکنیک دی‌اکسید کربن فوق بحرانی گردید. در ادامه، راندمان استخراج بربرین توسط دی‌اکسید کربن فوق بحرانی با روش سنتی استخراج سوکسله مقایسه و نقاط قوت و ضعف این روش نوین بررسی شد.

مقدمه

حاصل از گونه‌های مختلف خانواده بربریداسه از جمله *Berberis Aquifolium*، *Berberis Vulgaris* و *Berberis Aristata* برای درمان انواع بیماری‌های رماتیسمی و التهاب‌های مزمن کاربرد دارند. برخی محققین معتقدند که این نوع عصاره‌ها فعالیت قابل ملاحظه‌ای علیه باکتری‌ها، ویروس‌ها، پروتوزواها و قارچ‌ها دارند. مطالعات انجام شده روی خواص و ساختار شیمیایی اجزای این نوع عصاره‌ها مبین این

زرشک بی‌دانه¹، متعلق به خانواده بربریداسه² و به عنوان گیاه مورد استفاده در طب سنتی می‌باشد و در تمام فرماکوپه‌های مختلف جهان به عنوان گیاه دارویی موثر درج شده است (Javadzadeh & Fallah., 2012؛ صفائی خرم و همکاران، 1378). عصاره‌های

1- *Berberis vulgaris*
2- Berberidacea

می‌باشد. این آلکالوئید بسیار تلخ مزه است (Javadzadeh & Fallah., 2012). تقریباً تمام گونه‌های جنس بربریس حاوی آلکالوئیدهای دارای فعالیت زیستی بوده و در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. ریشه و پوست ساقه زرشک به صورت سنتی برای ناراحتی‌های گوارشی و اختلالات کبدی از جمله التهاب کبد و درمان زردی پیشنهاد شده است (Pfoze et al., 2008; Javadzadeh & Fallah, 2012).

استخراج شامل جداسازی مواد دارویی و بافت‌های گیاهی از مواد غیرفعال و بی‌اثر است که با استفاده از حلال انتخابی صورت می‌گیرد. به طور کلی روش استخراج مواد موثره موجود در گیاهان به نوع بافت‌های گیاهی و ترکیبات گیاه وابسته است (Handa, 2008). همچنین انتخاب حلال به اندام گیاهی و مواد مورد نظر بستگی دارد. به‌طور کلی بهترین حلال برای به دست آوردن عصاره خام گیاه اتانل یا متانل 80 درصد است. در میان روش‌های سنتی، تکنیک‌های کلاسیک استخراج با حلال، در استخراج مواد دارویی و غذایی از بافت‌های گیاهی، بر اساس انتخاب حلال مناسب و عملیات هم‌زدن و یا اعمال حرارت همراه آن می‌باشد (میری، 1377; Handa, 2008). روش استخراج سوکسله به عنوان یک تکنیک استاندارد و مرجع به منظور ارزیابی کارایی سایر تکنیک‌های استخراج مایع/جامد کاربرد دارد. در واقع این روش، در مقایسه با سایر روش‌های رایج (سنتی) دارای مزایایی است که موجب ارجحیت آن بر کاربرد سایر روش‌ها می‌شود. البته این روش برای استخراج ترکیبات حساس به حرارت، توصیه نمی‌شود. این روش نیز معایب متعددی دارد که شامل نیاز به استفاده از مقادیر زیاد حلال شیمیایی، نیاز به فرایند تبخیر/تغلیظ عصاره نهایی بعد از استخراج و امکان تخریب حرارتی ترکیب مورد نظر زمانی که برای مدت طولانی نمونه در تماس با حلال و در نقطه جوش حلال است، باقی ماندن مقداری حلال در محصول نهایی و زمان‌بری نسبتاً زیاد این روش، اشاره نمود (Handa, 2008; Wang & Waller, 2006). در روش‌های رایج استخراج، پارامترهای قابل کنترل محدودی وجود دارد که بر انتخاب‌پذیری فرایند استخراج تأثیر می‌کند. همین امر دلیلی بر توسعه

است که حضور آلکالوئیدهای دارای هسته ایزوکوئینولین در عصاره‌ها، دلیل اصلی این خاصیت ضد میکروبی است (Meliana et al., 2011). آلکالوئید از موضوعات مورد توجه محققین از نظر علمی و فرهنگی می‌باشد و مخصوصاً در طب سنتی به آن توجه زیادی شده است. آلکالوئیدها در 15 درصد از گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها و تعدادی از حیوانات یافت می‌شوند. در سلسله‌های گیاهی نیز این ترکیبات، هم در گیاهان بسیار قدیمی و هم در گیاهان عالی‌تر از جمله نهان‌دانگان و بازدانگان یافت شده‌اند. مهم‌ترین آلکالوئیدها در این گروه بربرین، اکسیاکانتین، بریامین و پالماتین می‌باشد که در میان این گروه بربرین به علت دارا بودن خواصی از قبیل ضدآریمی، ضدالتهاب و خواص ضد میکروبی جایگاه ویژه‌ای در طب سنتی و مدرن به خود اختصاص می‌دهد (صفائی خرم و همکاران، 1378). بربریداسه از جمله خانواده‌های نهان‌دانگان است که نسبتاً آلکالوئید بیشتری دارد. آلکالوئیدهای تیره بربریداسه دارای هسته ایزوکوئینولین هستند و به سه گروه آپورفین‌ها¹، پروتوبربرین‌ها² و بیس بنزیل ایزوکوئینولین³ تقسیم می‌شوند (صفائی خرم و همکاران، 1378؛ میری، 1377).

بربرین اولین بار در سال 1826 جدا شد و تا سال 1862 فرمول صحیحی از آن گزارش نشد. فرمول ساختمانی کلاسیک آن توسط پرکین شناسایی شد. فرمول ملکولی آن $C_{20}H_{18}NO_4^+$ می‌باشد و دارای وزن ملکولی 336/4 است. بربرین به صورت بلورهای سوزنی شکل زرد رنگ با نقطه ذوب 145 درجه می‌باشد و به مقدار کم در آب سرد و به مقدار زیاد در آب گرم و الکل حل می‌شود؛ در کلروفورم به راحتی حل می‌شود اما در اتر دویپترول نامحلول است. برای شناسایی بربرین از تست‌های رنگی می‌توان کمک گرفت. علاوه بر این، بربرین آلکالوئیدی ضدآریمی، ضدباکتری و ضدقارچ است و دارای برخی فعالیت‌های سیتوتوکسیک می‌باشد. این ماده در اسهال‌های کلرا به کار می‌رود و اختلالات گاسترواینستستینال ناشی از کلرا را معالجه می‌کند. دارای خواص ضد پروتوزوئری

- 1- Aporphine
- 2- Protoberberines
- 3- Bisbenzylisoquinolones

انتخاب پذیری بالا استخراج کرد (Azmir *et al.*, 2014; Ahangari & Sargolzaei 2012; Choi *et al.*, 1997).

هدف ما در این پژوهش بررسی شرایط استخراج بربرین (آلکالوئید اصلی ریشه زرشک) توسط دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی، در محدوده زمان و فشار معین و ارائه شرایط بهینه‌ای از این دو متغیر برای رسیدن به حداکثر بازده استخراج می‌باشد. از طرح آزمایش و تکنیک پاسخ سطح برای این هدف استفاده گردید. همچنین بازده این روش با روش کلاسیک سوکسله مقایسه شده است.

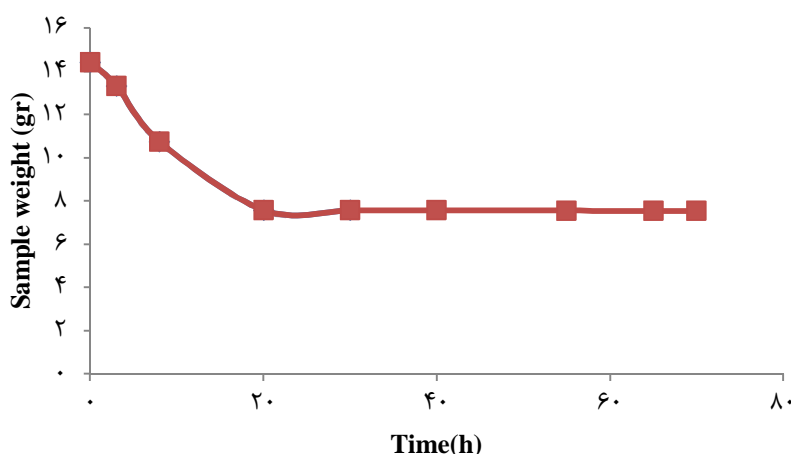
مواد و روش‌ها

آماده‌سازی پودر ریشه زرشک

ریشه زرشک در پایان فصل برداشت، از باغات زرشک بی‌دانه در اطراف شهرستان بیرجند جمع‌آوری شد. حدود دو الی سه روز در اطاقی تاریک و دارای تهویه مناسب کاملاً پهن گردید تا رطوبت سطحی آن به حداقل برسد و پس از انتقال به آزمایشگاه، در آن خلاء 45 درجه سانتی‌گراد به مدت 72 ساعت قرار گرفت و تا حد مطلوبی (حداکثر 2 درصد رطوبت) خشک شد. در مرحله بعد ریشه‌ها، ابتدا در آسیاب چکشی خرد و سپس در آسیاب آزمایشگاهی کاملاً پودر گردید و برای گروه‌بندی دقیق نمونه پودری، با هدف جلوگیری از بروز خطای اندازه ذره بین تیمارها، نمونه‌های آسیاب شده توسط سه نوع الک (الک با شماره مش 24، الک با شماره مش 35 و الک با شماره مش 45) به سه گروه تقسیم شد. گروه اول: ذراتی که بین دو الک با شماره مش‌های 24 و 35 باقی ماندند (از مش 24 کوچکترند اما از مش 35 عبور نکردند). گروه دوم: ذراتی که بین دو الک با شماره مش‌های 35 و 45 باقی ماندند (از مش 35 با اندازه ذره 0/5 میلی‌متر کوچکترند اما از مش 45 با اندازه ذره 0/354 میلی‌متر عبور نکردند). گروه سوم: ذراتی که از الک با شماره مش‌های 45 عبور می‌کنند یعنی اندازه ذرات آن‌ها کمتر از 0/354 میلی‌متر است.

تکنیک‌هایی است که می‌تواند جایگزین تکنیک‌های سنتی استخراج باشد (Pereira, Wang Weller, 2006) (et al., 2004).

به طور کلی اهداف اصلی جایگزینی روش‌های سنتی استخراج با تکنیک‌های نوین، شامل کاهش زمان لازم برای استخراج، کاهش میزان حلال شیمیایی مورد استفاده در استخراج، افزایش بازده استخراج، امکان حذف کامل حلال از محصول و بهبود کیفیت عصاره نهایی می‌باشد. تکنیک‌های نوین استخراج شامل استخراج به کمک امواج فراصوت، استخراج با سیال فوق بحرانی (SFE¹)، استخراج به کمک مایکروویو و استخراج با حلال پرفشار²، تکنیک‌هایی سریع و کافی در استخراج مواد شیمیایی از بخش جامد بافت گیاهی می‌باشد. در میان روش‌های گوناگون استخراج، استفاده از سیالات فوق بحرانی، روش مناسبی برای استخراج و یا جزء به جزء کردن ترکیبات موجود در منابع طبیعی، مخصوصاً اجزاء مختلف دارویی و غذایی است. امکان حذف حلال از عصاره نهایی، انتخاب پذیری بالا و استفاده از دماهای متوسط تا پایین در فراوری، از مهم‌ترین مزایای استفاده از سیال فوق بحرانی در استخراج می‌باشد. عمومی‌ترین سیال مورد استفاده در تکنولوژی استخراج با سیال فوق بحرانی، دی‌اکسیدکربن است. خواص منحصر بفرد این سیال شامل اشتعال ناپذیری، عدم سمیت، قیمت مناسب و در دسترس بودن این سیال، قدرت انتخاب‌پذیری بالا و شرایط بحرانی پایین ($T_c=31.1\text{ }^\circ\text{C}$, $P_c=73.8\text{bar}$) و نداشتن مشکلات زیست محیطی نیز، از سایر مزایای استفاده از دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی می‌باشد (Pereira *et al.*; 2004; Verma *et al.*, 2007; Ahangari & Sargolzaei, 2012). استفاده از دی‌اکسید کربن فوق‌بحرانی به منظور استخراج انواع مواد زیست فعال از قبیل کافئین از دانه قهوه و چای تاکنون گزارش شده است (et al., 2014; De Melo Pereira *et al.*, 2004). مطالعات متعدد بیان می‌کنند که توسط تکنیک SFE اجزاء گیاهی را می‌توان از طریق کنترل دما و فشار (کنترل دانسیته سیال) و با



شکل 1- نمودار تغییرات وزن ریشه زرشک بر حسب ساعت در آون خلاء (45°C)

در این روش 5 گرم از نمونه پودری به طور دقیق وزن شد و در کارتوش سوکسله قرار گرفت. حدود 300 میلی‌لیتر حلال در بالن 500 میلی‌لیتر سوکسله ریخته شد. عملیات استخراج با این روش به مدت 18 ساعت طول کشید و در پایان عمل دستگاه، 300 میلی‌لیتر عصاره، در روتاری اواپراتور تا حجم معین تغلیظ شده و پس از عبور از کاغذ صافی در دمای یخچال، تا زمان انجام آزمون‌های HPLC قرار گرفت.

استخراج توسط دستگاه دی‌اکسید کربن فوق بحرانی
فرایند استخراج فوق بحرانی به‌وسیله دستگاه استخراج فوق بحرانی گازکربنیک طراحی و ساخته شده در آزمایشگاه فن‌آوری‌های نوین پژوهشکده علوم و صنایع غذایی صورت گرفت. شکل 2، دیاگرام شماتیک این فرایند را نشان می‌دهد. دی‌اکسیدکربن در این دستگاه به‌وسیله مخازن دی‌اکسیدکربن مایع (فشار 50 تا 70 بار) تأمین می‌شود. این دستگاه مجهز به پمپ‌های فشار بالایی می‌باشد که طی دو مرحله افزایش فشار، سیال CO₂ را به مخزن استخراج منتقل می‌کرد. اولین پمپ، فشار این سیال را به 90 بار می‌رساند و پمپ دوم فشار را از 90 بار به فشار مورد نظر برای هر مرحله استخراج افزایش می‌دهد. در مراحل مختلف استخراج، دما به صورت چرخش آب در جداره بیرونی مخزن اکستراکتور، در حدود 40 تا 45 درجه سانتی‌گراد می‌رسید و با توجه به دمای بحرانی دی‌اکسیدکربن در این محدوده ثابت می‌ماند.

مواد شیمیایی مورد نیاز

الف) گاز دی‌اکسید کربن مورد استفاده از مخازن حاوی دی‌اکسید کربن مایع با درجه خلوص 99 درصد و فشار 50 تا 70 بار تأمین گردید.

ب) حلال آلی مورد استفاده در آزمون کروماتوگرافی از نوع HPLC-grade (متانول) و کمک حلال اتانول در دستگاه استخراج، از نوع آزمایشگاهی¹ و از شرکت مرک تهیه شدند.

ج) بربرین استاندارد: دارای درجه خلوص بیش از 95 درصد (purity > 95%) با وزن ملکولی 86 gr/mol و از شرکت Fluka خریداری گردید.

د) آب مقطر مورد استفاده در تمامی مراحل از نوع آزمایشگاهی بود.

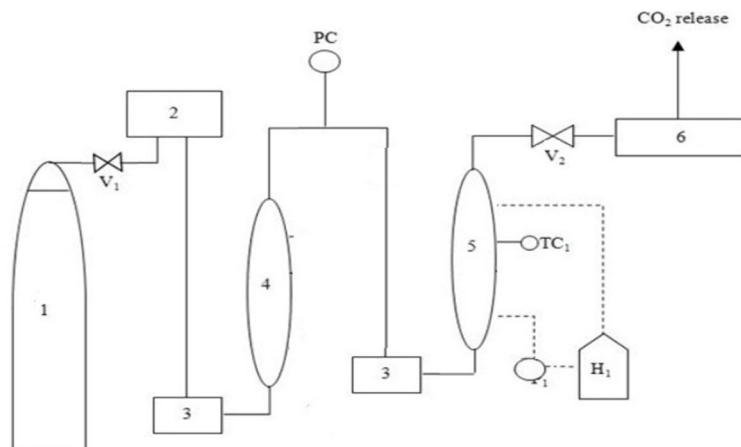
عصاره‌گیری به روش سنتی سوکسله

به منظور استخراج بربرین توسط روش سوکسله، با توجه به بررسی‌های انجام شده و به دلیل این که بربرین در متانول حلالیت بالایی دارد، از متانول به عنوان حلال در این روش سنتی استفاده شد (Beijing, 1997; Chung *et al.*, 1996). البته با توجه به سمیت بالای متانول و بدست آوردن ترکیبی از حلال‌هایی با ایمنی بیشتر، از ترکیبات مختلف آب/اتانول نیز در تکنیک سوکسله برای استخراج استفاده شد.

1- Analytical grade

کاهش یافته تا به فشار محیط می‌رسید. برای جمع‌آوری ماده استخراج شده نیز، در مسیر خروج دی‌اکسیدکربن پرفشار، گاز شوری حاوی 40 میلی‌لیتر اتانول قرار داشت، به گونه‌ای که دی‌اکسیدکربن پرفشار، به محض خروج از اکستراکتور از این بخش عبور کرده و مواد استخراج شده همراه با آن، تدریجاً به اتانول منتقل می‌شد. در انتهای کار نیز تمام مسیرهای عبوری گاز با اتانول شسته شده تا در صورت باقیماندن ماده‌ای در مسیر، با عبور اتانول مواد باقیمانده نیز شسته و به عصاره نهایی افزوده شود. عصاره‌های حاصل به حجم یکسان (80 میلی‌لیتر) رسیدند و بعد از صاف شدن با کاغذ صافی، تا زمان آزمون HPLC در درجه حرارت یخچال نگهداری شدند. در این مطالعه متغیرهای مورد بررسی در استخراج، شامل زمان استخراج (حداقل 30 دقیقه و حداکثر 90 دقیقه) و فشار استخراج (حداقل 300 بار و حداکثر 500 بار) بود.

گرمایش آب توسط المنت‌های الکتریکی و در مخزن جداگانه‌ای انجام می‌شد. کنترل دما به وسیله ترموکنترلر K204 volt craft انجام می‌گرفت. در هر مرتبه استخراج یک گرم از پودر (که به میزان مساوی شامل هر سه گروه اندازه ذره بود) توزین شده و در جایگاه مخصوص نمونه (توری از جنس استیل ضد زنگ با مش 1000)، قرار می‌گرفت. در مخزن اکستراکتور، که از قبل بدین منظور آماده و تمیز شده بود، ابتدا حدود 20 میلی‌لیتر اتانول (کمک حلال) ریخته تا دی‌اکسید کربن فوق بحرانی قبل از عبور از بستر نمونه پودری، از روی اتانول عبور کند. هدف از این کار افزایش قدرت حلالیت دی‌اکسید کربن فوق بحرانی و افزایش بازده استخراج بود. برای هر تیمار، بعد از اتمام زمان استخراج و به منظور افزایش بازده، نمونه مورد نظر حدود 30 دقیقه در معرض فشار دینامیک دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی قرار گرفت و بعد از اتمام این زمان، تدریجاً فشار مخزن اکستراکتور



شکل 2- دیاگرام شماتیکی از سیستم SCF: (1) مخزن دی‌اکسیدکربن مایع، (2) حمام آب، (3) پمپ‌های فشار دستی، (4) مخزن اولیه تجمع CO₂ پرفشار، (5) مخزن اصلی استخراج، (6) بخش کاهنده فشار CO₂. V₁ و V₂: شیرهای کنترل دستی، H₁: گرمکن الکتریکی، PC: گیج فشار، TC₁: ترمومتر دیجیتالی، P₁: پمپ سیرکولاسیون آب

تعیین غلظت بربرین در هر تیمار، از معادله خط این منحنی استفاده می‌شد.

ب) تعیین غلظت بربرین در عصاره

دستگاه HPLC مورد استفاده مدل Knauer و ساخت کشور آلمان بود. ستون مورد استفاده در این دستگاه C₁₈، قطر و ارتفاع آن به ترتیب 4/6 و 15 سانتی‌متر و اندازه ذرات آن 10 نانومتر است. پمپ مخصوص آن از نوع k-1001، همچنین مجهز به

آزمون HPLC

الف) منحنی استاندارد بربرین

به منظور رسم منحنی استاندارد بربرین، یکسری از محلول‌ها با غلظت مشخصی از بربرین توسط حلال متانول تهیه شد. این محلول‌ها با غلظت‌های 10، 50، 100، 250 و 500 µg/ml بودند. برای این مجموعه محلول‌ها، منحنی استاندارد رسم شد که دارای ضریب همبستگی $R^2 = 0/99$ بود. بدین ترتیب، برای

معادله (1)

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_1^2 + a_4X_2^2 + a_5X_1X_2$$

در رابطه فوق Y پاسخ (بازده بربرین) و X فاکتورها در شکل کدبندی شده (در اینجا زمان و فشار استخراج فوق بحرانی) و a_i ضرایب رگرسیون می‌باشند. برای بررسی صلاحیت و کفایت مدل، ضرایب همبستگی و آماره F رگرسیون تعیین گردیده است (Sharif et al., 2014).

برای بررسی اهمیت آماری ضرایب مدل از آزمون t-student استفاده شد. آماره t از تقسیم مقدار ضریب محاسبه شده به خطای استاندارد (SE) ضریب بدست می‌آید. طرح آزمایش، تخمین ضرایب رگرسیون، توسعه مدل، تحلیل‌های آماری، ترسیم منحنی‌های پاسخ سطح و کانتور و بهینه‌سازی توسط نرم افزار Minitab 16 انجام شده است.

نتایج و بحث

مطالعه تأثیر فشار و زمان بر میزان استخراج بربرین

نحوه وابستگی بازده بربرین استخراج شده (بر مبنای میکروگرم بربرین موجود در واحد وزن خشک نمونه) به دو متغیر فشار و زمان توسط تکنیک پاسخ سطح بررسی شد. ضریب همبستگی ارائه شده $(R^2 = 92/71\%)$ برای مدل پاسخ سطح مبین این موضوع است که حدود 93 درصد تغییرات کل، با استفاده از مدل تجربی به‌دست آمده قابل توضیح می‌باشد. همچنین مقدار ضریب همبستگی تنظیم شده برابر 87/5 درصد به‌دست آمده است. مقدار آماره F - regression به‌دست آمده از تحلیل واریانس مدل برابر 17/80 و P -value محاسبه شده برای آن کمتر از 0/05 بوده که نشان از صلاحیت مدل برای به تصویر کشیدن وابستگی بازده بربرین به دو متغیر فشار و زمان در محدوده مورد مطالعه می‌باشد. ضرایب مدل، انحراف استاندارد محاسبه شده برای هر ضریب، آماره T و P -value مربوط به هر ضریب در جدول 1 ارائه شده است. فاکتورهایی که P -value کمتر از 0/05 دارند از لحاظ آماری حائز اهمیت می‌باشند.

لذا با توجه به نتایج جدول 1، فشار و برهم‌کنش فشار- زمان تأثیر معنی‌دار بر میزان بربرین دارند.

دکتور ماوراء بنفشی بود که در طول موج 330 نانومتر اندازه‌گیری می‌کرد. حجم هر تزریق به دستگاه 20 میکرولیتر بود. شرایط حلال (متانول + آب) مورد استفاده برای انجام آزمون تعیین مقدار بدین ترتیب بود که در ابتدای کار حلال شامل 20 درصد متانول بود (به همراه 80 درصد آب) و تدریجاً این ترکیب در عرض ده دقیقه به 100 درصد متانول رسید و با این ترکیب مدت 5 دقیقه کار کرد. سپس، دوباره ترکیب حلال، در فاصله زمانی 5 دقیقه به حالت اول (20 درصد متانول) نزدیک شد و 5 دقیقه دیگر با همین ترکیب کار کرد. در واقع برای تعیین مقدار بربرین در هر تیمار، 25 دقیقه زمان لازم است. با تزریق هر تیمار، مقدار بربرین در هر نوع عصاره، بر مبنای میکروگرم بربرین در هر میلی‌لیتر عصاره و با توجه به کروماتوگرام هر نمونه، محاسبه گردید.

مدلسازی و تحلیل آماری با رویکرد پاسخ سطح

رویکرد پاسخ سطح¹، ترکیبی از تکنیک‌های آماری می‌باشد و در زمره تکنیک‌های طرح آزمایش چندتایی² قرار دارد که در آنها تأثیر چندین متغیر بر پاسخ به طور همزمان مطالعه می‌گردد و کاربردهای مهمی در طراحی، توسعه و فرمول‌بندی محصولات و فرایندهای جدید و نیز بهبود طرح‌های محصول موجود و فرایندها دارد. در این پژوهش تیمارهای مورد نظر با توجه به دو متغیر زمان و فشار و سطوح این متغیرها (زمان در محدوده 30 دقیقه تا 90 دقیقه و فشار در محدوده 200 بار تا 400 بار) و با استفاده از طرح مرکب مرکزی توسط روش پاسخ سطح معین شدند.

به منظور گردآوری نتایج تجربی بر اساس طرح مرکب مرکزی، بربرین موجود در عصاره‌های به‌دست آمده با HPLC تعیین مقدار گردید و سپس با توجه به داده‌های تجربی (غلظت بربرین در هر تیمار)، ضرایب رگرسیون مدل پاسخ سطح دو متغیره ذیل (معادله 1) که شامل متغیرهای درجه اول، درجه دوم و برهم‌کنش است به روش حداقل مربعات خطا تخمین زده شدند.

1-Response Surface Methodology (RSM)
2-Multivariate

منجر به تغییر ساختار بربرین استخراج شده نیز می‌گردد و عملاً در زمان‌هایی بیشتر از 65 تا 70 دقیقه بازده استخراج به تدریج کاهش می‌یابد (شکل 3 و شکل 4). پژوهشی که توسط Liu و همکاران (2006) در زمینه استخراج بربرین با دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی از ریشه *Coptis chinensis* انجام شد به نتیجه مشابهی رسید. آن‌ها گزارش کردند بازده استخراج بربرین با تغییرات فشار از 200 تا 500 بار افزایش دارد. این گروه برای تعیین اثر کمک حلال‌های² (اصلاح کننده‌ها)³ مختلف، بر بازده استخراج، میزان تأثیر حضور کمک حلال قطبی اتانول 95 درصد،¹ و پروپان دی‌ال را در مقایسه با عدم حضورشان، بر بازده استخراج بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که حضور کمک حلال در مقایسه با عدم حضور آن به میزان قابل توجهی بر افزایش بازده استخراج بربرین تأثیر مثبتی دارد.

با توجه به این که بربرین ترکیبی قطبی است و به منظور جبران توانایی کم دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی در انحلال ترکیبات قطبی آلی و شکستن اتصالات ماده- ماتریکس، پیشنهاد می‌گردد به منظور افزایش بازده استخراج در روش دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی، از کمک حلال‌هایی قطبی مانند اتانول، متانول و¹ و² پروپان دی‌ال یا انواع مواد دارای فعالیت سطحی⁴ استفاده گردد. همچنین پژوهشی با هدف ارزیابی میزان تأثیر استفاده از دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی به همراه اتانول، بر استخراج آلکالوئیدهای ایندولی انجام شد و تأثیر وجود کمک حلال اتانول بر افزایش بازده بررسی شد. در نتیجه این مطالعه نیز گزارش شد که حضور کمک حلال علاوه بر افزایش بازده، سرعت استخراج را نیز افزایش می‌دهد (Pereira et al., 2004). مطالعات مبین این است که یکی از محدودیت‌های اصلی استفاده از دی‌اکسید کربن فوق بحرانی در استخراج، میزان قطبیت محدود ملکول‌های این ماده است که بایستی این محدودیت را توسط استفاده توأم اصلاح کننده (کمک حلال) با دی‌اکسید کربن فوق بحرانی جبران کرد. در واقع قطبیت محدود

ضریب رگرسیون محاسبه شده برای ترم درجه اول فشار عددی بزرگ با علامت مثبت است که مبین این است، با افزایش فشار میزان بربرین استخراج شده افزایش چشمگیر می‌یابد. از طرف دیگر فاکتور درجه دوم¹ برای زمان و فشار از لحاظ آماری حائز اهمیت می‌باشد و با توجه به علامت منفی ضریب محاسبه شده می‌توان گفت افزایش بیشتر فشار و زمان تأثیر مثبتی بر میزان بربرین استخراج شده ندارد.

بیان شماتیک مدل پاسخ سطح در قالب منحنی‌های پاسخ سطح و کانتور می‌تواند مشاهده بهتری از نحوه وابستگی بازده بربرین به تغییرات زمان و فشار ارائه دهد. منحنی پاسخ سطح ارائه شده در شکل 3 به وضوح تأثیر افزایش فشار بر میزان استخراج بربرین را نشان می‌دهد. با این حال سرعت افزایش، در محدوده فشارهای 200 تا 300 بار بیشتر است (در مقایسه با فشار 300 تا 400 بار). همان طور که اشاره شد تحلیل آماری ترم درجه دوم برای فشار را حائز اهمیت دانسته است که به خوبی در منحنی پاسخ سطح منعکس شده است. با توجه به شکل 3 بازده استخراج بربرین با گذشت زمان از یک نقطه حداکثر می‌گذرد و این حداکثر بازده به مقدار فشار بستگی دارد. تحلیل آماری (جدول 1) نیز فاکتور برهم‌کنش زمان- فشار را از لحاظ آماری مهم دانسته است. مدل آماری پاسخ سطح تغییرات بازده بربرین بر حسب زمان و فشار زمانی که از متغیرهای کدبندی نشده استفاده گردد به شرح زیر خواهد بود:

$$Y = -1141.48 + 18.1042 * \text{Time} + 5.83890 * \text{Pressure} - 0.107387 * \text{Time} * \text{Time} - 0.00698483 * \text{Pressure} * \text{Pressure} - 0.014533 * \text{Time} * \text{Pressure}$$

همان طور که در جدول 1 (ضرایب مدل و تحلیل آماری) نیز دیده می‌شود با توجه به ضریب مثبت فشار، افزایش فشار منجر به افزایش بازده خواهد شد که در شکل 3 و شکل 4 این رفتار دیده می‌شود. در واقع افزایش فشار با اعمال نیروی بیشتر به بافت در تخریب اتصالات بربرین- ماتریکس موثر است که این اثر، تنها در زمان مشخصی از آغاز فرایند بر بازده استخراج دیده می‌شود. در واقع اگر زمان از حدود 70 دقیقه بیشتر شود، در این شرایط فشار بالای استخراج

2 - Co-solvent
3 - Modifier
4 - Surfactant

1 Quadratic

قطبیت متفاوت به منظور جبران این محدودیت، منجر به بهبود بازده استخراج می‌گردد (Bertucco & Franceschin; 2008).

دی اکسیدکربن فوق بحرانی، در استخراج ترکیبات قطبی و یا نسبتاً قطبی، منجر به کاستی‌هایی می‌شود (Pereira *et al.*, 2004; Bertucco & Franceschin;) (2008). قطعاً استفاده از کمک حلال‌هایی با میزان

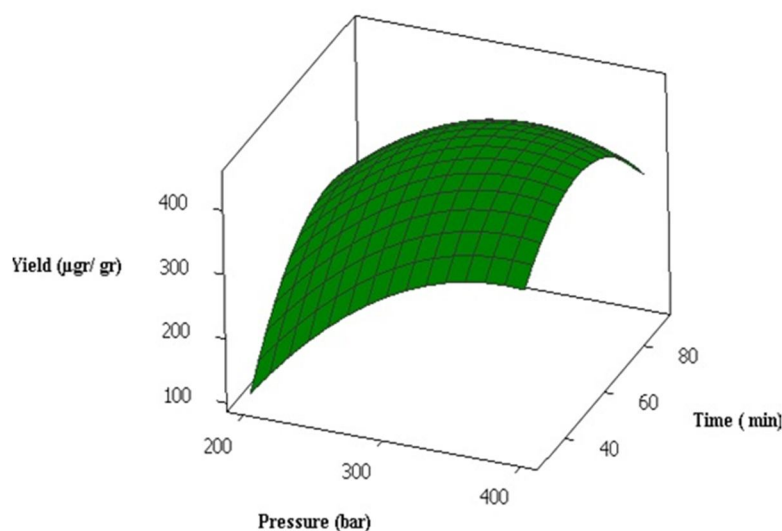
جدول 1- مطالعه اثرات متغیرهای دما و فشار بر میزان استخراج بربرین به کمک تحلیل آماری و توسعه مدل پاسخ سطح

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	419/61	14/62	28/706	0/00
Time	25/73	14/37	1/791	0/116
Pressure	77/60	14/37	5/399	0/001
Time*Time	-96/65	21/18	-4/563	0/003
Pressure*Pressure	-69/85	21/18	-3/297	0/013
Time*Pressure	-43/60	17/60	-2/477	0/042

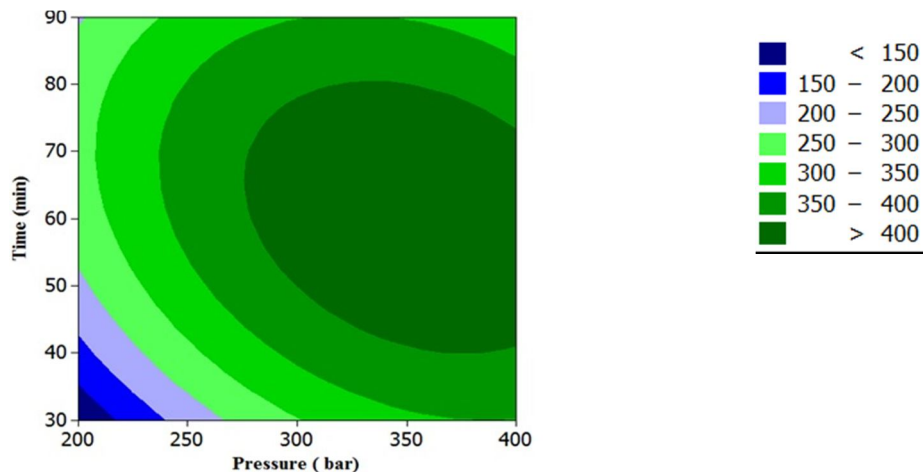
F-regression = 17/80, PRESS = 83296/5, R-Sq = 92/71%, R-Sq adj = 87/50%

بحرانی می‌شود. هم‌چنین در منحنی کانتور دیده می‌شود که افزایش فشار تا 300 بار تا حد قابل توجهی منجر به افزایش بازده استخراج می‌شود و نهایتاً در فشار 300 بار، بیشترین بازده استخراج حاصل می‌گردد. هم‌چنین در فاصله زمانی 50 تا 75 دقیقه بیشترین بازده استخراج حاصل شده که افزایش زمان، در این شرایط منجر به کاهش بازده استخراج می‌گردد (نتایج موجود در جدول 1 را تأیید می‌کند). در پایان، حداکثر میزان بربرین استخراج شده، در فشار 363/64 بار و زمان 59/69 دقیقه می‌باشد که در این شرایط بازده استخراج 430/280 $\mu\text{g}/\text{gr}$ خواهد بود.

بررسی شرایط بهینه استخراج فوق بحرانی بربرین شرایط بهینه استخراج بربرین به دو روش مطالعه شده است: (1) استفاده از منحنی کانتور و (2) ماکزیمم کردن مدل پاسخ سطح با استفاده از RSM optimizer، که این قابلیت در نرم افزارهای آماری مانند MINITAB و Design Expert گنجانده شده است. شکل 3 منحنی کانتور تغییرات بازده بربرین بر حسب فشار و زمان را نشان می‌دهد. با توجه به منحنی کانتور ارائه شده مشخص است که محدوده فشار 300 تا 400 بار و زمان 40 تا 75 دقیقه منجر به بیشترین بازده استخراج (بیشتر از 400 میکروگرم در هر گرم از نمونه) با تکنیک دی اکسید کربن فوق



شکل 3- منحنی پاسخ سطح اثر متقابل فشار-زمان بر بازده بربرین استخراج شده توسط روش استخراج با Sc-CO_2

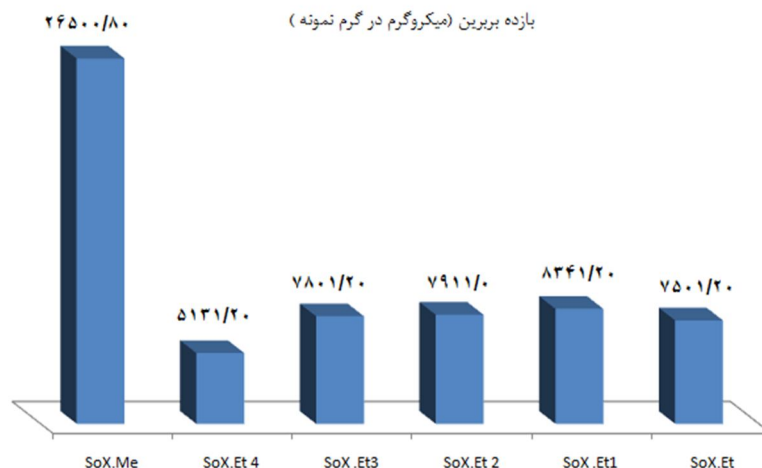


شکل 4- منحنی کانتور اثر متقابل فشار - زمان بر بازده بربرین استخراج شده در تکنیک استخراج توسط استخراج توسط دی-اکسیدکربن فوق بحرانی

استخراج توسط روش سوکسله

شرایط بهینه استخراج بربرین توسط دی-اکسیدکربن فوق بحرانی با روش استخراج سوکسله توسط حلال‌های مختلف مقایسه گردید. همان طور که ملاحظه می‌شود در تمامی روش‌های استخراج با روش سوکسله میزان بازده بربرین در مقایسه با روش دی-اکسیدکربن فوق بحرانی بیشتر بود. در شکل 5 بازده در استخراج به روش سوکسله دیده می‌شود، به ترتیب از راست به چپ: در SoX Et : حلال اتانول خالص مرک در SoX Et1 : حلال اتانول/آب با نسبت 25:75، SoX Et2، 50:50 : حلال اتانول/آب با نسبت 75:25، SoX Et3 : حلال آب و در SoX Me حلال متانول است. با توجه به این که متانول الکلی است قابل اشتعال و سمی (مخصوصاً برای اندام‌های مختلف انسان) و استفاده از آن هم از نظر ایمنی کار و هم سلامتی همراه با محدودیت‌هایی است (Liu *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.* 2006)، استفاده از آن برای استخراج ماده‌ای با هدف کاربری دارویی و غذایی، توصیه نمی‌شود. میان شرایط مختلف استخراج بربرین توسط سوکسله، ملاحظه می‌شود که استفاده از حلال

اتانول/آب با نسبت 25:75 منجر به بالاترین بازده گردید. ملاحظه می‌شود در تمامی روش‌های استخراج با سوکسله میزان بازده بربرین در مقایسه با روش دی-اکسید کربن فوق بحرانی بیشتر می‌باشد. بنابراین لازم است برای افزایش راندمان استخراج به روش فوق بحرانی مطالعه بیشتری انجام شود. استفاده از پیش تیمارهای مناسب مانند امواج فراصوت روی نمونه اصلی یا استفاده از کمک حلال و یا ترکیباتی مختلف از کمک حلال‌های مناسب به منظور افزایش و بهینه سازی حلالیت جزء مورد نظر در سیال فوق بحرانی و یا استفاده توأم از روش خیساندن توسط حلال مناسب و تکنیک استخراج با دی اکسید کربن فوق بحرانی روش‌های پیشنهادی برای افزایش بازده استخراج به روش فوق بحرانی باشند. با این حال باید توجه داشت که با استفاده از روش فوق بحرانی در مقایسه با روش سوکسله، زمان استخراج کاهش چشمگیری می‌یابد. علاوه بر این مرحله جدا کردن حلال (حتی همراه با کمک حلال) به هنگام استفاده از روش دی-اکسیدکربن فوق بحرانی حذف شده و نهایتاً منجر به تولید محصولی عاری از حلال می‌گردد.



شکل 5 - مقایسه بازده بربرین استخراج شده با روش سوکسله توسط حلال‌های متفاوت

نتیجه گیری

تکنیک استخراج توسط سیال فوق بحرانی، به عنوان یکی از تکنیک‌های نوین استخراج در مباحث استخراج ترکیبات موثر دارویی و غذایی، از منابع گوناگون، کاربرد فراوانی دارد که در این میان دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی به علت ایمنی و سهولت در کار به عنوان رایج‌ترین سیال فوق بحرانی مخصوصاً در صنایع غذایی و دارویی گزینه‌ای مناسب است. در این مطالعه تأثیر دو فاکتور مهم فشار و زمان بر بازده استخراج بربرین از ریشه زرشک توسط تکنیک استخراج با دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد برای رسیدن به حداکثر بازده استخراج بربرین، افزایش زمان و فشار تا حد

مشخصی تأثیر مثبت دارد. با این حال مقایسه مقدار حداکثر بربرین استخراج شده از این روش با مقدار بربرین استخراج شده از روش‌های کلاسیک (سوکسله) که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته حاکی از آن است که افزایش کارایی استخراج بربرین توسط روش دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی از ریشه زرشک نیاز به مطالعه بیشتری دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاران آزمایشگاه فناوری‌های نوین غذایی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی و آزمایشگاه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی مشهد کمال سپاسگزاری را دارند.

منابع

- 1- صفائی خرم، م. جعفرنیا، س. و خسرو شاهی، س. 1387. مهم‌ترین گیاهان دارویی جهان. انتشارات آموزشگاه کشاورزی سبز ایران، چاپ دوم، صفحات 236-239.
- 2- صمصام شریعت، س. ه. 1371، عصاره گیری و استخراج مواد موثره گیاهان دارویی و روش‌های شناسایی و ارزشیابی آنها، انتشارات مانی، چاپ اول.
- 3- میری، ع.ج. 1377. جداسازی، خالص سازی و شناسایی آلکالوئیدهای ریشه گیاه زرشک، پایان نامه دکتری داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.
- 4- Ahangari, B., & Sargolzaei, J. 2012. Extraction of pomegranate seed oil using subcritical propane and supercritical carbon dioxide. Foundations of Chemical Engineering, 46(3): 258-265.
- 5- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., & Omar, A.K.M. 2013. Techniques for extraction

- of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117: 426-436.
- 6- Beijing, 1997. Pharmacopoeia of the people's Republic of China, Pharmacopoeia commission of PRC. P.107, English edition.
 - 7- Bertucco, A. & Franceschin, G. 2008. Supercritical Fluid Extraction of Medicinal and aromatic plants: Fundamentals and Application. P: 169-180. Medicinal plants of the word: an illustrated scientific guide to important medicinal plants and their uses. Chapter10. First Edition. International Center for Science and High Technology, Trieste
 - 8- Choi, Y. H., Kim, J., Noh, M., Choi, E. S., & Yoo, K.P. 1997. Comparison of supercritical carbon dioxide extraction with solvent of nonacosan-10-ol, α -amyrin acetate, squalene and stigma sterol from medicinal plants. *Phytochemical Analysis*, 8: 233-237.
 - 9- De Melo, M. M.R., Barbosa, H. M.A., Passos, C. P., & Silva, C. M. 2014. Supercritical fluid extraction of spent coffee grounds: Measurement of extraction curves, oil characterization and economic analysis. *The Journal of Supercritical Fluids*, 86: 150–159.
 - 10- Hashimoto, K., Higuchi, M., Makino, B., Sakakibara, I., Kubo, M., Komatso, Y., Maruno, M., & Okada, M. 1999. Quantitative analysis of aristolochic acids, toxic compounds contained in some medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 185-189.
 - 11- Handa, S. S. 2008. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. P. 21-52. Medicinal plants of the word: an illustrated scientific guide to important medicinal plants and their uses. Part 1. First Edition. International Center for Science and High Technology, Trieste.
 - 12- Javadzadeh, S. M., & Fallah, S. R. 2012. Therapeutic application of different parts *Berberis vulgaris*. *International Journal of Agriculture and Crop Science*, 4(7): 404-408.
 - 13- Kashif, Gh., Jiyong, P., & Yong-Hee, C. 2010. Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology. *Innovative Food science & Emerging Technologies*, 11 (3): 458-490.
 - 14- Liu, B., Li, W., Chang, Y., Dong, W., & Ni, L. 2006. Extraction of berberine from rhizome of *Coptis chinensis* Franch using supercritical fluid extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1056–1060.
 - 15- Meliania, N., El.Amin. Dib, M., Allali, H., & Tabti, B. 2011. Hypoglycemic effect of *Berberis vulgaris* L. in normal and streptozotocin- induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1 (6): 468-471.
 - 16- Pereira, C. G., Marquis, M. O. M., Barreto, A. S., Siani, A. C., Fernandes, E. C., Angela, M., & Meireles, A. 2004. Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO₂ +Ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin. *The Journal of Supercritical Fluids*, 30: 51-56.
 - 17- Pfoze, N. L., Kumuar, Y., Myrboh, B., Bhagobaty, R. K., & Joshi, S. R. 2011. In vitro antibacterial activity of alkaloid extract from stem bark of *Mahonia manipurensis* Takeda. *Journal of Medicinal plants Research*, 5 (5): 859-861.
 - 18- Sharif, K.M., Rahman, M.M., Azmir, J., Mohamed, A., Jahurul, M.H.A., Sahena, F., & Zaidul, I.S.M. 2014. Experimental design of supercritical fluid extraction – a review. *Journal of Food Engineering*, 124: 105-116.
 - 21- Verma, A., Hartonen, K., & Riekkola, M. L. 2007. Optimization of supercritical fluid extraction of indol alkaloids from *Catharanthus roseus* using experimental design methodology – comparison with other extraction techniques. *Phytochemical Analysis*, 19: 52-63.
 - 22- Wang, L., & Weller, C. L. 2006. Recent Advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food science and Technology*, 17: 300-312.

Study and optimization of berberine extraction conditions from barberry root by supercritical carbon dioxide

Narges Rahimi^{1*}, Abdolmajid Maskooki², Seyed Ali Mortazavi³, Amir Hossein Elhamirad⁴, Qadir Rajabzade⁵

1. PhD. Student, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Sabzevar Branch, Sabzevar, Iran

*Corresponding author (n.rahimi@iaubir.ac.ir)

2- Associated Professor, Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

3- Professor, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Sabzevar Branch, Sabzevar, Iran.

4- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Sabzevar Branch, Sabzevar, Iran

5- Associated Professor, Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

Abstract

Extraction of bioactive materials from herbal plants may be interesting due to the growing trend of using herbal remedies instead of chemical ones. The aim of present study is to optimize the conditions of Berberine extraction from roots of *Berberis Vulgaris* by supercritical CO₂. The dependency of Berberine extraction yield on extraction parameters, time and pressure, was studied by Response surface Methodology. The effective factors on the extraction yield and adequacy of proposed model was investigated according to the experimental data and statistical analysis. The correlation coefficient ($R^2 = 92.71\%$) showed that about 93% of all alternatives can be explained by this experimental model. Pressure has the most influence on yield of extracted berberine and the interaction term of Time –Pressure is statistically significant on the berberine yield. Using supercritical CO₂ method with pressure in the range of 300-400 bars and the time in the range of 40-75 minutes would lead to the maximum of berberine extraction (more than 400 µg/gr). Finally, yield of berberine extraction by SFE has been compared with traditional method (Soxhlet) and the strengths and weaknesses of this novel method have been considered.

Keywords: Berberine, *Berberis Vulgaris*, Extraction, Response Surface Methodology, Supercritical CO₂