بررسی بهترین روش استخراج ترکیبات فنلی موجود در گیاه سرخارگل

هما حاجی‌مهدی‌پور[۱]، مهناز خانوی[۲]*، مریم شکرچی[۳]، زهرا عابدی[٤]، مرتضی پیرعلی‌همدانی[٥]

۱- استادیار، گروه فارماکوگنوزی و عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، تهران
۲- استادیار، گروه فارماکوگنوزی و عضو هیأت علمی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
۳- استادیار، گروه شیمی دارویی و عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، تهران
٤- کارشناس بخش داروهای گیاهی، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، تهران
٥- دانشیار، گروه شیمی دارویی و عضو هیأت علمی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، تهران
*آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، گروه فارماکوگنوزی
تلفن: ٦٦٩٥٤٧٠٦ (۰۲۱)، نمابر: ٦٦٤٦١١٧٨ (۰۲۱)
پست الکترونیک: khanavim@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۱۹ **تاریخ تصویب:** ۸۸/۸/۱٤

چکیده

مقدمه: سرخارگل گیاهی است که از دیرباز در طب سنتی مورد مصرف بوده است. امروزه تحقیقات وسیعی روی این گیاه انجام شده و مشخص شده است که این گیاه باعث تحریک سیستم ایمنی بدن می‌شود. گیاه شامل ترکیبات متعددی مثل فلاونوئیدها، ترکیبات فنلی و ایزوبوتیل آمیدها است. ترکیبات فنلی یکی از مهم‌ترین دسته ترکیباتی هستند که اثرات محرک سیستم ایمنی آن‌ها اثبات شده است. بنابراین تعیین روشی برای استخراج بهینه این مواد از گیاه امری ضروری است.

هدف: در این تحقیق اثرات حلال، روش استخراج، اندازه ذره‌ای گیاه و نسبت گیاه به حلال در استخراج ترکیبات فنلی گیاه سرخارگل[1] مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: به منظور تعیین بهترین حلال برای استخراج فنل‌ها، حلال‌های مختلف قطبی و غیرقطبی از هگزان تا آب اسیدی مورد آزمایش قرار گرفتند. به علاوه روش‌های ماسراسیون، سونیکاسیون، پرکولاسیون، استخراج گرم و استخراج مداوم (با دستگاه سوکسله)، پودر گیاه با اندازه ذره‌ای متفاوت و نسبت‌های مختلف گیاه به حلال بررسی شدند.

نتایج: نتایج نشان دادند که بهترین روش برای استخراج ترکیبات فنلی استفاده از حلال متانول: آب (۲۰: ۸۰)، روش استخراج گرم (۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد)، اندازه ذره‌ای ۳۰۰ میکرومتر و نسبت گیاه به حلال ۲۰۰: ۱ می‌باشد.

نتیجه‌گیری: برای استخراج بهینه ترکیبات فنلی از گیاه سرخارگل شرایط خاص باید در نظر گرفته شوند.

گل‌واژگان: سرخارگل، ترکیبات فنلی، استخراج، رنگ‌سنجی

[1] *Echinacea purpurea* (L.) Moench

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2009.8.32.17.4]

مقدمه

گیاه سرخارگل[1] از خانواده Asteraceae گیاهی است که از دیرباز مورد توجه بوده و در طب سنتی کاربرد داشته است. اما در سال‌های اخیر، توجه محققین به این گیاه بیشتر شده است و تحقیقات انجام گرفته نشان داده‌اند که این گیاه اثرات بسیار خوبی روی سیستم ایمنی دارد به طوری که باعث تقویت آن شده و مقاومت بدن را در برابر بیماری‌ها افزایش می‌دهد [۱،۲،۳]. بر طبق گزارش‌های کمیسیون اروپا، فرمولاسیون‌های حاصله از *E. purpurea* که به صورت تزریقی یا خوراکی تجویز شده‌اند، اثرات محرک سیستم ایمنی را از خود نشان داده‌اند. این داروها منجر به افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون و سلول‌های طحال شده و توانایی فاگوسیتوز توسط گرانولوسیت‌ها را زیاد می‌کنند. همچنین اثبات شده است فرمولاسیون‌های خوراکی به اندازه تزریقی‌ها موثر هستند فقط شروع اثر کمتری دارند [٤،٥،٦]. فرمولاسیون‌های موضعی نیز از گیاه وجود دارد که منجر به مهار هیالورونیداز شده و در بهبود زخم موثر هستند [۷،۸]. کتاب کمیسیون E، استفاده خوراکی از گیاه را در درمان حمایتی سرماخوردگی و عفونت‌های مزمن دستگاه تنفسی و دستگاه ادراری تحتانی و استفاده موضعی از آن‌را در زخم‌های دیر خوب شونده و مزمن تایید کرده [۹] و سازمان بهداشت جهانی مصرف موضعی آن‌را علاوه بر موارد فوق، در درمان التهابات پوستی نیز تایید کرده است [٦]. اکیناسه شامل مشتقات کافئیک اسید به ویژه شیکوریک اسید، کافتاریک اسید و کلروژنیک اسید و نیز آلکامیدها به ویژه ایزومرهای دو دکا-2E,4E,8Z,10E/Z- تترا انوئیک اسیدایزوبوتیل آمیدها، پلی‌ساکاریدهای محلول در آب، فلاونوییدهای شبه کوئرستین و کامفرول، اسانس حاوی بورنئول، بورنیل استات، پنتا دکا- ۸- ان- ۲-اون، اسید پالمتیک و ترکیبات دیگر می‌باشد [٦،۱۰]. تحقیقات نشان داده‌اند که مجموعه ترکیبات موجود در گیاه در بروز اثرات محرک ایمنی آن موثر است که از میان آن‌ها مشتقات کافئیک اسید، آلکیل آمیدها و پلی ساکاریدها اهمیت ویژه‌ای دارند [۱٤-۱۱، ٦]. اما از آنجا که جهت استانداردسازی فرمولاسیون‌های گیاهی، یک ترکیب و یا دسته مشخصی از ترکیبات به عنوان مارکر ردیابی شده و تعیین مقدار می‌شوند، لذا در اکثر فرمولاسیون‌های گیاه سرخارگل طبق مراجع معتبر مجموع ترکیبات فنلی نظیر کلروژنیک اسید، شیکوریک اسید، کافتاریک اسید و ... به روش HPLC تعیین مقدار می‌شوند، که اساس این روش استفاده از کلروژنیک اسید به عنوان استاندارد خارجی و زمان‌های بازداری نسبی سایر ترکیبات نسبت به کلروژنیک اسید می‌باشد [۱٥،۱٦]. گونه *E. purpurea* یکی از گونه‌هایی است که در ایران کشت می‌شود. سرشاخه‌های هوایی این گونه سرشار از اسیدهای شیکوریک و کافتاریک بوده و مقدار اسید کلروژنیک آن ناچیز است [۱٥]. بررسی‌ها نشان می‌دهند که در گیاه *E. purpurea* کشت شده در ایران ترکیب کلروژنیک اسید وجود ندارد و از طرفی وجود سایر ترکیبات گیاه منجر به پیچیدگی کروماتوگرام شده و تشخیص پیک‌های دو اسید فوق‌الذکر را از روی زمان‌های بازداری نسبی آنها مشکل می‌سازد و از سوی دیگر دسترسی به ماده استاندارد این‌دو اسید به علت قیمت زیاد اسید شیکوریک و نیز نبودن اسید کافتاریک در لیست شرکت‌های سازنده مواد استاندارد امکان‌پذیر نمی‌باشد. بنابراین استفاده از روش HPLC جهت استانداردسازی گیاه و فراورده‌های وابسته عملی نبوده و معرفی روش مناسب دیگر اجتناب‌ناپذیر است. از آنجا که ترکیبات مورد بررسی مشتقات فنلی هستند، بنابراین می‌توان میزان ترکیبات فنلی تام گیاه را با استفاده از روش UV بر اساس اسید کلروژنیک اندازه‌گیری نمود. جهت استفاده از این روش و به کاربردن آن برای استانداردسازی فرمولاسیون‌های وابسته به این گیاه معرفی بهترین روش استخراج این ترکیبات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این تحقیق، هدف آن است که اثر حلال‌های مختلف، روش‌های عصاره‌گیری مختلف، اندازه‌های ذره‌ای متفاوت و نیز نسبت گیاه به حلال مورد بررسی قرار گیرد تا روش مناسب، جهت استخراج بهینه ترکیبات فنلی از این گیاه معرفی شود.

[1] *Echinacea purpurea* (L.) Moench

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2009.8.32.17.4]

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی گیاه

سرشاخه هوایی گیاه سرخارگل در تابستان ۱۳۸۷ از منطقه گرگان جمع‌آوری شده و توسط بخش گیاه‌شناسی دانشگاه گرگان شناسایی شد.

مواد و وسایل مورد نیاز

استاندارد کلروژنیک اسید، معرف Folin-Ciocalteus، بیکربنات سدیم و حلال‌های مورد استفاده همگی از شرکت Merck خریداری شدند.

آماده‌سازی نمونه

سرشاخه هوایی پس از خشک شدن در سایه آسیاب شدند. به منظور بررسی بهترین روش استخراج ترکیبات فنلی در گیاه، حلال، روش استخراج، اندازه ذره‌ای پودر گیاه و نیز نسبت گیاه به حلال مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی [۱۷]

۴۰۰ میکرولیتر از عصاره درون لوله آزمایش درب‌دار ریخته شده و پس از افزودن ۳ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو (رقیق شده با آب به نسبت ۱۰:۱)، در بن ماری با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. سپس به آن ۳ میلی‌لیتر محلول بیکربنات سدیم ٦ درصد افزوده و مجدداً در بن ماری با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. پس از گذشت زمان ۹۰ دقیقه جذب نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر در مقابل بلانک آب اندازه‌گیری شد.

لازم به ذکر است که بلانک نیز مانند نمونه تهیه شد با این تفاوت که به جای عصاره، ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر درون لوله آزمایش ریخته شد.

این روش بر روی هر یک از محلول‌های استاندارد کلروژنیک اسید با غلظت‌های ۰/۰۳، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نیز انجام شد و منحنی کالیبراسیون غلظت در برابر جذب رسم شد (r2 = ۰/۹۹۹۹، y = ۳/۰٦۱۹×۰/۰۳٦۳).

انتخاب بهترین حلال برای استخراج ترکیبات فنلی

مقدار ۰/۲ گرم از نمونه‌ای که از الک ۵۰۰ میکرون عبور داده شده بود به دقت وزن شده و در ظرف‌های درب‌دار ریخته شد. سپس بر روی هر شیشه مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از هر یک از حلال‌های آب (۱۰۰ درصد)، آب:متانل (۵۰:۵۰)، آب: HCl ۰/۱ درصد (۵۰:۵۰)، آب: متانل (۲۰:۸۰)، متانل: اتیل استات (۵۰:۵۰)، دی کلرومتان: اتیل استات (۵۰:۵۰)، دی‌کلرومتان: استون (۵۰:۵۰)، دی کلرومتان: هگزان (۵۰:۵۰)، دی کلرومتان (۱۰۰ درصد)، اتیل‌استات (۱۰۰ درصد)، هگزان (۱۰۰ درصد)، استون (۱۰۰ درصد)، متانول (۱۰۰ درصد)، استون: آب (۵۰:۵۰)، استون: آب (۷۰:۳۰) ریخته شد. پس از گذشت ۵ روز عصاره‌ها توسط کاغذ صافی، فیلتر و سپس هر یک با حلال مربوطه خود به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. عصاره‌گیری با هر یک از حلال‌ها سه بار انجام شد و هر عصاره سه بار آنالیز و میزان ترکیبات فنلی هر عصاره با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد.

تعیین بهترین روش عصاره‌گیری جهت استخراج ترکیبات فنلی

بعد از آزمون حلال‌های مختلف روی عصاره‌ها مشخص شد که حلال متانول ۸۰ درصد بهترین حلال جهت استخراج ترکیبات فنلی است. در مرحله بعد برای تعیین بهترین روش عصاره‌گیری، روش‌های ماسراسیون، استخراج گرم، پرکولاسیون، استخراج مداوم با استفاده از دستگاه سوکسله و سونیکاسیون با یکدیگر مقایسه شدند.

روش ماسراسیون (سرد): مقدار ۰/۱ گرم از پودر گیاه با اندازه ذره‌ای ۵۰۰ میکرومتر به دقت وزن شده و بر روی آن ۲۰ میلی‌لیتر متانل ۸۰ درصد ریخته، مخلوط را خوب شیک کرده و سپس به مدت ۲٤ ساعت به حال خود گذاشته و پس از طی زمان مربوطه عصاره‌ها توسط کاغذ صافی، فیلتر و در بالن ژوژه ۲۰ میلی‌لیتری با حلال متانل ۸۰ درصد به حجم رسانده شد.

روش عصاره‌گیری گرم: مقدار ۰/۱ گرم از پودر گیاه به دقت وزن شده و بر روی آن ۲۰ میلی‌لیتر متانل ۸۰ درصد ریخته،

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2009.8.32.17.4]

مخلوط را خوب شیک کرده و سپس به مدت ۲ ساعت در بن‌ماری با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. پس از گذشت ۲ ساعت عصاره‌ها توسط کاغذ صافی، فیلتر و در بالن ژوژه ۲۰ میلی‌لیتری با حلال متانل ۸۰ درصد به حجم رسانده شد.

روش پرکولاسیون: مقدار ۰/۱ گرم از پودر گیاه به دقت وزن شده و در دکانتوری که در انتهای آن پنبه قرار داده شده بود، ریخته شد. سپس بر روی آن به طور مرتب حلال متانل ۸۰ درصد ریخته و خالی شد تا زمانی این کار ادامه پیدا کرد که وقتی متانل ۸۰ درصد ریخته شد دیگر محلول داخل دکانتور بی‌رنگ شد. سپس ارلن حاوی محلول جمع‌آوری شده، توسط روتاری تقطیر شد تا حجم آن به ۲۰ میلی‌لیتر کاهش یابد. سپس عصاره‌ها در بالن ژوژه ۲۰ میلی‌لیتری با حلال متانل ۸۰ درصد به حجم رسانده شد.

روش استخراج مداوم (سوکسله): مقدار ۰/۱ گرم از پودر گیاه به دقت وزن شده و در کارتوش ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و در دستگاه سوکسله ۵۰ میلی‌لیتری قرار گرفت. حلال متانل ۸۰ درصد در بالن ته گرد ریخته شد و سوکسله به مدت ٦ ساعت انجام گرفت. سپس بالن حاوی محلول جمع‌آوری شده، توسط روتاری تقطیر شد تا حجم آن به ۲۰ میلی‌لیتر کاهش یابد. سپس عصاره‌ها در بالن ژوژه ۲۰ میلی‌لیتری با حلال متانل ۸۰ درصد به حجم رسانده شد.

روش سونیکاسیون: مقدار ۰/۱ گرم از پودر گیاه به دقت وزن شده و بر روی آن ۲۰ میلی‌لیتر متانل ۸۰ درصد ریخته شد. به مدت ۲ ساعت درون دستگاه سونیکاتور قرار گرفت. پس از گذشت زمان مربوطه عصاره‌ها توسط کاغذ صافی، فیلتر و در بالن ژوژه ۲۰ میلی‌لیتری با حلال متانل ۸۰ درصد به حجم رسانده شد.

با هر یک از روش‌ها سه بار عصاره‌گیری انجام و هر عصاره سه بار آنالیز شد.

تعیین بهترین اندازه ذره‌ای پودر گیاه جهت استخراج استخراج ترکیبات فنلی

پس از انتخاب بهترین حلال و روش عصاره‌گیری، ۰/۱ از پودر گیاه که از الک‌هایی با اندازه ذره‌ای ۳۰۰، ۵۰۰ و ۸۵۰ میکرون عبور داده شده بود با استفاده از متانول ۸۰ درصد و روش گرم عصاره‌گیری شد. از هر یک سه بار عصاره‌گیری و هر عصاره نیز سه بار آنالیز شد.

تاثیر نسبت گیاه به حلال در استخراج ترکیبات فنلی تام

در مرحله بعد برای تعیین تأثیر نسبت گیاه به حلال در میزان ترکیبات فنلی استخراج شده، وزن‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۳ گرم از گیاه برداشته شد و پس از عبور از الک با حفرات ۳۰۰ میکرومتری، عصاره‌گیری گرم با حلال متانول ۸۰ درصد صورت گرفت و به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد و در نتیجه نسبت‌های ۲۰۰: ۰/۵، ۲۰۰: ۱، ۲۰۰: ۱/۵، ۲۰۰: ۲، ۲۰۰: ۳ از گیاه به حلال حاصل شد و مانند مراحل قبل سه بار از هر یک از آن‌ها عصاره‌گیری شد و هر عصاره نیز سه بار آنالیز شد.

آنالیز آماری

اختلاف بین درصد ترکیبات فنلی تام در عصاره‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون ANOVA صورت گرفت و $p < ۰/۰۵$ به عنوان اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج تعیین بهترین حلال جهت استخراج ترکیبات فنلی تام گیاه سرخارگل، در جدول شماره ۱ آورده شده است.

نتایج تعین بهترین روش استخراج ترکیبات فنلی تام گیاه سرخارگل در جدول شماره ۲ آورده شده است.

نتایج تعین بهترین اندازه ذره‌ای پودر گیاه سرخارگل جهت استخراج تر کیبات فنلی در جدول شماره ۳ آورده شده است.

نتایج تعین بهترین نسبت گیاه به حلال جهت استخراج ترکیبات فنلی تام گیاه سرخارگل در جدول شماره ٤ آورده شده است.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2009.8.32.17.4]

جدول شماره ۱- درصد ترکیبات فنلی تام در گیاه سرخارگل با استفاده از حلال‌های مختلف

حلال	درصد ترکیبات فنلی تام*
هگزان	۰/۲۵ ± ۰/۰۲
دی کلرومتان	۰/۳۱ ± ۰/۰۳
اتیل استات	۰/۲۹ ± ۰/۰۲
استون	۰/٤٥ ± ۰/۰۲
متانول	۱/۱۱ ± ۰/۱۱
آب	۲/۷۱ ± ۰/۰۹
دی‌کلرومتان: هگزان (۵۰:۵۰)	۰/۵۰± ۰/۰۳
دی‌کلرومتان: اتیل استات (۵۰:۵۰)	۰/٦٤ ± ۰/۰۳
دی‌کلرومتان: استون (۵۰:۵۰)	۰/٤٨ ± ۰/۰٤
متانل: اتیل استات (۵۰:۵۰)	۰/۵۰ ± ۰/۰۵
استون: آب (۵۰:۵۰)	٤/۰٦ ± ۰/۱۱
استون: آب (۷۰:۳۰)	۳/٦٤ ± ۰/۱۰
آب: متانل (۵۰:۵۰)	٤/۲٦ ± ۰/۰۸
آب: متانل (۲۰: ۸۰)	٤/۵۳ ± ۰/۱۲
آب: HCl ۰/۱ درصد (۵۰:۵۰)	۳/٦۰ ± ۰/۱۲

* اعداد، میانگین ± انحراف استاندارد می‌باشند.

جدول شماره ۲- درصد ترکیبات فنلی تام موجود در گیاه سرخارگل با روش‌های مختلف عصاره‌گیری

روش عصاره‌گیری	درصد ترکیبات فنلی تام*
ماسراسیون (سرد)	۳/۷۱ ± ۰/۱۵
پرکولاسیون	۳/۵۰ ± ۰/۱۳
سونیکاسیون	۳/۳۵ ± ۰/۱۵
استخراج مداوم (سوکسله)	۳/۲۷ ± ۰/۱۹
گرم	٤/٤۱ ± ۰/۱۳

* اعداد، میانگین ± انحراف استاندارد می‌باشند.

جدول شماره ۳- درصد ترکیبات فنلی تام موجود در گیاه سرخارگل با اندازه ذره‌ای متفاوت

اندازه ذره‌ای (میکرومتر)	درصد ترکیبات فنلی تام*
۳۰۰	۵/۷٤ ± ۰/۱۲
۵۰۰	٤/٤۱ ± ۰/۱۳
۸۵۰	٤/۰٤ ± ۰/۱۱

* اعداد، میانگین ± انحراف استاندارد می‌باشند.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2009.8.32.17.4]

جدول شماره ٤- درصد ترکیبات فنلی تام موجود در گیاه سرخارگل با نسبت‌های متفاوت گیاه: حلال

نسبت گیاه به حلال	درصد ترکیبات فنلی تام*
۰/۵ :۲۰۰	۵/٤۱ ± ۰/۱۷
۱ :۲۰۰	۵/۷٤ ± ۰/۱۲
۱/۵ :۲۰۰	٤/۸۸ ± ۰/۱۰
۲ :۲۰۰	٤/۳۷ ± ۰/۰۹
۳ :۲۰۰	۳/۹۳ ± ۰/۰۵

* اعداد، میانگین ± انحراف استاندارد می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

گیاهان حاوی ترکیبات متعددی هستند که ساختارهای متفاوتی دارند. استخراج این ترکیبات به عوامل متعددی بستگی دارد که مهم‌ترین آن‌ها حلال و روش استخراج می‌باشند. انتخاب حلال و روش استخراج بستگی به قسمت‌های مختلف یک گیاه و نیز مواد متشکله آن دارد. بسیار مشکل خواهد بود که برای هر دسته از ترکیبات گیاهی حلال مخصوصی انتخاب شود زیرا همراه با این ترکیبات، مواد دیگری نیز وجود دارد که بر روی درجه حلالیت این مواد تاثیرگذار می‌باشند [۱۸]. گیاه *Echinacea purpurea* سرشار از ترکیبات فنلی است که مهم‌ترین آنها اسید شیکوریک و اسید کافتاریک می‌باشند. میزان این‌دو ماده در سرشاخه‌های هوایی گیاه به ترتیب ۲ – ۰/۵ درصد و ۰/۸ – ۰/۲ درصد گزارش شده است. روش‌های گوناگونی شامل HPLC، MEKC (Micellar electrokinetic chromatography) و HPLC-UV-MS برای تعیین مقدار ترکیبات فنلی در گیاه توسط محققین مختلف به کار رفته است که از میان این روش‌ها، HPLC کاربرد بیشتری از دو روش دیگر دارد. در مطالعات انجام شده از روش‌های مختلف استخراج و نیز شرایط دستگاهی متفاوت جهت جداسازی و تعیین مقدار ترکیبات فنلی استفاده شده است ولی آنچه در میان تمامی روش‌های HPLC به چشم می‌خورد، استفاده از ماده کلروژنیک اسید به عنوان استاندارد خارجی و تعیین مقدار سایر ترکیبات فنلی با استفاده از منحنی کالیبراسیون این ماده و زمان‌های بازداری نسبی آنها بر اساس این ترکیب می‌باشد [۱۵]. از آنجا که در گیاه *E. purpurea* کشت شده در ایران ماده کلروژنیک اسید وجود ندارد و از طرفی سایر ترکیبات اضافی موجود در گیاه باعث شلوغی کروماتوگرام حاصله از عصاره گیاه شده و تفسیر طیف و تشخیص پیک مربوط به دو ماده اسید شیکوریک و اسید کافتاریک را از روی زمان‌های بازداری پیک اسید کلروژنیک و نیز کروماتوگرام‌های ارایه شده در مراجع مختلف [۱۵] مشکل می‌سازد لذا طراحی روشی دیگر برای تعیین مقدار این ترکیبات فنلی در گیاه و نیز معرفی بهترین روش استخراج این ترکیبات از گیاه که هدف این تحقیق بوده است ضروری به نظر می‌رسد. در تحقیقات انجام شده توسط محققین دیگر جهت آماده‌سازی نمونه برای استخراج اسید شیکوریک و اسید کافتاریک از حلال‌های آبی-متانولی استفاده شده است [۱۵]. از آنجا که هدف این تحقیق به دست آوردن روش مناسب جهت استخراج ترکیبات فنلی به صورت تام و با روش رنگ‌سنجی بوده است، لذا در اولین مرحله کار می‌بایست حلال مناسب جهت استخراج ترکیبات فنلی تام مشخص شود. با توجه به اینکه ترکیبات فنلی شامل گروه وسیعی از ترکیبات هستند که ساختارهای متفاوت و اغلب پلار دارند ولی ممکن است به علت اتصال گروه‌های غیرقطبی به مولکول آنها، دارای ساختمان غیرقطبی و محلول در حلال‌هایی با پلاریته کمتر نیز شده باشند [۱۹]، لذا در این مطالعه، طیف وسیع حلال‌ها از هگزان تا آب با pH اسیدی مورد بررسی قرار گرفته است. از طرف دیگر، تاثیر روش‌های مختلف عصاره‌گیری مثل ماسراسیون، پرکولاسیون، سونیکاسیون، استخراج مداوم با استفاده از دستگاه سوکسله و استخراج گرم با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و نیز تاثیر اندازه ذره‌ای پودر و نسبت گیاه به حلال در استخراج ترکیبات فنلی تام گیاه سرخارگل بررسی شده‌اند.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2009.8.32.17.4]

از نتایج به دست آمده از عصاره‌گیری سرشاخه‌های هوایی گیاه سرخارگل با حلال‌های مختلف چنین برمی‌آید که حلال‌های ترکیبی، جهت استخراج مواد فنلی کارآیی بیشتری دارند. به طور مثال نسبت ترکیبات فنلی استخراج شده توسط حلال‌های هگزان، دی کلرومتان و یا اتیل استات هر یک به تنهایی، حدود نصف میزان ترکیبات استخراج شده در استفاده از این حلال‌ها به صورت ترکیبی می‌باشد. به علاوه نتایج نشان می‌دهند که استفاده از آب، میزان استخراج ترکیبات فنلی را افزایش می‌دهد. به طوری که تمامی مخلوط‌های حلال حاوی آب، مواد فنلی بیشتری را استخراج کرده‌اند که از میان آن‌ها مخلوط حلال متانول: آب (۲۰: ۸۰) بیشترین کارآیی را در استخراج مواد فنلی دارا بوده است. به طوری که مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده به طور معنی‌داری بیشتر از سایر حلال‌ها می‌باشد ($p<۰/۰۵$). از آنجا که ترکیبات فنلی، ماهیت اسیدی دارند، انتظار می‌رفت که استفاده از مخلوط حلالی با ماهیت اسیدی ضعیف کارآیی خوبی در استخراج این ترکیبات داشته باشد ولی نتایج نشان دادند که حلال آب: ۰/۱ درصد HCl (۵۰:۵۰) علیرغم استخراج خوب ترکیبات (۳/٦ درصد)، کارآیی اپتیمم را در استخراج ندارد و در این مورد، استفاده از یک حلال آلی مانند متانول اجتناب‌ناپذیر است.

نتایج به دست آمده از استخراج ترکیبات فنلی گیاه سرخارگل با استفاده از روش‌های مختلف عصاره‌گیری نشان می‌دهد که روش عصاره‌گیری گرم در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت نسبت به سایر روش‌ها اولویت دارد ($p<۰/۰۵$). روش استفاده از دستگاه سوکسله کمترین کارآیی را در استخراج نشان می‌دهد و این نمایانگر این امر است که در روش سوکسله، دمای بالا منجر به تخریب برخی ترکیبات فنلی می‌شود و یا به علت تفاوت در نقطه جوش متانول و آب، حلالی که نهایتاً منجر به استخراج ترکیبات فنلی می‌شود ترکیب ۸۰:۲۰ متانول به آب نبوده و همین امر منجر به کاهش استخراج ترکیبات فنلی می‌شود. دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد مناسب برای استخراج بوده که در آن، ترکیبات تحت تاثیر قرار نمی‌گیرند. مقایسه نتایج این تحقیق با تحقیقات دیگر نشان می دهد که گرچه برای استخراج اسید شیکوریک و اسید کافتاریک استفاده از شیکر و یا سونیکاسیون در دمای اتاق مناسب است [۱۵] ولی جهت استخراج ترکیبات فنلی تام استفاده از دمای ۵۰ درجه کارایی روش را افزایش می‌دهد.

نتایج حاصل از آزمون اندازه ذره‌ای متفاوت در استخراج ترکیبات فنلی نشان می‌دهد با کاهش اندازه ذره‌ای، کارآیی استخراج افزایش می‌یابد به طوری که استفاده از پودر گیاه با اندازه ذره‌ای ۳۰۰ میکرون بهترین کارآیی را در استخراج ترکیبات فنلی گیاه سرخارگل دارد ($p<۰/۰۵$)، که این امر، به دلیل نفوذ بهتر حلال در پودرهای با اندازه ذره‌ای کم می‌باشد.

نتایج به دست آمده از تعیین بهترین نسبت گیاه به حلال جهت استخراج ترکیبات فنلی نشان می‌دهد که مقدار ۰/۱ گرم از گیاه که به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسیده است (نسبت ۲۰۰: ۱) باعث استخراج بهینه ترکیبات فنلی می‌شود ($p<۰/۰۵$).

در مجموع می‌توان نتیجه‌گیری کرد جهت استخراج ترکیبات فنلی تام سرشاخه‌های هوایی گیاه سرخارگل، استفاده از پودر گیاه با اندازه ذره‌ای ۳۰۰ میکرومتر، نسبت گیاه به حلال ۲۰۰: ۱، حلال آب: متانل (۲۰: ۸۰) با استفاده از دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت بهترین روش می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مشترک بین مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو و دانشگاه علوم پزشکی تهران (شماره ۹۱۵۸-۸۲-۰۲-۸۸) می‌باشد که بدین‌وسیله از حمایت‌های مالی آن مراکز تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین نویسندگان این مقاله از جناب آقای دکتر محمدهادی سلیمانی مدیر عامل محترم شرکت گیاه اسانس به علت تامین گیاه سرخارگل کمال تشکر را دارند.

منابع

1. Bauer R and Wagner H. Echinacea Species as Potential Immunostimulatory Drugs. In: Wagner H and Farnsworth NR. *Economic and Medicinal Plants Research.* Vol. 5. Academic press. London.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2009.8.32.17.4]

1991, pp: 253 - 321.

2. Awang DVC and Kindack DG. Herbal medicine. Echinacea. *Canadian pharm*. *J*. 1991; 124 (11): 512 - 5.

3. Schoneberger D. The influence of immune-stimulating effects of pressed juice from *Echinacea purpurea* on the course and severity of colds. *Forum immunologie* 1992; 8: 2 - 12.

4. Stotzem CD, Hungerland U and Mengs U. Influence of *Echinacea purpurea* on the phagocytosis of human granulocytes. *Med. Sci. Res*. 1992; 20:719 - 20.

5. Melchart D, Linde K, Worku F, Bauer R and Wagner H. Immunomodulation with *Echinacea*-a systematic Review of controlled clinical trials. *Phytomed.* 1994; 1: 245 - 54.

6. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. Vol. 1., World Health Organigation. Geneve. 1999, pp: 136 - 44.

7. Busing KH. Hyaluronidase inhibition by Echinacin. *Arzneimittel-Forschung*. 1952; 2: 467 - 9.

8. Viehmann P. Results of treatment with an Echinacea-based ointment. *Erfahrungsheilkunde* 1978; 27 (6): 353 - 8.

9. Blumenthal M, Goldberg A and Brinckmann J. Herbal Medicin, Expanded Commission E Monographs. Integrative medicine communications. Austin. 2000, pp: 96 - 7.

10. Cheminat A, Zawatzky R, Becker H and Brouillard R. Caffeoyl conjugates from *Echinacea* species: structures and biological activity. *Phytochem.* 1988; 27 (9): 2787 - 94.

11. Steinmuller C, Roesler J, Grottrup E, Franke G, Wagner H and Lohmann-Matthes ML. Polysaccharides isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea* enhance the resistance of immunosuppressed mice against systemic infections with *Candida albicans* and *Listeria monocytogens*. *Int. J. Immunopharmacol.* 1993; 15 (15): 605 - 14.

12. Stimpel M, Proksch A, Wagner H and Lohmann-Matthes ML. Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea. Infect. immun.* 1984; 46 (3): 845 - 9.

13. Luettig B, Steinmuller C, Gifford GE, Wagner H and Lohmann-Matthes ML. Macrophage activation by polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea. J. Natl. Cancer Inst*. 1989; 81: 669 - 75.

14. Roesler J, Emmendorffer A, Steinmuller C, Luttig B, Wagner H and Lohmann-Matthes ML. Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant *Echinacea purpurea* to test subjects mediates activation of the phagocyte system. *Int. J. Immunopharmacol.* 1991; 13 (7): 931 - 41.

15. Miller SC. Echinacea. CRC Press. London. 2004, pp: 93 - 109, 116.

16. Bergeron C, Livesey JF, Awang DVC, Arnason JT, Rana J, Baum BR and Lechtamo W. A quantitative HPLC method for the quality assurance of Echinacea products on the North American market. *Phytochem. Anal.* 2000; 11: 207 - 15.

17. Al-Farsi M, Alsalvar C, Morris A, Baron M and Shadih F. Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 7592 - 9.

18. Samsam shariat SH. Extraction of effective components of herbal medicine, determination and evaluation methods, Mani Press. Esfahan. Iran. 1371, pp: 12 - 13.

19. British Pharmacopoeia, Vol. IV, Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA). London. 2009, pp: 6939 - 42.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2009.8.32.17.4]