

مقایسه روش‌های مختلف عصاره‌گیری در استخراج ترکیبات مؤثره گیاه سنا

نورا عنایتی^۱، رضا غفارزادگان^{۱،۲}، رضا حاجی‌آقایی^۲، مهدی وزیریان^{۳*}

- ۱- کارشناس ارشد مهندسی داروسازی، پردیس البرز، دانشگاه تهران، کرج، ایران
 - ۲- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج، ایران
 - ۳- استادیار، گروه فارماکونوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
- * آدرس مکاتبه: تهران، خیابان انقلاب، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، گروه فارماکونوزی
 تلفن و نمابر: ۶۶۴۸۲۶۰۹ (۰۲۱)
 پست الکترونیک: vazirian_m@sina.tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۲۹

تاریخ تصویب: ۹۶/۳/۳۱

چکیده

مقدمه: برگ سنا از دسته‌ی ملین‌های محرک است، خاصیت ملین بودن این گیاه دارویی به سنوزیدها، آلوئه امودین و دیانترون موجود در آن برمی‌گردد که همگی از مشتقات آنتراکینون می‌باشند و برای معالجه‌ی یبوست، تخلیه‌ی روده قبل از جراحی و یا اعمال و آزمایش‌های ویژه‌ی ناحیه‌ی شکم، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

هدف: این مطالعه با هدف مقایسه‌ی روش‌های مختلف عصاره‌گیری از گیاه سنا و بهینه‌سازی استخراج ماده‌ی مؤثره‌ی سنوزید B با استفاده از روش آماری سطح پاسخ انجام شده است.

روش بررسی: برای استخراج عصاره گیاه سنا، روش‌های مختلف عصاره‌گیری شامل خیساندن، خیساندن با هم زدن، استفاده از امواج فراصوت، استفاده از امواج مایکروویو و سوکسله با دو نوع حلال اتانول ۹۶ و ۶۰ درجه و در زمان‌های مختلف به کار برده شدند. بهترین روش با در نظر گرفتن میانگین وزن عصاره و ماده مؤثره‌ی سنوزید B و استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه انتخاب شد. در مرحله بعد با استفاده از روش آماری سطح پاسخ به بهینه‌سازی مقدار ماده‌ی مؤثره‌ی سنوزید B پرداخته شده است.

نتایج: نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که با در نظر گرفتن میانگین وزن عصاره استحصال شده و مقدار سنوزید B، روش خیساندن با هم زدن به عنوان مناسب‌ترین شیوه عصاره‌گیری از گیاه سنا می‌تواند در استخراج صنعتی و دارویی مطرح باشد. نتایج بهینه‌سازی نشان می‌دهد که بیشترین مقدار ماده مؤثره (۳/۰۰۹ درصد) زمانی اتفاق می‌افتد که دما برابر ۸۴، زمان ۱۱۹/۷ دقیقه، نسبت ماده به حلال برابر با ۰/۰۴ و اندازه صافی برابر با ۲۹/۷ میکرون باشد.

نتیجه‌گیری: در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از روش عصاره‌گیری خیساندن با هم زدن به عنوان یکی از بهترین روش‌های جداسازی عصاره گیاه سنا در صنعت مطرح بوده و بازده خروجی ماده مؤثره سنوزید B تحت تأثیر شرایط بهینه معرفی شده در بیشترین مقدار خود خواهد بود.

کل واژگان: گیاه سنا، خیساندن با هم زدن، سنوزید B، روش سطح پاسخ، عصاره‌گیری



مقدمه

علیرغم پیشرفت‌های عظیم در تولید داروهای بسیار مؤثر شیمیایی، داروهای گیاهی همچنان جایگاه خود را به عنوان ترکیباتی اثربخش در درمان بیماری‌ها حفظ نموده‌اند. به طوری که به گزارش سازمان جهانی بهداشت امروزه بیش از ۸۰ درصد مردم جهان هنوز هم برای درمان امراض خود از ترکیبات گیاهی استفاده می‌کنند. تقریباً یک چهارم داروهای جهان یا مستقیماً از گیاهان عصاره‌گیری شده‌اند و یا از ترکیبات گیاهی در ساخت آنها استفاده می‌شود [۱].

گیاهان جنس سنا از جمله گیاهان دارویی معمول در بسیاری از کشورها می‌باشد. گیاهان این جنس یک ساله و به صورت بوته‌ای بوده و در نواحی گرمسیری رشد می‌نمایند. این گیاهان در اطراف رودخانه‌ها، نواحی ساحلی دریا و دیگر مناطق مرطوب و در ارتفاع بین ۱۰۰۰ تا ۱۴۰۰ متر معمولاً رشد می‌کنند [۱]. دو گونه از سنا که در داروهای گیاهی به عنوان منبع اصلی مورد کاربرد دارند عبارتند از *Cassia angustifolia* و *Cassia acutifolia*. امروز گیاه شناسان هر دوی این گونه‌ها را به عنوان یک گونه و با نام *Senna alexandrina* Mill. نام گذاری نموده‌اند [۲]. از اسامی دیگر این گیاه می‌توان به *senna Tinnerelly*, *Egyptian senna*، *East indian senna* اشاره نمود. این گیاه به صورت بوته‌ای با ارتفاع حدود ۱ متر و به ندرت تا ۲ متر می‌باشد. ساقه گیاه به صورت راست و سبز کم‌رنگ بوده و در انتهای آن ۴ تا ۵ جفت برگ وجود دارد. این برگ‌ها به صورت متقابل، جفت و نازک بوده و لبه‌های آنها به صورت کامل و نوک‌تیز می‌باشند. گل‌ها به رنگ زرد متمایل به قهوه‌ای و بزرگ هستند. میوه لوبیایی شکل، مستطیلی، فشرده و صاف بوده و حاوی ۶ عدد دانه می‌باشد [۳]. این گیاه حاوی ترکیبات ثانویه شامل آنتراکینون‌ها، فلاونوئیدها، پلی‌ساکاریدها و موسیلاژ می‌باشد. مهم‌ترین ترکیبات آنتراکینونی آن شامل رینن، امودین، اوبتوسین و سنوزیدهای A و B می‌باشد [۱]. برگ‌ها و غلاف این گیاه به عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گیرد یکی از مهم‌ترین اثرات این گیاهان مسهل و ملین بودن آن به دلیل وجود آنتراکینون‌های موجود در آن می‌باشد [۳]. از جمله اثرات

فارماکولوژی که به این گیاه نسبت داده می‌شود شامل: اثرات حفاظت کبدی، کاهش قند خون، ضدالتهاب، ضدباکتری و آنتی‌اکسیدان می‌باشد [۱].

گیاهان دارویی حاوی ترکیبات ثانویه وسیعی هستند که اغلب دارای فعالیت زیستی مهمی هستند و از آنجایی که عصاره‌های گیاهی به طور وسیعی در صنایع دارویی، غذایی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرند، فناوری‌های عصاره‌گیری مورد ارزیابی قرار گرفته تا بتوانند این ترکیبات فعال را از منابع گیاهی استخراج نمایند. روش‌های سنتی مانند روش خیساندن که سال‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفته است، بسیار زمان‌بر بوده و مقدار زیادی حلال مصرف می‌کند [۴]. اولین مرحله‌ی کلیدی در استخراج ترکیبات مؤثره از یک گیاه نحوه‌ی عصاره‌گیری از آن است. چراکه نوع ترکیب استخراج شده، کیفیت و کمیت آن به شدت تحت تأثیر اندام گیاهی و سیستم‌های حلالی انتخاب شده قرار دارد. در نتیجه باید گفت انتخاب روش مناسب عصاره‌گیری می‌تواند کارایی استخراج مواد مؤثره موجود در گیاه را به طور چشمگیری افزایش دهد [۵].

به همین دلیل، تقاضای زیادی برای روش‌های عصاره‌گیری جدید با زمان کوتاه‌تر، میزان مصرف حلال کمتر و محافظ محیط زیست وجود دارد. روش‌های جدید عصاره‌گیری مانند عصاره‌گیری همراه با امواج فراصوت [۶]، عصاره‌گیری همراه با امواج مایکروویو [۷] و عصاره‌گیری همراه با مایع فوق بحرانی [۸-۱۰] برای استخراج ترکیب‌هایی از گیاهان بسیار سریع و مؤثر عمل می‌کنند. در سال‌های اخیر این روش‌های جدید، پیشرفت زیادی داشته‌اند و برخی موارد استفاده از آنها در استخراج مواد گیاهی گزارش شده‌اند. بهینه‌سازی فرآیند و رسیدن به شرایط مطلوب توسط روش‌های طراحی آزمایش انجام می‌شود که برای رسیدن به این هدف از روش‌های سطح پاسخ آماری آزمایش‌ها استفاده می‌شود. به عبارتی در روش سطح پاسخ، مجموعه‌ای از روش‌های آماری و ریاضی برای مدل‌سازی و آنالیز مسائلی استفاده می‌شود که پاسخ مطلوب آن تحت تأثیر چند متغیر است و هدف ما بهینه‌سازی آن پاسخ می‌باشد [۱۱]. با توجه به نبود مطالعاتی در زمینه بهینه‌سازی روش استخراج ترکیبات مؤثره‌ی این گیاه و با توجه به اثرات



بهترین حلال برای استخراج سنوزیدها را اتانول ۶۰ درجه بیان کرده بودند، برای استخراج انتخاب شد تا تأثیر میزان قطبیت بر عصاره‌گیری تعیین شود.

۵. برای روش خیساندن از دکانتورهای یک لیتری هم اندازه و برای روش‌های بعدی از بشرها یا ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر همسان استفاده شد.

بر اساس موارد ذکر شده در بالا، ۱۲ روش استخراج مختلف تنظیم و به مرحله اجرا گذاشته شد:

۱. خیساندن (۱): ۲۴ ساعت ۱۰ گرم + ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه
 ۲. خیساندن (۲): ۴۸ ساعت ۱۰ گرم + ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه
 ۳. خیساندن (۳): ۲۴ ساعت ۱۰ گرم + ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۶۰ درجه
 ۴. خیساندن (۴): ۴۸ ساعت ۱۰ گرم + ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۶۰ درجه
 ۵. خیساندن با هم زدن: ۳۰ دقیقه + ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه
 ۶. خیساندن با هم زدن: ۳۰ دقیقه + ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۶۰ درجه
 ۷. امواج فراصوت: ۳۰ دقیقه - ۱۰ گرم + ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه
 ۸. امواج فراصوت: ۳۰ دقیقه - ۱۰ گرم + ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۶۰ درجه
 ۹. مایکروویو: ۳۰ دقیقه - ۱۰ گرم + ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه
 ۱۰. مایکروویو: ۳۰ دقیقه - ۱۰ گرم + ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۶۰ درجه
 ۱۱. سوکسله: ۳۰ دقیقه - ۱۰ گرم + ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه
 ۱۲. سوکسله: ۳۰ دقیقه - ۱۰ گرم + ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۶۰ درجه
- روش کار برای آزمایش‌های طراحی شده ذکر شده در بالا بر اساس فارماکوپه گیاهان دارویی بوده و جزئیات آن قبلاً

درمانی ارزشمند آن، در این مطالعه نشان داده خواهد شد که از میان روش‌های مورد بررسی (شامل سوکسله به عنوان *gold standard*، خیساندن، خیساندن همراه هم‌زدن، استفاده از امواج فراصوت و یا امواج مایکروویو)، با توجه به عوامل زمان و میزان بازده استخراج، چه روش یا روش‌هایی در استخراج بهینه مواد مؤثره دارویی گیاه سنا کاراتر می‌باشند.

روش بررسی

در راستای انجام این پژوهش، برگ‌های گیاه *Senna alexandrina* از بازار دارویی تهران تهیه شد و پس از تأیید گونه در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، کد ۱۲۲۸۰۳۵۳۸۸ به آن تعلق گرفت. این مطالعه در دو فاز جداگانه انجام شده است. مرحله اول شامل مقایسه روش‌های مختلف عصاره‌گیری شامل خیساندن، خیساندن با هم زدن، استفاده از امواج فراصوت، استفاده از امواج مایکروویو و سوکسله بر اساس وزن عصاره به دست آمده بوده است. در مرحله دوم به بهینه‌سازی مقدار ماده مؤثره سنوزید B به روش SRM (Response Surface method) برای بهترین روش عصاره‌گیری پرداخته شده است. به منظور مقایسه روش‌های مختلف عصاره‌گیری و با در نظر گرفتن شرایط ثابت آزمایشگاهی برای همه روش‌های مورد مقایسه، ابتدا ۱۵۰ گرم گیاه خشک شده‌ی سنا در آسیاب ریخته شده و به پودر تبدیل می‌شود. در مرحله بعد پودر حاصل از صافی عبور داده می‌شود.

بخش کلی کار برای روش‌های مختلف عصاره‌گیری در زیر ذکر شده است:

۱. برای تمامی نمونه‌ها، زمان ثابت در نظر گرفته می‌شود (غیر از روش خیساندن)
۲. پودر گیاه سنا، از صافی ثابتی رد می‌شود.
۳. مقدار ۱۰ گرم از پودر به دست آمده با ترازوی حساس تا ۴ رقم اعشار برای همه روش‌ها توزین می‌شود.
۴. حلال رایج عصاره‌گیری در صنعت داروسازی برای استخراج از گیاهان دارویی یعنی اتانول، با دو محدوده مختلف (۹۶ و ۶۰ درجه در آب مقطر)، با توجه به مطالعات گذشته که



مدت ۱۰ دقیقه روی بنماری قرار گرفت. سپس به آن ۱ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک غلیظ افزوده شده و مجدداً ۱۵ دقیقه حرارت داده شد. پس از خنک شدن، ۳ بار، هر بار با ۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم استخراج انجام شد. سپس لایه کلروفرمی را ۲ بار با ۱۵ میلی‌لیتر آب شسته و لایه آبی دور ریخته شد. سپس لایه کلروفرمی با کلروفرم به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شده و ۱۰ میلی‌لیتر از محلول روی بنماری خشک شد. پس از خنک شدن در ۱۰ میلی‌لیتر استات منیزیم (۰/۵ درصد در متانول) حل شده و میزان جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این آزمایش استات منیزیم در متانول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

$$m = (A \times 25) / 1 = \text{درصد سنوزید}$$

A: میزان جذب

m: وزن اولیه عصاره بر حسب گرم

بهینه‌سازی بازده استخراج سنوزید B با استفاده از روش

سطح پاسخ

با توجه به اینکه هدف مطالعه در مرحله اول تعیین بهترین روش عصاره‌گیری در شرایط ثابت آزمایشگاهی با توجه به دو ویژگی وزن عصاره و درصد سنوزید به دست آمده بوده است، در مرحله دوم به بهینه‌سازی بهترین روش عصاره‌گیری با استفاده از مدل آماری سطح پاسخ پرداخته شد. روش سطح پاسخ یکی از روش‌های بهینه‌سازی می‌باشد که با استفاده از مجموعه روش‌های ریاضی و آماری، مسائل مربوط به بهینه‌سازی یک فرآیند را مدل‌سازی نموده و نه تنها باعث کاهش هزینه‌های شبیه‌سازی می‌شود، بلکه روند طبیعی بهینه‌سازی فرآیند را (که غالباً غیرخطی است)، پیش‌بینی می‌کند. متغیرهای مورد بررسی در این مطالعه اندازه Mesh، زمان استخراج، دمای استخراج، نسبت نمونه به حلال بوده‌اند. بر اساس مطالعات انجام شده این موارد بیشترین تأثیر را بر فرآیند بهینه‌سازی استخراج داشته و از طرف دیگر قابلیت کنترل آنها توسط محقق وجود دارد. با توجه به اینکه پاسخ فرآیند به متغیرها، به صورت منحنی پیش‌بینی می‌شود، در این مطالعه از روش طراحی مرکب مرکزی (Central composite design)

منتشر شده است [۱۱]. با توجه به اهمیت روش خیساندن با هم‌زدن در این پژوهش، این روش در زیر شرح داده شده است.

استخراج عصاره گیاه سنا به روش خیساندن با هم‌زدن

برای انجام این آزمایش به ۱۰ گرم پودر سنا، ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه اضافه شده و بوسیله دستگاه همزن با سرعت چرخش rpm ۵۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد. اضافه کردن آهن‌ربا باعث ایجاد شدن یک میدان مغناطیسی در بشرها می‌شود (امواج الکترومغناطیس). بعد از گذشت نیم ساعت هر دو بشر از روی همزن برداشته شده و مایع حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد. صافی با ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه شست و شو داده شده و در زیر هود خشک شد. تعیین زمان خشک شدن با استفاده از توزین وزن بشر و ثابت ماندن آن در دو روز متوالی مشخص شد.

تعیین مقدار سنوزید B در عصاره‌ها

برای تعیین مقدار سنوزید B که از ترکیبات مؤثره اصلی گیاه سنا می‌باشد و در اغلب فارماکوپه‌ها به عنوان ماده مورد سنجش برای ارزیابی گیاه و عصاره آن استفاده می‌شود، از روش ذکر شده در British Pharmacopoeia استفاده شد. بدین‌منظور ابتدا در یک ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری، به ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره گیاه سنا (اندازه‌گیری با ترازوی با دقت ۴ رقم اعشار)، ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شده و ارلن و محتویات آن وزن شد. سپس ۱۵ دقیقه روی بنماری در حال جوش حرارت داده، بعد از سرد شدن مجدداً وزن شد و با آب به وزن اولیه رسانده شد. سپس سانتریفیوژ با دور rpm ۴۰۰۰، به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. ۲۰ میلی‌لیتر از محلول به قیف جداکننده منتقل و ۰/۱ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک رقیق به محلول اضافه شد. سپس سه بار هر بار با ۱۵ میلی‌لیتر کلروفرم استخراج انجام شده و لایه کلروفرمی دور ریخته شد.

به لایه آبی ۱۰۰ میلی‌گرم بی‌کربنات سدیم اضافه شد، به مدت ۳ دقیقه تکان داده و سپس سانتریفیوژ با دور rpm ۴۰۰۰ و به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. به ۱۰ میلی‌لیتر از محلول حاصل، ۲۰ میلی‌لیتر کلرور فریک ۱۰ درصد اضافه شد و به



استفاده شده است. این روش نسبت به سایر روش‌ها دارای تعداد آزمایش کمتری بوده و متغیرها را به صورت ۵ سطحی در نظر گرفته و باعث افزایش دقت پیش‌بینی‌ها می‌شود.

نتایج

در این مرحله از مطالعه، روش‌های عصاره‌گیری خیساندن، خیساندن با هم زدن، امواج فراصوت، امواج ماکروویو، سوکسله در شرایط یکسان آزمایشگاهی و برای ۱۰ گرم پودر خشک شده‌ی گیاه سنا به کاربرده شدند. شرایط یکسان شامل زمان ثابت (۳۰ دقیقه برای همه به غیر از خیساندن)، ۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره و اندازه صافی ثابت ۳۰ بود. لازم به ذکر است از دو حلال اتانول ۶۰ و ۹۶ درجه برای همه روش‌ها نیز استفاده شده است.

عصاره‌گیری

نتایج به روش‌های ذکر شده بالا در جدول شماره ۱ گزارش شده است.

نتایج جدول شماره ۱ نشان می‌دهد که بهترین روش با توجه به معیار میزان استخراج ماده‌ی مؤثره‌ی سنوزید B، استفاده از روش خیساندن با هم زدن توسط حلال اتانول ۹۶

درجه خواهد بود. بنابراین این روش به عنوان بهترین روش عصاره‌گیری انتخاب و در مرحله دوم مطالعه توسط روش آماری سطح پاسخ بهینه‌سازی شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد، با وجود اینکه حلال اتانول ۶۰ درجه در همه‌ی روش‌ها به جز روش سوکسله عصاره‌ی بیشتری را حاصل کرده اما میزان سنوزید این عصاره‌ها کمتر بوده است. همچنین نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه برای مقایسه میانگین درصد سنوزید نشان می‌دهد که در مجموع بین روش‌های استخراج اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد (0/001 < F=1092, P value). در مرحله بعد، آنالیز متعاقب توکی نشان داد که بین روش‌های خیساندن ۲۴ ساعته با اتانول ۹۶ درجه، خیساندن ۲۴ ساعته با اتانول ۶۰ درجه، خیساندن ۴۸ ساعته با اتانول ۶۰ درجه، امواج مایکروویو ۳۰ دقیقه‌ای با اتانول ۶۰ درجه، اختلاف معناداری وجود ندارد. همچنین این آنالیز نشان داد که روش عصاره‌گیری خیساندن با هم زدن به مدت ۳۰ دقیقه‌ای با اتانول ۹۶ درجه، با تمام روش‌های عصاره‌گیری ذکر شده در مطالعه اختلاف معنی‌دار آماری دارد (P=0/04). همچنین بین روش‌های امواج فراصوت ۳۰ دقیقه‌ای با اتانول ۹۶ درجه و سوکسله ۳۰ دقیقه‌ای با اتانول ۶۰ درجه، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول شماره ۱- نتایج و مقایسه روش‌های مختلف عصاره‌گیری ذکر شده در مطالعه

| P value | میزان سنوزید (mg) | میانگین درصد سنوزید B | وزن عصاره به گرم (Mean±SD) | حلال | زمان | روش عصاره‌گیری |
|---------|-------------------|-----------------------|----------------------------|------------|----------|-------------------|
| | ۹۷۰ | ۰/۴۹ | ۱/۹۸±۰/۲۱ | اتانول ۹۶° | ۲۴ ساعته | خیساندن |
| | ۱۴۰۰ | ۰/۶۷ | ۲/۰۹±۰/۳ | اتانول ۹۶° | ۴۸ ساعته | خیساندن |
| | ۱۵۹۱ | ۰/۴۱ | ۳/۸۸±۰/۶ | اتانول ۶۰° | ۲۴ ساعته | خیساندن |
| | ۱۴۴۴ | ۰/۴۰ | ۳/۶۱±۰/۵ | اتانول ۶۰° | ۴۸ ساعته | خیساندن |
| | ۳۱۹۴ | ۱/۳۲ | ۲/۴۲±۰/۱ | اتانول ۹۶° | ۳۰ دقیقه | خیساندن با هم زدن |
| ۰/۰۰۲ | ۲۲۳۲ | ۰/۷۲ | ۳/۱±۰/۶ | اتانول ۶۰° | ۳۰ دقیقه | خیساندن با هم زدن |
| | ۲۹۳۱ | ۱/۲۸ | ۲/۲۹±۰/۳ | اتانول ۹۶° | ۳۰ دقیقه | امواج فراصوت |
| | ۱۹۰۴ | ۰/۵۶ | ۳/۴±۰/۵ | اتانول ۶۰° | ۳۰ دقیقه | امواج فراصوت |
| | ۱۶۶۳ | ۰/۶۳ | ۲/۶۴±۰/۴ | اتانول ۹۶° | ۳۰ دقیقه | امواج مایکروویو |
| | ۱۱۱۱ | ۰/۳۴ | ۳/۲۷±۰/۶ | اتانول ۶۰° | ۳۰ دقیقه | امواج مایکروویو |
| | ۹۹۷ | ۰/۵۹ | ۱/۶۹±۰/۲۳ | اتانول ۹۶° | ۳۰ دقیقه | سوکسله |
| | ۱۶۵۱ | ۱/۲۹ | ۱/۲۸±۰/۲ | اتانول ۶۰° | ۳۰ دقیقه | سوکسله |



دما (۲۲ درجه سانتی‌گراد و ۹۰ درجه سانتی‌گراد)، اندازه صافی (۱۰ تا ۳۰ میکرون) و نسبت ماده به حلال (۰/۴ تا ۰/۱) انجام و نتایج در جدول شماره ۲ گزارش شده است.

طراحی آزمایش‌های انجام شده بر اساس طرح مرکب مرکزی بعد از مرحله طراحی آزمایش‌ها، کلیه آزمایش‌ها با در نظر گرفتن کمینه و بیشینه فاکتورهای زمان (۵ دقیقه و ۱۲۰ دقیقه)،

جدول شماره ۲- نتایج آزمایش‌های مربوط به تعیین مقدار سنوزید B در عصاره گیاه سنا

| Run | دما | زمان | اندازه ذرات | نسبت حلال | میزان سنوزید B |
|-----|-----|------|-------------|-----------|----------------|
| ۱ | ۵۶ | ۶۲/۵ | ۲۰ | ۰/۱ | ۱/۳۱ |
| ۲ | ۵۶ | ۶۲/۵ | ۳۰ | ۰/۰۷ | ۱/۹۹ |
| ۳ | ۹۰ | ۱۲۰ | ۱۰ | ۰/۰۴ | ۲/۶۷ |
| ۴ | ۹۰ | ۶۲/۵ | ۲۰ | ۰/۰۷ | ۱/۸۴ |
| ۵ | ۹۰ | ۱۲۰ | ۳۰ | ۰/۰۴ | ۲/۹۸ |
| ۶ | ۵۶ | ۶۲/۵ | ۲۸ | ۰/۰۷ | ۱/۹۲ |
| ۷ | ۵۶ | ۶۲/۵ | ۲۰ | ۰/۰۷ | ۱/۷۷ |
| ۸ | ۲۲ | ۵ | ۳۰ | ۰/۰۴ | ۰/۷۷ |
| ۹ | ۵۶ | ۵۲ | ۲۰ | ۰/۰۷ | ۱/۵۵ |
| ۱۰ | ۲۲ | ۶۲/۵ | ۲۰ | ۰/۰۷ | ۱/۵۲ |
| ۱۱ | ۹۰ | ۱۲۰ | ۳۰ | ۰/۱ | ۲/۷۷ |
| ۱۲ | ۹۰ | ۵ | ۳۰ | ۰/۰۴ | ۱/۰۶ |
| ۱۳ | ۲۲ | ۵ | ۳۰ | ۰/۱ | ۰/۹۳ |
| ۱۴ | ۲۲ | ۱۲۰ | ۱۰ | ۰/۰۴ | ۲/۱۱ |
| ۱۵ | ۵۶ | ۶۲/۵ | ۲۸ | ۰/۰۴ | ۲/۰۲ |
| ۱۶ | ۲۲ | ۱۲۰ | ۳۰ | ۰/۱ | ۲/۵۱ |
| ۱۷ | ۲۲ | ۱۲۰ | ۱۰ | ۰/۱ | ۱/۷۹ |
| ۱۸ | ۲۲ | ۱۲۰ | ۳۰ | ۰/۰۴ | ۲/۷۱ |
| ۱۹ | ۵۶ | ۵۲ | ۲۸ | ۰/۰۷ | ۱/۶۷ |
| ۲۰ | ۹۰ | ۵ | ۱۰ | ۰/۱ | ۰/۹۹ |
| ۲۱ | ۲۲ | ۶۲/۵ | ۲۰ | ۰/۰۴ | ۱/۴۷ |
| ۲۲ | ۹۰ | ۵ | ۱۰ | ۰/۰۴ | ۱/۰۱ |
| ۲۳ | ۹۰ | ۱۲۰ | ۱۰ | ۰/۱ | ۲/۳۶ |
| ۲۴ | ۲۲ | ۵ | ۱۰ | ۰/۰۴ | ۰/۸۶ |
| ۲۵ | ۲۲ | ۵ | ۱۰ | ۰/۱ | ۰/۷۱ |
| ۲۶ | ۵۶ | ۶۲/۵ | ۲۰ | ۰/۰۴ | ۱/۶۶ |
| ۲۷ | ۵۶ | ۶۲/۵ | ۲۰ | ۰/۰۷ | ۱/۸۴ |
| ۲۸ | ۵۶ | ۶۲/۵ | ۲۰ | ۰/۱۳ | ۱/۵۴ |
| ۲۹ | ۹۰ | ۵ | ۳۰ | ۰/۱ | ۰/۸۷ |



تحلیل آزمایش‌ها و بهینه‌سازی فرایند استخراج ماده مؤثره سنوزید B عصاره گیاه سنا

با توجه به نتایج به دست آمده در جدول شماره ۳ به دنبال بهترین مدل ریاضی برای توصیف فرایند و بازده استخراج ماده‌ی مؤثره سنوزید با توجه به پارامترهای مؤثر بر آن هستیم. نتایج اولیه نشان می‌دهند که بهترین مدل پیشنهادی و پیش‌فرض به صورت Full Quadratic و در نظر گرفتن تمامی جملات و ضرایب موجود در آن خواهد بود.

نتایج این مدل نشان از برازش عالی با Adj R-square برابر ۹۷ درصد دارد و این بدان معنی است که تنها سه درصد از واریانس کل توسط این مدل تبیین نمی‌شود. همچنین شاخص‌های ارزیابی کفایت مدل، همگی نشان از برازش مناسب این مدل دارد. مدل نهایی بر اساس پارامترهای کد شده به صورت معادله (۱) می‌باشد. در این معادله A بیانگر دما، B بیانگر زمان، C بیانگر اندازه صافی و D بیانگر نسبت ماده به حلال است.

جدول شماره ۳- جدول تحلیل آماری برای پاسخ درصد سنوزید استخراج شده

| Response | 1 | Sennoside B | | | | |
|--|----------------|----------------------|-------------|-----------|------------------|-----------------|
| Transform: | Power | Lambda: | 1 | Constant: | 0 | |
| Backward Elimination Regression with Alpha to Exit = 0.100 | | | | | | |
| Forced Terms Intercept | | | | | | |
| | Coefficient | t for H ₀ | | | | |
| Removed | Estimate | Coeff=0 | Prob > t | R-Squared | MSE | |
| CD | 0.016 | 0.55 | 0.5871 | 0.9783 | 0.013 | |
| AD | -0.022 | -0.79 | 0.4421 | 0.9776 | 0.013 | |
| ANOVA for Response Surface Reduced 2FI Model | | | | | | |
| Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III] | | | | | | |
| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F Value | p-value Prob > F | |
| Model | 11.54 | 8 | 1.44 | 109.24 | < 0.0001 | significant |
| A-Temperature | 0.46 | 1 | 0.46 | 34.54 | < 0.0001 | |
| B-Time | 10.11 | 1 | 10.11 | 766.14 | < 0.0001 | |
| C-Mesh size | 0.43 | 1 | 0.43 | 32.43 | < 0.0001 | |
| D-Solvent Ratio | 0.17 | 1 | 0.17 | 13.00 | 0.0018 | |
| AB | 0.062 | 1 | 0.062 | 4.73 | 0.0417 | |
| AC | 0.040 | 1 | 0.040 | 3.03 | 0.0971 | |
| BC | 0.24 | 1 | 0.24 | 18.54 | 0.0003 | |
| BD | 0.044 | 1 | 0.044 | 3.34 | 0.0826 | |
| Residual | 0.26 | 20 | 0.013 | | | |
| Lack of Fit | 0.26 | 19 | 0.014 | 5.62 | 0.3221 | not significant |
| Pure Error | 2.450E-003 | 1 | 2.450E-003 | | | |
| Cor Total | 11.80 | 28 | | | | |
| The Model F-value of 109.24 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise. | | | | | | |

$$(Sennoside B) 1 = +1.69 + 0.16 * A + 0.79 * B + 0.15 * C - 0.085 * D + 0.062 * A * B - 0.050 * A * C + 0.12 * B * C - 0.052 * B * D$$

معادله (۱)



است. با توجه به نتایج این جدول کاملاً مشخص است که دستیابی به بیشینه مقدار ماده مؤثره (۳/۰۰۹ درصد) زمانی اتفاق می‌افتد که دما برابر ۸۴، زمان ۱۱۹/۷ دقیقه، نسبت ماده به حلال برابر با ۰/۰۴ و اندازه صافی برابر با ۲۹/۷ میکرون باشد.

معادله بعدی، مدل محاسباتی متغیر پاسخ را برای اعداد واقعی با توجه به ضرایب محاسبه شده، نشان می‌دهد. در این معادله مقدار ضرایب نشانگر میزان اثر پارامتر نمی‌باشد (معادله ۲).
در نهایت نقطه‌ای که به عنوان نقطه بهینه توسط روش سطح پاسخ داده شده، در جدول شماره ۴ آورده شده است. در این مطالعه هدف دستیابی به بیشترین مقدار درصد سنوزید B بوده

$$\text{(Sennoside B)} = +0.55257 + 5.50875E-003 * \text{Temperature} + 9.84208E-003 * \text{Time} + 0.010016 * \text{Mesh size} - 0.92215 * \text{Solvent Ratio} + 3.19693E-005 * \text{Temperature} * \text{Time} - 1.47059E-004 * \text{Temperature} * \text{Mesh size} + 2.14954E-004 * \text{Time} * \text{Mesh size} - 0.030435 * \text{Time} * \text{Solvent Ratio}$$

(معادله ۲)

جدول شماره ۴- نتیجه بهینه‌سازی با روش سطح پاسخ توسط نرم‌افزار 9 Design expert

| Constraints | | | | | | |
|---------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|------------|
| Name | Goal | Lower Limit | Upper Limit | Lower Weight | Upper Weight | Importance |
| Temperature | is in range | 22 | 90 | 1 | 1 | 3 |
| Time | is in range | 5 | 120 | 1 | 1 | 3 |
| Mesh size | is in range | 10 | 30 | 1 | 1 | 3 |
| Solvent Ratio | is in range | 0.04 | 0.1 | 1 | 1 | 3 |
| Sennoside B | maximize | 0.71 | 2.98 | 1 | 1 | 3 |

| Solutions | | | | | | |
|-----------|--------------|---------------|--------------|---------------|----------------|--------------|
| Number | Temperature | Time | Mesh size | Solvent Ratio | Sennoside B | Desirability |
| 1 | <u>84.00</u> | <u>119.77</u> | <u>29.68</u> | <u>0.04</u> | <u>3.00946</u> | <u>1.000</u> |
| 2 | 88.95 | 119.71 | 29.83 | 0.05 | 2.99182 | 1.000 |
| 3 | 89.99 | 119.24 | 28.64 | 0.04 | 3.0113 | 1.000 |
| 4 | 87.91 | 119.68 | 29.79 | 0.05 | 2.98761 | 1.000 |
| 5 | 89.55 | 117.90 | 29.24 | 0.04 | 3.00247 | 1.000 |
| 6 | 77.42 | 118.85 | 29.99 | 0.04 | 2.98173 | 1.000 |
| 7 | 72.51 | 119.97 | 29.99 | 0.04 | 2.98153 | 1.000 |
| 8 | 73.27 | 120.00 | 29.58 | 0.04 | 2.97599 | 0.998 |
| 9 | 69.89 | 120.00 | 30.00 | 0.04 | 2.96971 | 0.995 |
| 10 | 90.00 | 119.95 | 30.00 | 0.06 | 2.96201 | 0.992 |
| 11 | 90.00 | 120.00 | 30.00 | 0.06 | 2.96035 | 0.991 |
| 12 | 90.00 | 120.00 | 30.00 | 0.07 | 2.94641 | 0.985 |
| 13 | 90.00 | 120.00 | 24.58 | 0.04 | 2.94628 | 0.985 |
| 14 | 60.06 | 120.00 | 30.00 | 0.04 | 2.92065 | 0.974 |
| 15 | 90.00 | 120.00 | 23.00 | 0.04 | 2.91088 | 0.970 |
| 16 | 89.97 | 120.00 | 30.00 | 0.08 | 2.90757 | 0.968 |
| 17 | 90.00 | 120.00 | 22.43 | 0.04 | 2.89793 | 0.964 |
| 18 | 90.00 | 120.00 | 30.00 | 0.08 | 2.89218 | 0.961 |



بحث

عنوان يك روش مؤثر در عصاره‌گيري نامبرده شده است. مؤثرترين فاکتورها در فرايند استخراج سنوزيد از عصاره‌ی گیاه سنا شامل زمان، دما و اندازه صافی بودند. افزايش دما باعث افزايش برخورد مؤثر بين واکنش‌دهنده‌ها و در نتيجه افزايش سرعت در بيشتري فرايندهای انتقال جرم می‌شود. به همين ترتيب در فرايند استخراج مواد مؤثره گیاه سنا به روش به هم زدن افزايش دما باعث بالا رفتن سرعت انتقال جرم شد. پس از تحليل‌های آماری و مدل‌سازی فرايند استخراج مشخص شد که شرایط بهينه برای ماده مؤثره سنوزيد (دستيابی به بیشینه مقدار ماده مؤثره ۳/۰۰۹ درصد) زمانی اتفاق می‌افتد که دما برابر ۸۴ درجه سلسیوس، زمان ۱۱۹/۷ دقیقه، نسبت ماده به حلال برابر با ۰/۰۴ و اندازه صافی برابر با ۲۹/۷ میکرون باشد. نتايج اين پژوهش کاملاً قابل دستيابی و از نظر صنعتی برای صنايع توليدی و استخراج گیاهان دارویی قابل قبول و منطقی است. درنهایت می‌توان نتيجه گرفت که استفاده از روش عصاره‌گيري ماسيراسيون فعال (استيرر) به عنوان یکی از بهترين روش‌های جداسازی عصاره گیاه سنا در صنعت مطرح بوده و راندمان خروجی ماده مؤثره سنوزويد B تحت تأثیر شرایط بهينه معرفی شده در بيشتري مقدار خود خواهد بود.

در اين تحقيق از روش سطح پاسخ (Response Surface Methodology) يا به صورت اختصاری RSM که يك مجموعه از تکنیک‌های آماری برای ساخت مدل‌های تجربی است برای بهينه‌سازی شرایط استخراج ترکیب سنوزيد استفاده شد. در اين مطالعه سعی شده است تا با استفاده از اين روش استخراج ماده مؤثره‌ی سنوزيد به بهترين میزان خود در گیاه برسد. در اين راستا فاکتورهای دما، زمان، اندازه صافی و نسبت ماده به حلال به عنوان فاکتورهای مورد بررسی انتخاب شدند. اولين مرحله‌ی کلیدی در استخراج ترکیبات مؤثره از يك گیاه نحوه‌ی عصاره‌گيري از آن است. چراکه نوع ترکیب استخراج شده، کیفیت و کمیت آن به شدت تحت تأثیر اندام گیاهی و سیستم‌های حلالی انتخاب شده قرار دارند. از جمله روش‌های کلاسیک استخراج که در اين تحقيق مورد بررسی قرار گرفت شامل سوکسله، تقطير، خيساندن و خيساندن همراه به هم زدن را می‌توان نام برد.

در اين مطالعه و بر اساس نتايج آزمون مشخص شد که بهترين روش استخراج عصاره گیاه سنا در شرایط ثابت آزمایشگاهی، استفاده از روش به هم زدن می‌باشد که در مطالعات ديگر انجام شده بر روی ديگر گونه‌های سنا نیز از اين روش به

منابع

1. Singh S, Singh SK and Yadav A. A review on Cassia species: Pharmacological, traditional and medicinal aspects in various countries. *Am. J. Phytomed Clinical Therapeutics* 2013; 1: 291-312.
2. Farag M A, et al. Integrated comparative metabolite profiling via MS and NMR techniques for Senna drug quality control analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015; 407: 1937-49.
3. Dave H and Lalita L. A review on anthraquinones isolated from Cassi species and their applications. *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 2012; 3: 291-319.
4. Castro ML and Garcia-Ayuso L. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Anal. Chim. Acta.* 1998; 369: 1-10.
5. Saboora A, Pourbarat F and Fallah Hossini H. Comparison of Different Extraction Methods for Optimizing Antioxidant Compounds in Origanum Majorana L. *J. Shahid Sadoughi Univ. Med. Sci.* 2014; 21: 693-704.
6. Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* 2001; 8: 303-13.



7. Kaufmann B, Christen P. Recent extraction techniques for natural products: microwave assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem. Anal.* 2002; 13: 105-13.
8. Marr R, Gamse T. Use of supercritical fluids for different processes including new developments—a review. *Chem. Eng. Process* 2000; 39: 19-28.
9. Lang Q, Wai CM. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta* 2001; 53: 771-82.
10. Meireles MAA. Supercritical extraction from solid: process design data (2001–2003). *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 2003; 7: 321-30.
11. Zhao C, Zu Y and Li C. Extraction of solanesol from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves by bubble column. *Che. Eng. Process.* 2009; 48: 203-8.



Comparison of Different Methods in Sennoside Extraction from *Senna alexandrina*

Enayati N (M.Sc.)¹, Ghafarzadegan R (Ph.D Candidate)², Hajiaghaee R (Ph.D.)², Vazirian M (Ph.D.)^{3*}

1- Department of Pharmaceutical Engineering, Alburz Capmpus, University of Tehran, Tehran, Iran

2- Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran

3- Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding author: Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Tel & Fax: +98-21-66482609

Email: vazirian_m@sina.tums.ac.ir

Abstract

Background: Senna leaf belongs to stimulant laxatives. The laxative effect of this medicinal plant is because of sennosides, aloe-emodin and dynatron which they all belongs to among anthraquinone derivatives family and uses to treat constipation, discharge of the intestine before surgery or abdomen surgeries and tests.

Objective: In this study, different methods of extracting from the Senna plant was compared and the extraction of the active ingredient, sennoside B, was optimized by using the response level statistical method.

Methods: For the extraction of Senna extract, various extraction methods, including maceration, dynamic maceration (stirrer), ultrasound assisted extraction, microwave assisted extraction and soxhlet extraction using ethanol 96° and 60° as solvent in different times. Regarding to the meanweights of the extracts and active substance sennoside B, The best method was selected. In the next phase, the amount of active substance of sennoside B was optimized using the statistical method of response surface.

Results: Considering the mean weights of the extract and amount of sennoside B, dynamic maceration (stirrer) method is the most suitable method to obtain senna extract in the industrial and medicinal extraction. The results of the optimization of the best extraction method (maceration) showed that when influential variables temperature, time, the ratio of substance to solvent and filter mesh were 84°C, 119.7 minutes, 0.04 and 29.7 microns, respectively, the maximum amount of the active substance (3.009%) has been reached.

Conclusion: Finally, it can be concluded that active maceration extraction method (stirrer) is suggested as one of the best method to obtain senna extract in industry and the output efficiency of the active substance of sennoside B is affected by introduced optimized conditions mentioned.

Keywords: *Senna alexandrina*, Extraction, Sennoside B, Stirrer, Response Surface Method

