استخراج کیفی و کمی استویوزید از گیاه دارویی *Stevia rebadiana* Bertoni. با استفاده از روش فاز جامد قالب مولکولی

سمیه آقابیک[۱]، مازیار احمدی گلسفیدی[۲*]، محمدهادی سلیمانی[۳]

[۱و۲]گروه شیمی، دانشکده علوم، واحد گرگان، دانشگاه آزاد داسلامی، گرگان، ایران

[۳]داروسازی گیاه اسانس، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۰۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۱۹

چکیده

گیاه استویا با نام علمی .*Stevia rbaudiana* Bertoni حاوی شیرین کننده استویول ، گلیکوزیدی بدون کالری است که با اثر بر تنظیم میزان قند خون به خصوص در بیماران دیابتی به‌عنوان یک داروی موثر عمل می‌نماید. هدف از انجام این تحقیق دستیابی به یک روش نوین جهت جداسازی کیفی و کمی استویوزید به‌عنوان شیرین کننده بدون کالری از گیاه دارویی استویا می‌باشد.در این تحقیق نمونه برگهای خشک شده گیاه استویا در شهریورماه ۱۳۹۴ از شرکت تولید کننده گلساران شمال تهیه شد. به‌منظور استخراج استویوزید علاوه بر روش HPLC و پلاروگرافی، یک فاز جامد قالب مولکولی مناسب تهیه و سپس برخی از عوامل موثر بر استخراج توسط این روش نوین، بهینه سازی گردید. برای تهیه پلیمر استخراج‌گر، از یک مونومر عاملی اکریلاتی و یک اتصال دهنده عرضی استفاده شد. نسبت کمی اجزای تشکیل‌دهنده پلیمر و همچنین تاثیر درجه ریز شدگی فاز استخراج‌گر بر راندمان استخراج نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین درصد بازدهی استخراج استویوزید در نسبت ۱ به ۵ از مقدار مونومر عاملی به مقدار اتصال‌دهنده عرضی و بهترین درجه ریز شدگی این استخراج‌گر ۱۰۰۰ میکرون به‌دست آمد و میزان استویوزید نیز ۱۱,۱۶ درصد وزنی گزارش گردید.

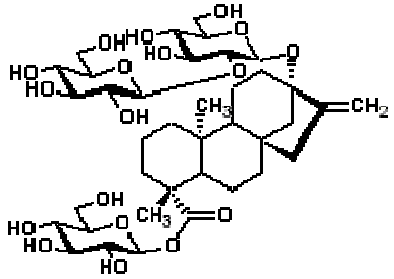
واژه‌های کلیدی: استخراج فاز جامد، استویا، استویوزید، پلیمر قالب مولکولی، پلاروگرافی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

*نویسنده مسئول: mahmadig@gmail.com

مقدمه

گیاه استویا با نام علمی *Stevia Rebaudiana* Bertoni. متعلق به تیره آفتابگردان (Asteraceae) و بومی پاراگوئه و برزیل می‌باشد (Gardana et al., 2003). برگ‌های استویا محل ذخیره ۸ گلیکوزید استویول می‌باشد (Brandle andTelmar,2007). گلیکوزید استویول ترکیب‌های شیرینی هستند که از گیاه استویا استخراج می‌شوند. استویوزید و ربایودیوزاید A، دو گلیکوزید معروف و مهم در این گیاه می‌باشند. برگ گیاه استویا حدود ۳۰۰ برابر شیرین‌تر از ساکاروز می‌باشد. استویوزید به‌عنوان یک گلیکوزید متشکل از ۳ مولکول گلوکز متصل به یک آگلیکون توصیف می‌شود (Mondase et al.,2012). شکل ۱ ساختار شیمیایی گسترده استویوزید را نشان می‌دهد. علاوه بر استویوزید تاکنون چندین ترکیب شیرین مانند استویوزید، ربادیوزاید A، ربادیوزاید B، ربادیوزاید C، ربادیوزاید D، ربادیوزاید E و دوالکوزید A از استویا جداسازی و استخراج شده‌اند (Anvari and Khayati, 2016).

مطالعات سم شناسی پل و همکاران (Pol et al., 2007) نشان می‌دهد که ماده موثره استویوزید فاقد عوارض جهش زای ژنتیکی و سرطانی می‌باشد. گلیکوزیدهای موجود در استویا دارای ویژگی‌های بیولوژیکی ارزشمندی است که مصرف منظم این ترکیبات میزان قند و کلسترول خون را کاهش داده و باعث احیای بافت سلولی و انعقاد خون می‌گردد (Atteh et al., 2007).



شکل ۱: ساختار شیمیایی استویوزید (شیرین‌کننده بدون کالری)

در حال حاضر روش‌های متعددی جهت استخراج گلیکوزیدهای استویول توسط محققین با استفاده از تکنیک‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته‌است، از قبیل ماسراسیون واستفاده از حلال‌های مختلف (Lorenzo et al.,2014)، استخراج مایع تحت فشار (Teo et al., 2009) استخراج به وسیله مایع داغ[1] (Pol et al., 2007)، استخراج به کمک امواج فراصوت (Puri et al.,2013)، استخراج توسط سیستم‌های دوفازی آبی با کولین کلرید (Abolghasembeyk et al., 2016) استخراج به کمک ریزموج (Yildi z-ozturk et al., 2015)، استخراج به کمک سیال فوق بحرانی (Erkucuk et al., 2009)، استخراج به کمک آنزیم (Fuh and Chiang, 1990)، استخراج توسط غشاء یونی (Steriedner et al.,1991) و روش فرایند تعویض یون (Weiss et al., 2001).

در سال‌های اخیر از روش استخراج فاز جامد[2] یا به اختصار SPE در جداسازی ترکیبات مهم طبیعی و شیمیایی استفاده‌های زیادی شده است (Andrade-Eiroa et al., 2016). استخراج فاز جامد روشی است که در آن از یک فاز جامد و یک فاز مایع برای

1. PHWE (Power Heat Water Extraction)

2. Solid Phase Extraction

جداسازی یک ترکیب طبیعی یا شیمیایی به‌صورت محلول استفاده می‌شود. یکی از دلایل استفاده از استخراج فاز جامد، استخراج گزینش‌پذیر آن است (Plotka-Wasylka et al., 2016). در این تکنیک، ماده موثره مورد نظر از فاز مایع به درون فاز جامد استخراج می‌گردد. اخیرا روش پلیمرهای قالب مولکولی[1] یا MIP یکی از قویترین تکنیک‌ها جهت استخراج و جداسازی ترکیبات طبیعی معرفی شده‌اند (Ashley et al., 2017). این نوعاستخراج برای تهیه ترکیبات طبیعی، استخراج و پیش تغلیظ‌داروها، ترکیبات طبیعی، آلاینده‌ها از محیط،مواد بیولوژیکی،مواد غذایی و نمونه محصولات غذایی و آشامیدنی به کار می‌رود (Brandle et al., 2007).

در روش استخراج با MIP بین گروه‌های عاملی مولکول هدف (الگو) با گروه‌های عاملی مونومر، یک واکنش بین مولکولی ایجاد می‌شود و سایت‌های تشخیصی حاصل می‌گردند.این سایت‌ها تحت واکنش پلیمریزاسیون منومرهای عاملی با غلظت بالایی از اتصال دهنده عرضی محکم می‌شوند.پس از آن توسط حلال‌شویی مولکول الگو حذف می‌شود (Sarhan, 1972). پلیمر بدست آمده قالب مولکولی یا MIP نامیده می‌شود (Quaglia et al., 2001). این روش گاما و همکاران (Gama et al., 2016) به‌طور بالقوه در تحقیقات استخراجی زیادی از قبیل جداسازی مولکول کایرال (Ebarvia et al.,2004) بیوسنسورها (Tianwei et al., 2001)، جداسازی ترکیبات بیوشیمیایی، شبیه‌سازی آنتی‌بادی و شبیه‌سازی تجزیه آنزیم‌ها (Ye and Mosbach, 2001) استفاده شده است. این تحقیق با هدف تهیه یک فاز جامد استخراج کننده بر پایه پلیمرقالب مولکولی برای استخراج استویوزید از گیاه دارویی استویا انجام شد و مهمترین عوامل موثر بر آن بهینه سازی شد و در نهایت ارزیابی این روش در نمونه‌های طبیعی صورت پذیرفت. در این تحقیق جهت بررسی کارایی روش برای اولین بار از دستگاه پلاروگرافی به‌منظور سنجش استویوزید بهره گرفته شد.

مواد و روش‌ها

تهیه برگ‌های گیاه استویا: به‌منظور تهیه برگ خشک این گیاه، ابتدا مقدار ۱۰ کیلوگرم از گیاه استویا که توسط یکی از تولید کنندگان آن در شمال کشور (شرکت گلساران شمال) به‌صورت کشت بافت تکثیر و پرورش یافته بود در شهریور سال ۹۴ خریداری شد. سپس برای خشک کردن به آزمایشگاه تحقیق و توسعه شرکت داروسازی گیاه اسانس منتقل شدند و پس از شستشوی با آب مقطر تحت دمای ۴۵ درجه به مدت ۳ ساعت در دستگاه خشک کن تحت عملیات خشک کردن قرار گرفتند. سپس مقدار یک کیلوگرم از برگ سبز و خشک شده گیاه در آسیاب صنعتی در حد بسیار ریز آسیاب شدند (Deshmukh et al., 2014). از این گیاه برای کلیه نمونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق استفاده شد.

عصاره‌گیری به روش ماسراسیون (Brandle et al., 2007**):** برگ‌های خشک شده گیاه استویا را پودر کرده و ۱ گرم از پودر خشک شده با ۱۰ میلی‌لیتر متانول خالص خیسانده شد و به‌مدت ۳ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. سپس با کاغذ صافی صاف شد.

آماده‌سازی محلول استاندارد استویوزید و تهیه فاز جامد استخراج کننده استویوزید: از آنجایی که این روش برای اولین بار برای استخراج استویوزید به‌کار می‌رود لذا مقادیر مواد اولیه متناسب با استوکیومتری واکنش‌هادر پلیمریزاسون انتخاب شدند. مقدار نیم میلی‌لیتر از متا اکریلیک اسید MAA (خریداری شده از شرکت Sigma-Aldrich) به‌عنوان مونومر عاملی و ۲/۵ میلی‌لیتر از اتیلن گلیکول دی متیل اکریلات

1. Molecularly Imprinted Polymers

EGDMA (خریداری شده از شرکت Sigma-Aldrich) به‌عنوان اتصال‌دهنده عرضی، ۰/۴۰۲۴ میلی‌مول معادل ۳۲۳/۹ میلی‌گرم از استویوزید استاندارد به‌عنوان مولکول الگو و ۰/۰۵گرم آغازگر آزوبیس بوتیرونیتریل AIBN (خریداری شده از شرکت Sigma-Aldrich) اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه گاززدایی انجام شد. سپس ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار داده شد.مقدار ۰/۱ گرم از نانولوله کربنی نیز جهت بهینه‌سازی استخراج به مخلوط فوق اضافه شده و به‌مدت ۲۰ دقیق دیگر در حمام اولتراسونیک همگن گردید (Ma et al., 2017) پس از آن جهت انجام فرایند پلیمریزاسیون به‌مدت ۲۴ ساعت در مقابل تشعشع لامپ UV با طول موج ۳۳۰ نانومتر و در دمای ۴ الی ۸ درجه سانتی‌گراد ترک شد. سپس مرحله حذف مولکول الگو (استویوزید) با استفاده از حلال‌شویی انجام می‌شود. این مرحله با اضافه کردن حلال (متانول و اسید استیک به نسبت۹به۱) به پلیمر به نسبت ml ۱۰به gr۱ به‌مدت ۲۴ساعت تحت رفلاکسادامه یافت. بعد از آن محلول توسط کاغذ صافیصاف شده و مجدد با متانول خالص به‌مدت ۲۴ ساعت مرحله خروج الگو تحت همان شرایط رفلاکس ادامه پیدا کرد. پس از اتمام عملیات رفلاکس فاز جامد با متانول شستشو داده و در هوای آزاد خشک گردید. جاذب تهیه شده توسط‌هاون چینی به ذرات ریز خرد شد و با غربال توری سیمی به مش‌های میانگین اندازه ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰میکرومتر دسته‌بندی و همگن شدند.

به‌منظور عملیات استخراج شیرین کننده بدون کالری استویوزید، مقدار ۰/۱ گرم از فاز جامد استخراجی تهیه شده با ۱۰ میلی‌لیتر محلول عصاره هیدروالکلی گیاه استویا یا محلول استاندارد استویوزید ppm ۱۰ به مدت ۲۰دقیقه درون یک بشر به‌همراه مگنت هم زده شد. سپس محلول صاف شده و فرایند واجذب مولکول‌های استویوزید از سطح استخراج کننده با شستشو توسط۳ میلی لیتر متانول صورت گرفت. محلول نهایی شامل شیرین کننده است و برای آنالیز با دستگاه پلاروگرافی با ۲۵ میلی‌لیتر محلول یک مولار SO_4H_2 (خریداری شده از Merck) تحت عملیات رفلاکس آماده سازی شد. پس از آنالیز با دستگاه پلاروگرافی نتایج حاصل مورد تحلیل قرار گرفتند. برای سنجش توسط دستگاه HPLC نیازی به عملیات آماده سازی با سولفوریک اسید نمی‌باشد.

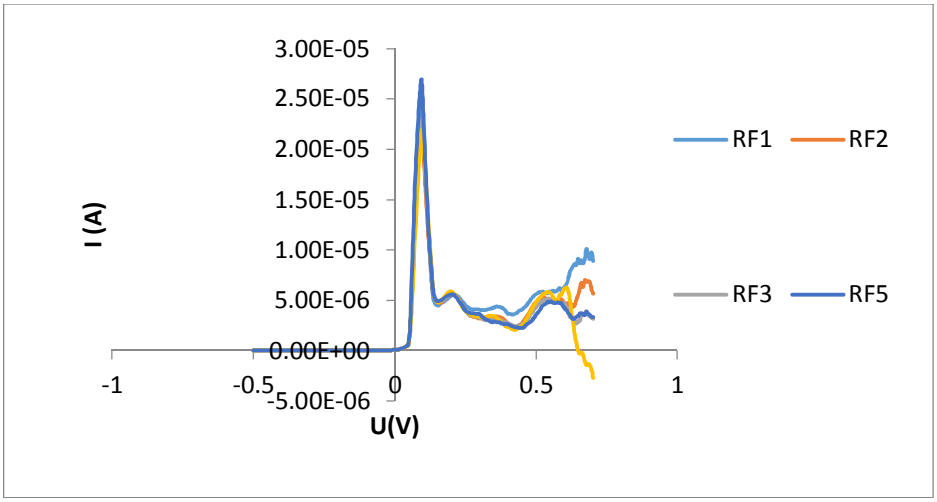
شرایط دستگاه پلاروگرافی: در این تحقیق تمام اندازه‌گیری‌های کمی و کیفی الکتروشیمیایی توسط دستگاه پلاروگرافی (797 شرکت Metrohm) با سیستم سه الکترودی انجام پذیرفت.الکترود قطرجیوه (DME) به عنوان الکترود کار، الکترود کالومل اشباع (SCE) به‌عنوان الکترود مرجع و الکترود کمکی میله نازک پلاتین انتخاب گردید. ۰/۲۵ میلی‌لیتر از محلول (عصاره یا استاندارد) به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رقیق شد و به کمک روش افزایش استاندارد و تکنیک پلاروگرافی پالسی در دمای اتاق مورد آنالیز کمی قرار گرفت. محلول استاندارد استفاده شده در این آنالیز ml ۰/۱ از محلول ppm۱۰۰ در هر مرحله بود. لازم به ذکراست قبل از انجام آنالیز، محلول آماده آزمایش به‌مدت ۵ دقیقه توسط ورود گاز نیتروژن، اکسیژن زدایی شد. پارامترهای دستگاهی جهت آنالیز به‌صورت ذیل تنظیم گردید: دامنه پتانسیل (از ۰/۱ تا ۰/۷ ولت)، سرعت اسکن ۱۰ میلی‌ولت برثانیه.

شرایط دستگاهکروماتوگرافی مایع با عملکردبالا HPLC: جداسازی و اندازه گیری آنالیت مورد نظر توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا ساخت شرکت (Berlin Zehlendarf, Germany) knauer انجام گرفت. این دستگاه مجهز به آشکارساز فرابنفش مدل K-2600، ستون مدل Perfectsil RP-18 (4.6mmdiameter, 250mm length, ODS 3-5m) بود. یک محافظ ستون RP-18 به‌صورت جریان مستقیم روی ستون نصب شده بود. پمپ چهار کاناله

مدل K-2600 همراه با گاز زدا نیز از جمله متعلقات این سیستم بود. فاز متحرک شامل آب- متانول به نسبت ۸۰-۲۰ بصورت تک توانی بود و عمل آشکارسازی در طول موج ۳۳۰ نانومتر و با سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه انجام پذیرفت.

نتایج

به منظور بررسی عملکرد فاز جامد استخراج کننده استویول گلیکوزید و تعیین بهترین شرایط متغیرهای آن ، ابتدا سنجش به روش الکتروشیمی و با استفاده از پلاروگرافی انجام پذیرفت. همانگونه که در شکل ۲ ملاحظه می شود محل سیگنال مربوط به استویوزید استخراج شده توسط پلیمر جاذب استخراج کننده استویوزید MIP در ولتاژ بین ۰/۵ تا ۱ ولت بدست آمده‌اند. در کلیه آنالیزها از یک نوع محلول با غلظت معین جهت افزایش استاندارد و در شرایط برابر استفاده شد.

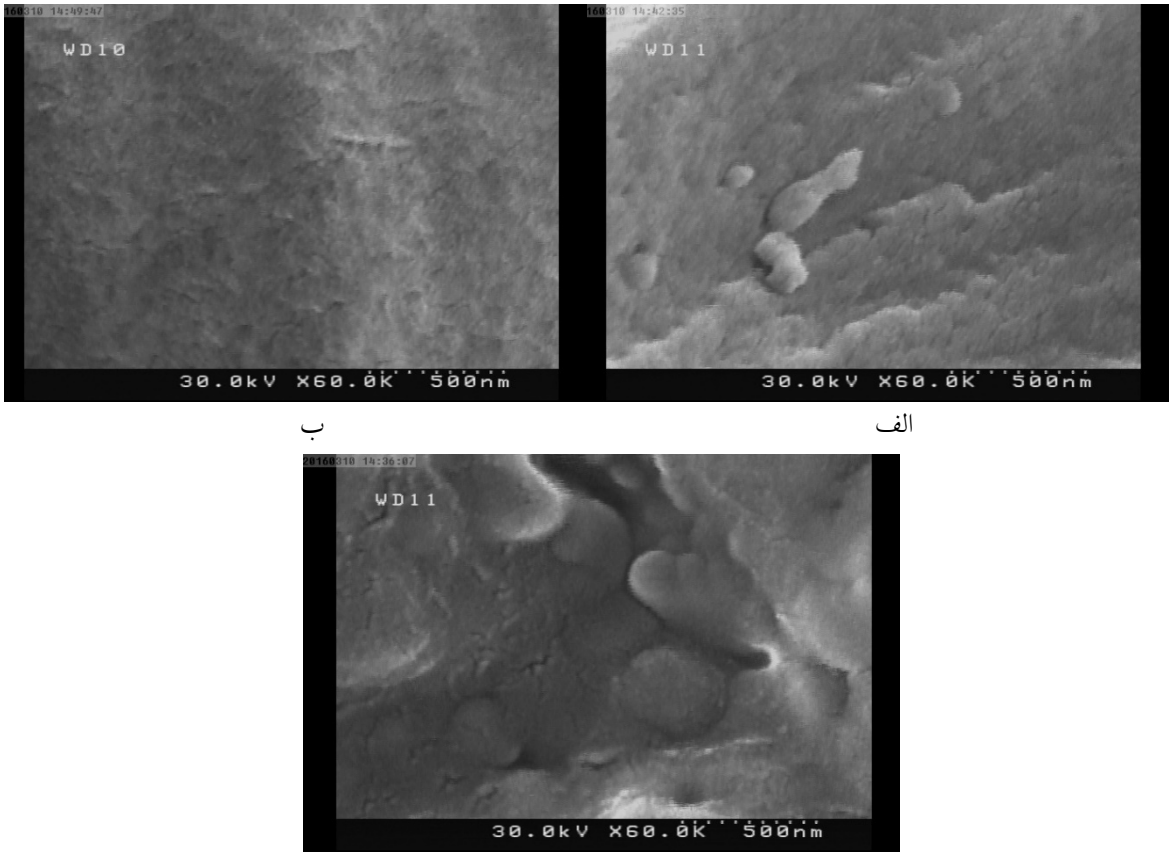


شکل ۲: پلاروگرام نمونه‌های استویوزید استخراج شده توسط فاز جامد قالب مولکولی در شرایط مختلف (دامنه پتانسیل: ۰/۱ تا ۰/۷ ولت)

در این پلاروگرام فوق نمودارهای RF1 الی RF5 عبارتند از: نسبت ۰/۲ مونومر به اتصال‌دهنده عرضی، سایز ذرات ۱۰۰۰ میکرون (RF1)، نسبت ۰/۲ منومر به اتصال‌دهنده عرضی، سایز ذرات ۲۰۰۰ میکرون (RF2)، نسبت ۰/۰۵ منومربه اتصال‌دهنده عرضی، سایز ذرات ۱۰۰۰ میکرون (RF3)، نسبت ۰/۰۵ منومر به اتصال‌دهنده عرضی، سایز ذرات ۲۰۰۰ میکرون (RF4)، نسبت ۰/۴ منومربه اتصال دهنده عرضی،سایز ۱۰۰۰ میکرون (RF5).

نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که بیشترین درصد بازیافت استویوزید با غلظت ۱۰میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان نمونه آزمایشگاهی در نسبت MAA به EGDMA مقدار ۰/۲حاصل شده است. این مقدار بازیافت ۸۰ درصد در بهترین شرایط بدست آمده است. باید خاطر نشان نمود که اغلب در روش‌های استخراج با فاز جامد قالب مولکولی معضل کاستی درصد بازیافت وجود دارد. همچنین تاثیر همزمان دو متغیر (نسبت ترکیب اجزا و اندازه ذرات استخراج کننده) نیز طبق جدول ۱ و شکل ۲ نشان می‌دهد که بهترین درصد بازیافت استویوزید (در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) در نسبت ترکیب MAA/EGDMA برابر با ۰/۲ و اندازه ذرات استخراج کننده قالب

مولکولی برابر با ۱۰۰۰ میکرومتر حاصل می‌شود. همان‌طور که در تصاویر الکترونی شکل ۳ مشاهده می‌شود سایت‌های قالب دار در فاز جامد استخراج کننده استویوزید تهیه شده‌اند.



ب الف

ث

شکل ۳: تصویر میکروسکوپ الکترونی بدست آمده از استخراج کننده قالب مولکولی استویوزیدالف) با نسبت ۰/۴ مونومر به اتصال دهنده عرضی ب) با نسبت ۰/۲ مونومر به اتصال دهنده عرضی پ) نسبت ۰/۰۵ مونومر به اتصال دهنده عرضی

جدول ۱: مقایسه کارایی استخراج کننده استویوزید بر حسب مقادیر درصد بازیافت نسبت‌های مختلف منومر عاملی به اتصال دهنده عرضی در مقابل اندازه ذرات فاز جامد.

ردیف	نسبت وزنی منومر به اتصال دهنده عرضی	درصد بازیافت برای درجه ریزشدگی ۱۰۰۰ میکرون	درصد بازیافت برای درجه ریز شدگی ۲۰۰۰ میکرون
۱	۰,۰۵	(RF3)٪۳۰	(RF4)٪۱۰
۲	۰,۲	(RF1)٪۸۰	(RF2)٪۶۰
۳	۰,۴	(RF5)٪۳۰	٪۲۰

برای اثبات کارایی عمل استخراج کننده، با هدف استخراج استویوزید از عصاره الکلی گیاه استویا به‌عنوان نمونه حقیقی استفاده شد. عصاره هیدروالکلی گیاه استویا پس از رقیق‌سازی و انجام فرایند آماده سازی به دستگاه HPLC تزریق شد.

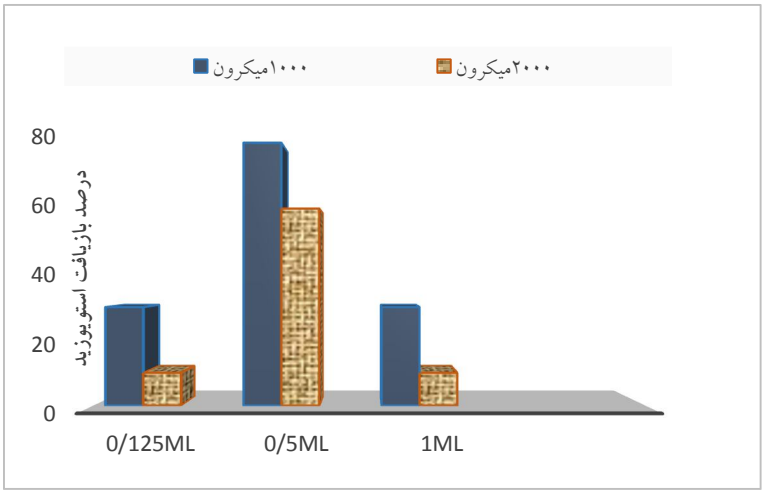
بحث

با توجه به اینکه استویوزید براساس ساختار مولکولی خود (شکل ۱) الکترواکتیو نمی‌باشد (Komorsky et al., 2010). لذا برای فعال کردن آن قبل از آنالیز با دستگاه پلاروگرافی باید تحت شرایط خاص مورد تفکیک مولکولی قرار گیرد. این شرایط در آزمایشگاه تحت اکسایش شدید حاصل می‌شود. ثابت نگهداشتن شرایط آماده‌سازی نمونه‌ها قبل از پلاروگرافی بسیار حساس و تاثیر گذار بر نتایج است. با توجه به محل پیک‌های حاصله که در شکل ۲ نشان داده شده است این مهم به درستی محقق شده است و نشان از صحت و دقت بسیار بالای آزمایشات دارد. با توجه به بررسی‌های صورت گرفته به غیر از تحقیقی که در سال ۲۰۱۰ توسط کومورسکی و همکاران منتشر شده است تاکنون گزارشی مبنی بر اندازه‌گیری استویوزید توسط روش‌های الکتروشیمیایی و از جمله پلاروگرافی پالسی منتشر نشده است و اولین بار است که در این تحقیق استویوزید به کمک روش‌های پیش آماده سازی تحت یونش مولکولی قرار گرفته است.

در این تحقیق جهت سنتز فاز جامد استخراج کننده بر پایه قالب مولکولی از مونومر عاملی MAA و پیوند دهنده عرضی EGDMA در سه نسبت حجمی ۰/۰۵ و ۰/۲ و ۰/۴ استفاده شد. دلیل این کار بدست آوردن بهترین نسبت ترکیب این مواد جهت افزایش کارایی عمل استخراج است. از آنجایی که استخراج کننده‌های قالب مولکولی دارای گزینش پذیری زیاد در فرآیند استخراج هستند لذا افزایش درصد بازیافت آنها در عملیات جداسازی و همچنین فرآیندهای تهیه‌ای بسیار حائز اهمیت است. برای افزایش درصد بازیافت باید بهترین شرایط تهیه قالب ایجاد شود تا از حداکثر فضا و حجم موجود برای افزایش تعداد قالب‌ها بهره ببرد (He et al., 2007). این مهم با رعایت نسبت ترکیب مونومر عاملی به اتصال‌دهنده عرضی که با اهمیت ترین اجزای تشکیل‌دهنده این فاز جامد می‌باشند، به‌دست می‌آید. اگرچه در تحقیقات اخیر در خصوص این نسبت گزارش‌هایی در دست است ولی نوع آنالیت در مقادیر بهینه ترکیب اجزا تفاوت اساسی ایجاد می‌کند (Wang et al., 2017). از آنجایی که استویوزید یک گلیکوزید استویولی است و دارای ساختاری پیچیده و درشت مولکول بوده و به لحاظ استریوشیمی جزو مولکول‌های خاص می‌باشد. لذا کمترین استرس در شرایط قالب زنی این مولکول می‌تواند تاثیرات فوق‌العاده‌ای را در تعداد سایت‌های قالب دار فاز جامد به عنوان جاذب ایجاد کند و اغلب منجر به کاهش تعداد قالب‌ها می‌گردد. بنابراین شرایط تهیه استخراج کننده بدون استرس و تحت دما و فشار معمول و همچنین زمان دادن به تشکیل این جاذب تنها در صورتی می‌تواند موثر واقع شود که نسبت مواد آمیخته شده تا حد ممکن متناسب با استریوشیمی و اندازه مولکول الگو باشد.

در تحقیقات مبتنی بر استخراج چنانچه درصد بازیافت حدود ۶۰ درصد حاصل شود نتیجه مطلوب خواهد بود (Płotka et al., 2016). این درحالی است که در این تحقیق با رعایت بهترین نسبت تا ۸۰ درصد بازیافت به دست آمده است. نمودار شکل۴ نیز بیشترین بازیافت‌ها را در نسبت ۰/۵ میلی‌لیتر متاکریلیک اسید نشان داده است. در سایر نسبتهای اجزای این دو ترکیب تقریباً نتایج یکسان و به مراتب کمتر از مقدار بهینه حاصل شده است. با توجه به نوع واکنش پلیمری شدن که برای تهیه این فاز جامد استخراج کننده صورت می گیرد نسبت مونومر عاملی به اتصال دهنده عرضی بیشتر از مقدار حاصل شده در نمودار مذکور تاثیر چندانی بر تعداد و کارایی قالب‌های تولید شده در این فاز جامد ندارد. یکی دیگر از اهداف این تحقیق بررسی تاثیر اندازه ذرات فاز جامد استخراج کننده بر میزان راندمان استخراج

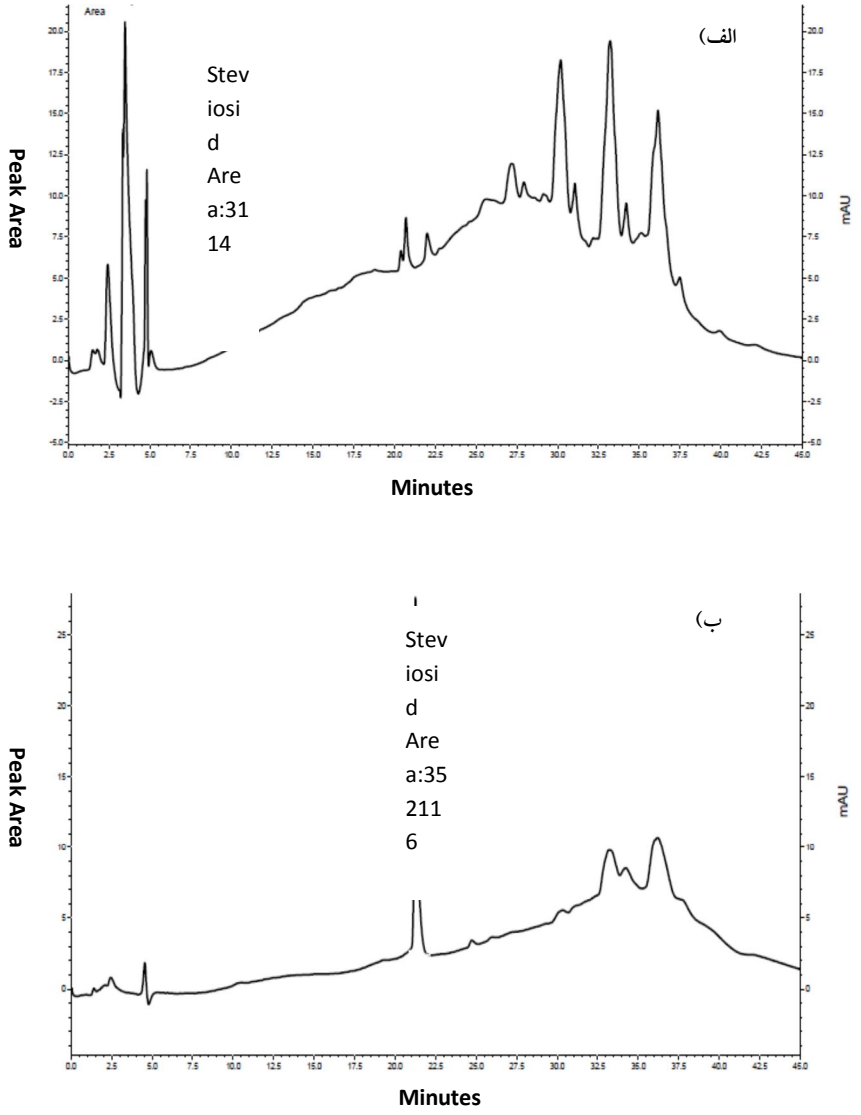
استویوزید بوده است. اندازه ذرات فاز جامد استخراج کننده به‌دلیل تفاوت در سطح جذب می‌تواند بر مقدار آنالیت جذب شده توسط قالب‌ها تاثیر گذارد. شایان ذکر است که هرچقدر سطح جذب استخراج کننده وسیع‌تر باشد سینتیک جذب سطحی افزایش می‌یابد و علاوه بر سرعت استخراج و متعاقب آن کاهش زمان استخراج، درصد بیشتری از قالب‌های تولید شده در فاز جامد مورد استفاده قرار می‌گیرند (Chen et al., 2012). در این تحقیق از دو اندازه متفاوت سایز ذرات فاز جامد ماده استخراج کننده استفاده شد. ذرات با میانگین قطر ۱۰۰۰میکرومتر و ۲۰۰۰ میکرومتر. نتایج بدست آمده نشان می دهد که بیشترین تاثیر بر راندمان استخراج برای فاز جامد با اندازه ۱۰۰۰ میکرون بدست می‌آید. اگرچه نوع آنالیت نیز تاثیر فراوانی بر این متغیر دارد ولی بر اساس تئوری ایزوترم‌های جذب سطحی، می‌توان پیش بینی نمود که هرچقدر ذرات جاذب کوچک‌تر باشند میزان درصد بازیافت نیز بیشتر است (Ya et al., 2001). البته اندازه ذرات کوچک‌تر از میانگین ۱۰۰۰ میکرون در خصوص استویوزید محدودیت‌های عملیاتی در فرآیند جذب و واجذب ایجاد می کند. زیرا با توجه به اینکه یک مرحله آماده‌سازی نمونه استخراج شده قبل از پلاروگرافی هم وجود دارد به همین دلیل و به‌منظور حصول درصد مطلوب بازدهی استخراج، مقادیر اندازه ذرات کوچکتر از ۱۰۰۰ میکرومتر استفاده نشد.



شکل ٤: بررسی مقایسه‌ای میزان درصد بازیافت تغییرات نسبت MAA/EGDMA در مقابل اندازه ذرات استخراج کننده قالب مولکولی استویوزید.

از سوی دیگر استفاده از ذرات بزرگتر از ۲۰۰۰ میکرومتر به دلیل کاهش متوالی سطح جذب کارایی استخراج را به شدت تنزل می‌دهد. شکل شماره ۴ تاثیر همزمان این دو عامل (اندازه ذرات استخراج کننده و نسبت مونومر به اتصال دهنده عرضی) را در یک نمودار نشان می دهد. برای افزایش درصد بازیافت باید بهترین شرایط تهیه قالب ایجاد شود و این امر با رعایت نسبت ترکیب مونومر عاملی به اتصال‌دهنده عرضی که با اهمیت‌ترین اجزای تشکیل‌دهنده این استخراج کننده است میسر می‌گردد (Puri et al., 2013; Yildiz-ozturk et al., 2014).

استویوزید استخراج شده از عصاره برگ گیاه استویا با استفاده از فاز جامد قالب مولکولی و تقویت شده با نانولوله کربنی در نهایت توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت.



شکل ۵: کروماتوگرامHPLC عصاره گیاه استویا که با استفاده فاز جامد استخراج کننده استویوزید.
الف) قبل از استخراج. ب) بعد از استخراج توسط فاز جامد

همانگونه که در شکل ۵ نشان داده شده است استخراج کننده فاز جامد توانسته است تا حدود زیادی بطور انتخابی استویوزید را از بین سایر ترکیبات موجود در عصاره گیاه استویا جداسازی و استخراج نماید. در شکل ۵-الف عصاره هیدروالکلی استویا به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شد و همانگونه که مشخص است در زمان بازداری حدود ۲۱,۵ دقیقه استویوزید خارج شده است. جهت اثبات این امر یک محلول استاندارد استویوزید با غلظت معین به دستگاه کروماتوگرافی در همان شرایط تزریق شد و تنها یک پیک کروماتوگرام در زمان بازداری مذکور پدیدار گشت. در شکل ۵-ب کروماتوگرام حاصل از تزریق محلول استخراج شده استویوزید پس از استخراج با فازجامد قالب مولکولی نشان می دهد که عمل جداسازی با حذف سایر پیکهای کروماتوگرام بصورت گزینش پذیر برای استویوزید

عمل کرده است (Puri et al., 2013). این موضوع به‌دلیل اهمیت در علوم خالص سازی به‌طور گسترده در صنایع دارویی و غذایی مورد استقبال قرار می‌گیرد. با توجه به اینکه هم اکنون در صنایع غذایی بسیاری از کشورهای توسعه یافته استویوزید به‌عنوان شیرین کننده بدون کالری در دستور مصرف یا جایگزینی با شکر گلوکز قرار گرفته است و از طرفی روش‌های معمول استخراج اغلب بر پایه استخراج با حلال است به نظر می‌رسد این روش جدید می‌تواند چشم انداز مطلوبی را برای صنایع مرتبط مصرف کننده این محصول به دنبال داشته باشد. همچنین قابل ذکر است که استفاده از این روش به دلیل عدم استفاده از حلال‌های آلی با شیمی سبز مطابقت داشته و از نظر زیست‌محیطی بسیار کم آلاینده تر نسبت به سایر روش‌های رقیب است. بنابراین استخراج کننده تهیه شده در این تحقیق بر اساس فاز جامد و تکنیک قالب مولکولی که با نانولوله کربنی تقویت شده است قابلیت مناسبی در خالص سازی استویوزید به‌عنوان شیرین کننده بدون کالری در گیاه دارویی استویا دارد. براساس نتایج بدست آمده از تزریق عصاره متانولی برگ گیاه استویا به دستگاه HPLC و انجام محاسبات مربوطه بر اساس رسم منحنی کالیبراسیون استاندارد، و همچنین محاسبه آن در مقدار اولیه وزن گیاه اولیه به کار رفته در انجام این تحقیق مقداردرصد استویوزید بدست آمده در گیاه معادل ۱۱/۱۶ درصد به‌دست آمد (Anvari and Khayati. 2016).

نتیجه‌گیری نهایی

تحقیق حاضر مبتنی بر ایجاد و بهینه سازی فرآیند جدید استخراج استویوزید از گیاه استویا به عنوان یک ترکیب بسیار ارزشمند در صنایع نوین داروسازی و غذایی است که بر پایه تشکیل فاز جامد قالب مولکولی استوار می باشد. استفاده از فاز جامد استخراج کننده با استفاده از تکنیک قالب مولکولی برای اولین بار است که در استخراج استویوزید بکار می‌رود و تا کنون گزارش علمی در این خصوص منتشر نشده است. این تحقیق نشان داد استخراج و پیش تغلیظ استویوزید بر اساس فاز جامد قالب مولکولی به آسانی امکان پذیر است. همچنین نتایج حاکی از تاثیر اندازه ذرات ریزتر فاز استخراج کننده بر راندمان استخراج می‌باشد. رعایت نسبت ترکیب اجزای تشکیل دهنده در فاز جامد توانست تاثیر چشمگیری بر میزان درصد بازیافت استویوزید بگذارد. همچنین قابل ذکر است که این تحقیق نشان داده شد که در اندازه گیری استویوزید امکان به‌کارگیری روش‌هایالکتروشیمیایی مانندپلاروگرافی نیز وجود دارد و با انجام عملیات پیش‌آماده سازی نمونه، قبل از پلارو گرافی این امر به خوبی قابل انجام است. اندازه‌گیری استویوزید حاصل از استخراج به روش پیشنهادی در این تحقیق از عصاره گیاه استویا نشان داد که مقدار به دست آمده با آنچه که در گیاه انتظار می رفت و در گزارش‌های علمی به آن اشاره شده است تا حدود زیادی قابل مقایسه است. چنانچه این روش بهبود و توسعه بیشتری یابد امکان به‌کارگیری آن برای بسیاری از ترکیبات موثره گیاهی پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب سپاس صمیمانه خود از دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان به جهت در اختیار گذاردن امکانات و تجهیزات لازم و همچنین شرکت داروسازی گیاه اسانس به جهت تامین برخی مواد اولیه را دارند.

References

1. Anvari, M. and Khayati, G. 2016. Separation and purification of rebaudioside A from extract of *Stevia Rebaudiana* leaves by macroporous adsorption resins. Chemical Technology, 18: 127-132.
2. Abolghasembeyk, T., Shahriari, S., Salehifar, M. 2016. Extraction of stevioside using aqueous two-phase systems formed by choline chloride and K 3 PO 4. Food and Bioproducts Processing, 102:107-115.
3. Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V., Cerdà, V. 2016. Solid-phase extraction of organic compounds: a critical review (part I). TrAC Trends in Analytical Chemistry, 80: 641-654.
4. Ashley, J., Shahbazi, M.A., Kant, K., Chidambara, V.A., Wolff, A., Bang, D. D., Sun, Y. 2017. Molecularly imprinted polymers for sample preparation and biosensing in food analysis: Progress and Perspectives. Biosensors and Bioelectronics, 91: 606-615.
5. Atteh, J.O., Onagbesan, O.M, Tona, K., Decuypere, E., Geuns, J.M et al 2007. Evaluation of supplementary *stevia* (*stevia rebaudiana* Bertoni) leave and stevioside in broiler diets: effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters and growth performance. Anim. Physiol. Anim. Nutr., 92:640-649.
6. Brandle, J.E. and Telmar, P.G. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. Phytochemistry, 68:1855-1863.
7. Chen, X., Zhang, Z., Yang, X., Li, J., Liu, Y., Chen, H., Yao, S. 2012. Molecularly imprinted polymers based on multi-walled carbon nano tubes for selective solid-phase extraction of oleanolic acid from the roots of kiwi fruit samples. Talanta, 99: 959-965.
8. Deshmukh, S. R and Kedari, V. R. 2014. Isolation, purification and characterization of sweetners from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) for their anti cancerous activity against colon cancer. Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 3:1394-1410.
9. Erkuk, K., Akgun, I.H., Yesil-Celiktas, O. 2009. Supercritical co_2 extraction of glycosides and optimization. Supercritical Fluids, 51:29-35.
10. Ebarvia, B.S., Binag, C.A. and sevilla, F. 2004. Biomimetic piezoelectric quartz sensor for caffeine based on a molecularly imprinted polymer. Analyticaland Bioanaytical chemistry, 378: 1331-1337
11. Fuh, W.Sh. and Chiang, B.H. 1990. Purification of steviosides by membrane and ion exchange processes. Food Science.55:1454-1457
12. Gama, M.R and Bottoli, C.B.G. 2016. Molecularly imprinted polymers for bioanalytical sample preparation. Chromatography B.1043:107-121
13. Gardana, C., Simonetti, P., Canzi, E., Zanchi, R., Pietta, P. 2003. Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *stevia rebaudiana* extracts by human microflora..AgriFood Chem, 51:6618-6622.
14. He, C., Long, Y., Pan, J., Li, K., Liu, F. 2007. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. Biochemical and Biophysical Methods, 70: 133-150.
15. Komorsky-Lovric, S., Novak, I., Novak, B. 2010. Measurement of stevioside by square-wave polarography. Electroanalysis, 22(19): 2211-2215.
16. Lorenzo, C., Serrano, Dlaz J., Plaza, M., Quintanilla, C. 2014. Fast methodology of analyzing major steviol glycosides from *stevia rebaudiana* leaves. Food Chem. 157: 518-523.
17. Ma, Ya., Shen, X. L., Zeng, Q., Wang, H.S., Wang, L.S. 2017. A multi-walled carbon nanotubes based molecularly imprinted polymers electrochemical sensor for the sensitive determination of HIV-p24. Talanta, 164:121-127.
18. Mondase, R.L., Antonio, V.G., Liliana, Z.B., Kong, A.H-Hen. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni,source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chemistry, 132: 1121-1132.

19. Pol, J., Hohnova,B.and Hyotylainen, T. 2007. Characterisation of *stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. Chroma, 1150: 85-92.
20. Pol, J., Varadova Ostra, E., Karasek, P., Roth, M., Benesova K et al 2007. Comparison of two different solvents employed for pressurized fluid extraction of stevioside from *stevia rebaudiana*: methanol versus water. Anal Bioanal. Chem., 388:1847-1857
21. Puri, M., Sharma, D., Barrow, C.J., Tiwary, A.K 2013. Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *stevia rebaudiana* leaves. Food Chem, 132:1113-1120.
22. Płotka-Wasylka, J., Szczepańska, N., de la Guardia, M., Namieśnik, J. 2016. Modern trends in solid phase extraction: new sorbent media. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 77: 23-43.
23. Quaglia, M., De lorenzi, E., Sulitzkyc., Massolini, G., Sellergren, B. 2001. Surface initiated molecularly imprinted polymer films: a new approach in chiral capillary electromatography. Analyst, 126:1495-1498.
24. Striedner, J., Czygan, F.C., Braunegg, G. 1991. Contributions to the biotechnological production of sweeteners from *stevia rebaudiana* Bertoni. A method for the serials Analysis of diterpene glycosides by HPLC. Acta Biotechnol, 11:495-499.
25. Teo, C.C., Tan, S.N., Hong Yong, J.W., Hew, C.S. 2009. Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of *stevia rebaudiana* bertoni. Separation Science, 32:613-622.
26. Tianwei, T., Xiaojing, H., Weixia, D.2001. Adsorption behaviour model of metal ion on imprinting chitosan resin. Chem. Technol. Biotechnol., 76:191-195
27. Wang, H., Yao, S., Liu, Y., Wei, S., Su, J., Hu, G. 2017. Molecularly imprinted electrochemical sensor based on Au nano particles in carboxylated multi-walled carbon nano tubes for sensitive determination of olaquindox in food and feedstuffs. Biosensors and Bioelectronics, 87: 417-421.
28. Weiss, R., Molinelli, A., Jakusch, M., Mizaikoff, B. 2001. Molecular imprinting and solid phase extraction of flavonoid aomponds.Bioseparation,10: 379-87.
29. Wuff, G., and sarhan, A. 1972. The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemate. Angewandte chemie International Edition, 11: 341-345.
30. Yildiz-ozturk, E., Nalbantsoy, A., Tag, O., Yesil-Celiktas, O. 2015. A comparative study on extraction processes of *Stevia rebaudiana* leaves with emphasis on antioxidant, cytotoxic and nitricoxide inhibition activities. Industrial Crops and Products, 77: 961-971.
31. Ye, L. and Mosbach, K. 2001. Molecularly imprinted microspheres as antibody binding mimics. Reactive and Functional Polymers, 48: 149-157.
32. Yildiz-ozturk, E., Tag, O., Yesil-Celiktas, O. 2014. Subcritical water extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves and characterization of the raffinate phase. Supercritical Fluids, 95:422-430.

Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 5th Year, Volume Two, Summer 2017

Quantitative and qualitative extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana* Bertoni. using solid phase molecularly imprinted technique

Aghabeik, S.[1], Ahmadi Golsefidi, M.[2*], Soleimani, M.H.[3]

[1,2]Department of Chemistry, Faculty of Science, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran
[3]Essential Oil Pharmacy, Gorgan, Iran

Received: 27-1-2017 ; Accepted: 9-5-2017

Abstract

Stevia rebaudiana Bertoni. with non-calorie steviol glycoside is an effective drug to decrease of blood glucose in treat of diabetics. The goal of this study is obtaining of a novel method in order to a quantitative and qualitative extraction of stevioside as a non-calorie sweetener from *Stevia*. In this study the dry leaves of *Stevia* was prepared from Golsaran Shomal company and then in order to extraction of stevioside a solid phase molecularly imprinted extractor was prepared and some parameters affective on extraction of stevioside were optimized. An acrylate functional monomer and a cross linker were used to preparation of stevioside extractor polymer. Functional monomer to cross linker ratio and size and fining degree of the extractor were studied and evaluated. In this study analysis of the stevioside beside of HPLC was accrued by polarography method .The best ratio of functional monomer to cross linker was obtained in 0.2, also the best polymer particle size was obtained in 1000 micron for extraction of stevioside by the extractor and the amount of stevioside was determined 11.6% w/w in this plant.

Keywords: Molecularly imprinted, Polarography, Solid phase, *Stevia rebaudiana* Bertoni, *stevioside*