

بهینه‌سازی روش استخراج ماده اولیه دارویی هیوسین از گیاه بذربنچ

رضا غفارزادگان^۱، پریسا خدیویپارسی^۲، فرحناز خلیقی‌سیگارودی^۳، مرتضی پیرعلی‌همدانی^۴، زهره کدخدای^۵
شمسعلی رضازاده^{۳*}

۱- کارشناس ارشد مهندسی داروسازی، گروه فارماکوگنوزی و داروسازی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی،

کرج

۲- استادیار، دانشکده مهندسی شیمی، پردیس دانشکده‌های فنی، دانشگاه تهران، تهران

۳- استادیار، گروه فارماکوگنوزی و داروسازی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج

۴- استاد، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی

تهران، تهران

۵- دانشجوی کارشناسی ارشد، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج

*آدرس مکاتبه: کرج، کیلومتر ۵۵ آزادراه تهران - قزوین، شهرک تحقیقاتی کاوش، انتهای بلوار کاوش، مجتمع

تحقیقاتی جهاددانشگاهی، پژوهشکده گیاهان دارویی، تلفن: ۰۲۶۱-۴۷۶۴۰۱۰ (۰۲۶۱)، شماره: ۴۷۶۴۰۲۱ (۰۲۶۱)

پست الکترونیک: shrezazadeh@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸۹/۸/۲۰

تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۵

چکیده

مقدمه: گیاه بذربنچ از خانواده سیب‌زمینی یکی از گیاهان دارویی مهم می‌باشد که شامل تروپان آلکالوئیدها است. تروپان آلکالوئیدها یک گروه مشخص از متابولیت‌های ثانویه خانواده سیب‌زمینی هستند. گونه‌های هیوسیاموس منبع غنی از تروپان آلکالوئیدها هستند که به طور عمده شامل هیوسیامین و هیوسین (اسکوپولامین) می‌باشند که به صورت وسیعی به سبب خواص درمانی آنها مانند مدری، آنتی‌اسپاسمودیکی، آنتی‌کولینرژیکی، مسکن و آرام‌بخشی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بنابراین تعیین روشی بهینه برای استخراج هیوسین از گیاه بذربنچ امری ضروری است.

هدف: هدف از انجام این تحقیق، تعیین شرایط بهینه برای استخراج ماده مؤثره دارویی هیوسین از گیاه بذربنچ می‌باشد.

روش بررسی: سه فاکتور دمای استخراج، زمان استخراج و اندازه ذره‌ای گیاه با استفاده از روش طراحی باکس-بنکن سه سطحی مورد مطالعه قرار گرفت. مقدار هیوسین به دست آمده توسط دستگاه گاز کروماتوگراف مدل Younglin Acm 6000 اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج نشان دادند که بهترین شرایط عملیاتی برای استخراج هیوسین از گیاه بذربنچ شامل استخراج به کمک امواج مافوق صوت در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد با مش ۴۵ و در مدت زمان ۱۳۰ دقیقه می‌باشد که تحت این شرایط بالاترین مقدار هیوسین از گیاه استخراج می‌شود.

نتیجه‌گیری: برای استخراج ماده اولیه دارویی هیوسین از گیاه بذربنچ بایستی از شرایط عملیاتی ویژه‌ای که در تحقیق به دست آمده است استفاده شود.

کل واژگان: بذربنچ، سولاناسه، هیوسین، آلکالوئید



مقدمه

با افزایش مصرف داروهای با منشای گیاهی در جامعه در پی رویکرد جدی جامعه به این دسته از داروها، شرکت‌های داروسازی نیز به طور گسترده به تولید داروها و فرآورده‌های آرایشی - بهداشتی با منشای گیاهی روی آوردند. این مسأله سبب افزایش تقاضای مواد مؤثره گیاهان دارویی شده است. اگرچه در زمینه تولید مواد مؤثره گیاهی به روش سنتتیک پیشرفت‌هایی حاصل شده است ولی هنوز هم استخراج از منابع گیاهی تنها راه دستیابی به بسیاری از این مواد دارویی ارزشمند است. زیرا مواد مؤثره گیاهی یا به طور کلی ساختمان شیمیایی ناشناخته‌ای دارند و یا به دلیل برخورداری از ساختمان شیمیایی و یا چرخه‌های تولید بسیار پیچیده تولید آنها به روش سنتتیک در صنایع داروسازی مشکل و مستلزم هزینه بسیار زیاد است [۱،۲،۳].

گیاهان دارویی منابعی غنی از متابولیت‌های ثانویه هستند. در میان متابولیت‌های ثانویه گیاهان، آلكالوئیدها گروه مهمی را تشکیل می‌دهند [۴]. اولین بار واژه آلكالوئید به معنی شبه قلیا توسط یک داروشناس آلمانی به کار برده شد. بعدها مشخص شد که خاصیت قلیایی آنها به دلیل حضور یک اتم نیتروژن پایه می‌باشد [۵]. تاکنون بیش از ۵۰۰۰ نوع آلكالوئید در ۱۵ درصد از گیاهان متعلق به ۱۵۰ خانواده گیاهی شناخته شده است. بیشتر گونه‌های گیاهی تولیدکننده آلكالوئید از تیره‌های گیاهی سیب‌زمینی^۱، روناس^۲ و خشخاش^۳ هستند [۶،۷]. جنس هیوسیاموس از تیره سولاناسه دارای گونه‌های متعددی است که از میان آنها سه گونه *H. muticus*، *Hyoscyamus niger* و *H. albus* برای استخراج آلكالوئیدها به کار می‌روند [۸]. عمده‌ترین مواد مؤثره موجود در این جنس آلكالوئیدها هستند و غالب آلكالوئیدهای این جنس از گروه تروپانی هستند [۹]. چندین گیاه از تیره سیب زمینی به عنوان منبع غنی این آلكالوئیدها مورد استفاده قرار می‌گیرند. این آلكالوئیدها اساساً در ریشه‌های گیاه سنتز می‌شوند [۱۰،۱۱].

فعالیت‌هایی بیولوژیکی آلكالوئیدها در گیاهان به وضوح شناخته شده نیست اما مشخص شده است که آنها برای انجام چند فعالیت مختلف در گیاهان تولید می‌شوند به صورتی که نظریه‌های زیادی در این زمینه ارائه شده است [۱۲،۱۳].

مشخصه تروپان آلكالوئیدها یک گروه متیل متصل به اتم نیتروژن می‌باشد که این چنین ساختمانی در استیل کولین‌های انتقال‌دهنده امواج عصبی در اعصاب مغز نیز دیده می‌شوند، خاصیت بی‌هوش‌کنندگی و مسکن این آلكالوئیدها به همین دلیل می‌باشد [۱۴،۱۵].

آلكالوئیدهای تروپانی مانند آلكالوئیدهای هیوسیامین، آتروپین و اسکوپولامین (هیوسین) اساساً در گیاهان تیره سولاناسه یافت می‌شوند و از نظر داروشناسی به عنوان ترکیبات آنتی‌کلنرژیک گروه‌بندی می‌شوند [۱۵،۱۶].

آتروپین مخلوط راسمیک D و L- هیوسیامین می‌باشد که از راسمیزاسیون هیوسیامین در حین استخراج به دست می‌آید. بیشترین فعالیت فارماکولوژی هیوسیامین به ایزومر چپ‌گرد آن (L- هیوسیامین) نسبت داده می‌شود اسکوپولامین چپ‌گرد به هیوسین نیز معروف می‌باشد [۱۷].

هیوسیامین و اسکوپولامین دو آلكالوئید اصلی تروپان در گیاهان خانواده سیب‌زمینی هستند. این آلكالوئیدها بر روی سیستم عصبی پاراسمپاتیک عمل می‌کنند [۱۸،۱۱]. هیوسیامین و اسکوپولامین به عنوان داروهای مهارکننده اعصاب پاراسمپاتیک می‌باشند و در واقع آنتاگونیست رقابتی استیل کولین در گیرنده‌های موسکارینی می‌باشند [۱۹].

اسکوپولامین ارزشمندترین آلكالوئید تروپانی می‌باشد و با توجه به اینکه تقاضای جهانی آن حدود ۱۰ برابر بیشتر از هیوسیامین و فرم راسمیزه آن (آتروپین) است، تلاش‌های زیادی برای بهینه‌سازی تولید آن انجام شده است [۱۳].

در استخراج مافوق صوت از امواج صوتی جهت تسریع استخراج بهره گرفته می‌شود. مافوق صوت امواجی با فرکانس‌های بالاتر از ۲۰/۰۰۰ Hz هرتز می‌باشند. استفاده از امواج مافوق صوت سبب بالا رفتن کارایی استخراج مواد از گیاهان می‌شود [۲۰]. هدف از انجام این تحقیق، تعیین شرایط بهینه برای استخراج ماده مؤثره دارویی هیوسین از گیاه بذرالبنج

¹ Solanaceae² Rubiaceae³ Papaveraceae

می‌باشد. با توجه به اینکه در بین مواد موجود در گیاه، هیوسین (اسکوپولامین) از نظر دارویی به لحاظ مصرف و تنوع کاربرد در جایگاه ویژه‌ای قرار دارد، مقدار این ماده در عصاره گیاه به عنوان شاخص اصلی برای بهینه‌سازی شرایط استخراج در نظر گرفته شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی گیاه

اندام‌های هوایی گیاه بذربنج در ماه مرداد (جولای ۲۰۰۸) از منطقه مازندران جمع‌آوری و شناسایی و تعیین گونه گیاه توسط بخش هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی انجام پذیرفت. کد هرباریومی گیاه 1468 (IMPH) می‌باشد.

وسایل و مواد موردنیاز

استاندارد هیوسین-N- بوتیل برماید، معرف‌ها، سدیم سولفات انیدرید و حلال‌های مورد استفاده همگی از شرکت Merck خریداری شدند.

آماده‌سازی گیاه برای عملیات استخراج

در ابتدا سنگ‌ریزه‌ها و ناخالصی‌ها از گیاه جدا شد. سپس گیاه به مدت چند روز در شرایط سایه (به منظور جلوگیری از تجزیه مواد مؤثره گیاه) قرار گرفت تا خشک شود. بعد از اینکه از خشک شدن گیاه اطمینان حاصل شد، گیاه خشک شده به درون آسیاب ریخته شد تا به صورت کاملاً پودر درآید. آنگاه پودر حاصل از الک‌هایی با مش ۱۰، ۳۰ و ۵۰ عبور داده شد و پودرهایی با اندازه ذره‌ای مشخص در ظروف پلی‌اتیلنی جداگانه نگهداری شد.

عملیات استخراج

برای انجام استخراج مقدار ۱۰ گرم پودر گیاه با اندازه ذره‌ای مشخص به کمک ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شد و به داخل یک بالن ژوژه ۲۵۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد. سپس به بالن مذکور مقدار ۷۵ میلی‌لیتر کلروفرم، ۲۵ میلی‌لیتر متانول و ۵ میلی‌لیتر آمونیاک ۲۵ درصد افزوده شد. حال محتویات بالن به خوبی به هم زده شد و بالن به مدت

۱۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار داده شد. محلول به مدت معینی در دمای خاصی قرار گرفت محلول از روی کاغذ صافی عبور داده و روی کاغذ دو مرتبه و هر بار توسط ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم شستشو داده شد. سپس محلول به دست آمده که در یک بالن ۲۵۰ میلی‌لیتری جمع‌آوری شده به دستگاه تبخیرکننده دوار متصل می‌شود تا حلال موجود در عصاره حذف شود و عصاره‌ای غاری از حلال به دست آید.

پس از خارج کردن بالن از دستگاه مقدار ۵۰ میلی‌لیتر کلروفرم و ۲۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک یک نرمال به آن افزوده و کاملاً مخلوط شد. اسیدی کردن محیط باعث می‌شود تا آلکالوئیدها به شکل نمکی و باردار در آیند و در اثر استخراج مایع - مایع به فاز آبی منتقل شوند.

مخلوط به دست آمده را داخل دکانتور ریخته و به خوبی به هم زده می‌شود در این هنگام دکانتور به حالت سکون قرار داده و ملاحظه می‌شود که دو فاز تشکیل می‌شود.

فاز پایینی شامل کلروفرم و فاز بالایی شامل فاز آبی است. فاز کلروفرمی دور ریخته می‌شود و فاز آبی به یک بشر انتقال داده می‌شود و pH آن توسط آمونیاک ۲۵ درصد بر روی آب و یخ روی مقدار عددی ۱۱ - ۱۰ تنظیم می‌شود.

افزودن آمونیاک به محلول باعث می‌شود تا محیط قلیایی شود و آلکالوئیدها به شکل باز آزاد درآیند و بتوانند در اثر استخراج مایع - مایع به فاز کلروفرمی منتقل شوند.

حال این محلول قلیایی شده به داخل دکانتور ریخته می‌شود و آلکالوئیدها یک بار توسط ۲۰ میلی‌لیتر و سپس دو مرتبه توسط ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم استخراج می‌شود.

حال تمام فازهای کلروفرمی به دست آمده با هم مخلوط و به این مخلوط مقدار ۵ گرم سدیم سولفات انیدرید اضافه می‌شود تا آب موجود در مخلوط گرفته شود. سپس این مخلوط را صاف کرده و روی کاغذ صافی توسط ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم شستشو داده شد. کلروفرم به دست آمده توسط دستگاه تبخیرکننده دوار تبخیر شد. جامد به دست آمده که آلکالوئید تام نامیده می‌شود در ۱ میلی‌لیتر متانول گرید HPLC حل شد. محلول به دست آمده در یک ویال کوچک که قبلاً توسط متانول خالص شسته شده بود ریخته شد. بعد از ریختن



سدیم سولفات انیدرید، این محلول آماده برای تزریق به دستگاه GC است تا درصد و نوع ترکیبات در آن مشخص شود. دستگاه گاز کروماتوگرافی استفاده شده از نوع Younglin Acm6000 با ستون ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP بوده است. دمای اتافک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد و دتکتور مورد استفاده از نوع FID بوده است.

نتایج

بهینه‌سازی شرایط استخراج

همان‌طور که قسمت قبل ذکر شد در روش استخراج به کار گرفته شده در این تحقیق متغیرهای اندازه ذره‌ای، دما و زمان استخراج بیشترین تأثیر را دارا می‌باشند. به این ترتیب برای اندازه ذره‌ای مقدار مشخص‌های ۱۰، ۳۰ و ۵۰ و برای دما مقادیر ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد و برای زمان استخراج

مقادیر ۱، ۲ و ۳ ساعت انتخاب شد.

طراحی آزمایش بر اساس روش سطح پاسخ و بر اساس مدل باکس - بنکن انجام گرفت. بر اساس این مدل تعداد ۱۵ آزمایش پیشنهاد شده است که در نقطه مرکزی آزمایش ۳ بار تکرار شده است. نتایج طراحی آزمایش‌ها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

تمامی آزمایش‌ها به صورت کاملاً تصادفی^۱ انجام گرفته است و نتایج حاصل از آزمایش‌ها که همان مقدار آکالوئید هیوسین می‌باشد به عنوان پاسخ آزمایش^۲ به دست آمده است که نتایج آن در جدول شماره ۲ قابل مشاهده است.

اثر دمای استخراج

در این پژوهش ملاحظه شد که با افزایش دما تا مقدار مشخصی، بازده استخراج بالا می‌رود اما با افزایش بیشتر دما بازده استخراج به شدت افت می‌کند. شکل شماره ۱ تغییرات ماده مؤثره هیوسین را که در این تحقیق به عنوان بازده استخراج در نظر گرفته شده نسبت به افزایش دما نشان می‌دهد.

¹ Randomized ² Response

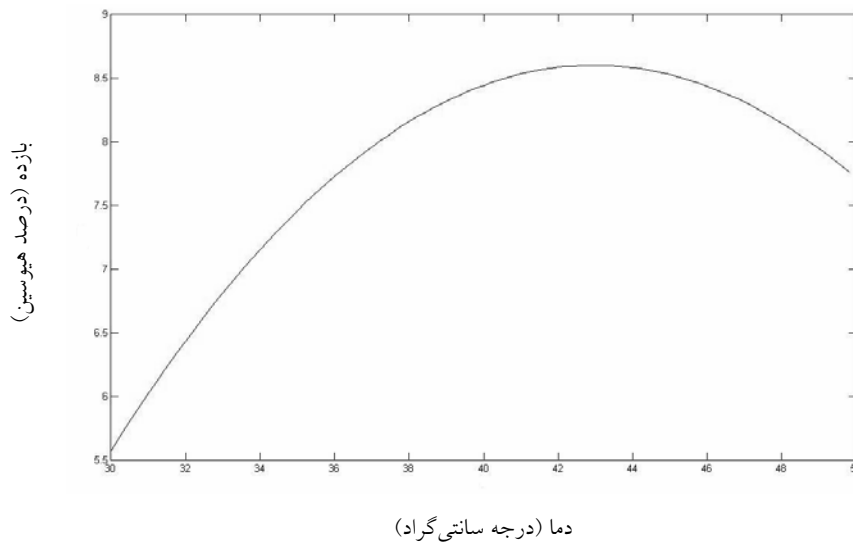
جدول شماره ۱- نتایج طراحی آزمایش بر اساس مدل باکس - بنکن

| اندازه ذره‌ای | زمان | دما | شماره آزمایش | شماره تصادفی |
|---------------|------|-----|--------------|--------------|
| ۰ | -۱ | -۱ | ۱ | ۱۰ |
| ۰ | -۱ | +۱ | ۲ | ۱ |
| ۰ | +۱ | -۱ | ۳ | ۵ |
| ۰ | +۱ | +۱ | ۴ | ۱۴ |
| -۱ | ۰ | -۱ | ۵ | ۱۱ |
| -۱ | ۰ | +۱ | ۶ | ۱۵ |
| +۱ | ۰ | -۱ | ۷ | ۶ |
| +۱ | ۰ | +۱ | ۸ | ۱۳ |
| -۱ | -۱ | ۰ | ۹ | ۳ |
| -۱ | +۱ | ۰ | ۱۰ | ۹ |
| +۱ | -۱ | ۰ | ۱۱ | ۲ |
| +۱ | +۱ | ۰ | ۱۲ | ۴ |
| ۰ | ۰ | ۰ | ۱۳ | ۱۲ |
| ۰ | ۰ | ۰ | ۱۴ | ۸ |
| ۰ | ۰ | ۰ | ۱۵ | ۷ |



جدول شماره ۲- نتایج حاصل از آنالیز نمونه‌ها

| شماره آزمایش | دما (درجه سانتی‌گراد) | زمان (ساعت) | اندازه ذره‌ای (مش) | پاسخ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) | پاسخ (درصد) |
|--------------|-----------------------|-------------|--------------------|------------------------------|-------------|
| ۱ | ۳۰ | ۱ | ۳۰ | ۴/۶۸ | ۰/۰۴۶۸ |
| ۲ | ۵۰ | ۱ | ۳۰ | ۶/۸۳ | ۰/۰۶۸۳ |
| ۳ | ۳۰ | ۳ | ۳۰ | ۵/۱۶ | ۰/۰۵۱۶ |
| ۴ | ۵۰ | ۳ | ۳۰ | ۶/۳۱ | ۰/۰۶۳۱ |
| ۵ | ۳۰ | ۲ | ۱۰ | ۴/۴۸ | ۰/۰۴۴۸ |
| ۶ | ۵۰ | ۲ | ۱۰ | ۵/۸۱ | ۰/۰۵۸۱ |
| ۷ | ۳۰ | ۲ | ۵۰ | ۵/۳۳ | ۰/۰۵۳۳ |
| ۸ | ۵۰ | ۲ | ۵۰ | ۷/۶۳ | ۰/۰۷۶۳ |
| ۹ | ۴۰ | ۱ | ۱۰ | ۶/۱۴ | ۰/۰۶۱۴ |
| ۱۰ | ۴۰ | ۳ | ۱۰ | ۶/۵۷ | ۰/۰۶۵۷ |
| ۱۱ | ۴۰ | ۱ | ۵۰ | ۷/۱۱ | ۰/۰۷۱۱ |
| ۱۲ | ۴۰ | ۳ | ۵۰ | ۷/۹۲ | ۰/۰۷۹۲ |
| ۱۳ | ۴۰ | ۲ | ۳۰ | ۸/۱۴ | ۰/۰۸۱۴ |
| ۱۴ | ۴۰ | ۲ | ۳۰ | ۸/۰۵ | ۰/۰۸۰۵ |
| ۱۵ | ۴۰ | ۴ | ۳۰ | ۷/۹۲ | ۰/۰۷۹۲ |



شکل شماره ۱- نمودار تغییرات هیوسین بر حسب دمای استخراج

اثر اندازه ذره‌ای گیاه

با توجه به اینکه افزایش سطح تماس مواد سبب افزایش غلظت ماده مؤثره استخراج شده می‌شود انتظار می‌رود که با بالا رفتن مش ذرات که در نتیجه همراه با کاهش اندازه ذرات است، غلظت هیوسین استخراج شده افزایش یابد. در اینجا برای مش‌های کوچک‌تر از مش حدود ۴۵ این انتظار برآورده می‌شود، ولی برای مش‌های بالاتر از مش ۴۵، نتیجه به دست

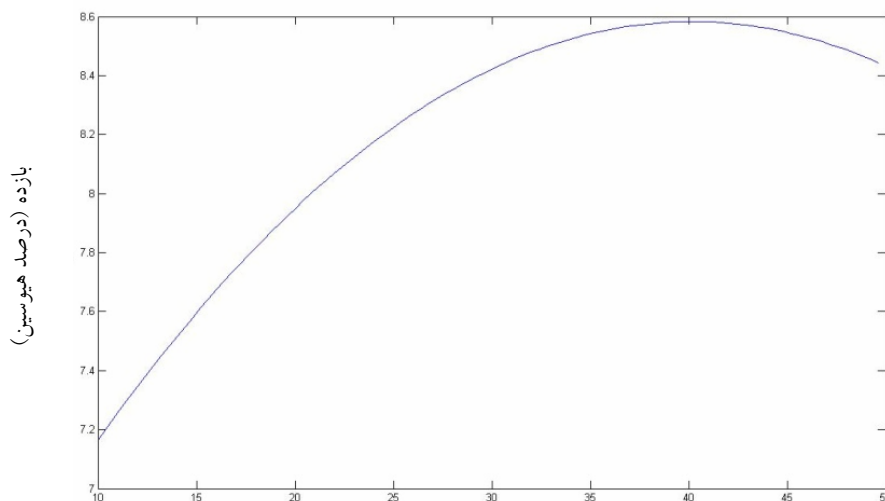
آمده عکس نتیجه مورد انتظار است. یعنی با افزایش مش، برای مش‌های بالاتر از حدود ۴۵، غلظت هیوسین استخراج شده کاهش می‌یابد. برای توجیه نتیجه به دست آمده، پدیده‌ای به نام کلوخه شدن در نظر گرفته می‌شود. نمودار تغییرات بازده استخراج نسبت به اندازه ذرات در شکل شماره ۲ نشان داده شده است.



اثر زمان استخراج

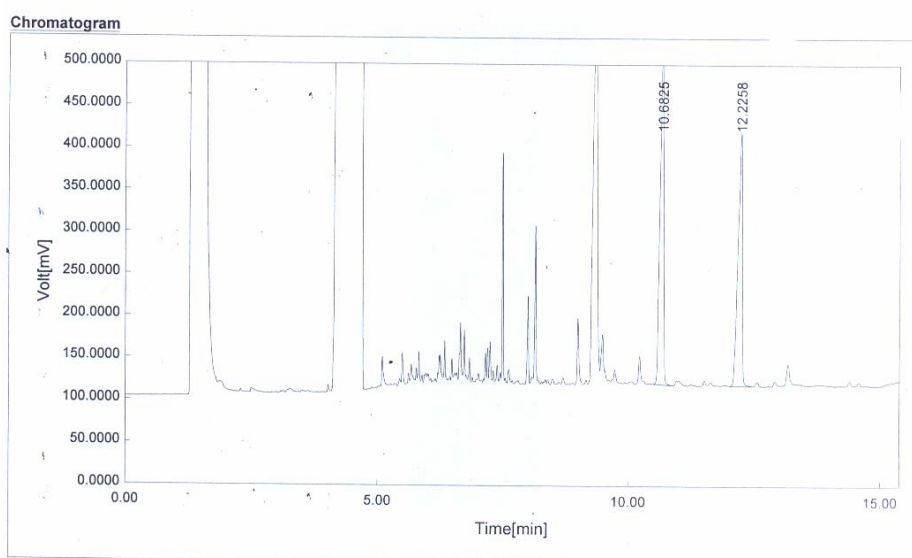
در این تحقیق برای بررسی اثر زمان بر روی استخراج، استخراج در زمان‌های ۳ و ۲۱ ساعت انجام شد. با توجه به محاسبات آماری صورت پذیرفته و به دست آوردن پارامتر آماری P مشخص شد که اثر زمان استخراج به اندازه دو متغیر

دیگر مشهود نمی‌باشد، اما بهتر است استخراج در زمان مناسب که برای هیوسین حدود ۱۳۰ دقیقه می‌باشد، انجام شود. در شکل شماره ۳ طیف هیوسین نشان داده شده است.



اندازه ذره‌ای (مش)

شکل شماره ۲- نمودار تغییرات هیوسین بر حسب اندازه ذره‌ای گیاه



شکل شماره ۳- طیف GC هیوسین در عصاره استخراج شده از گیاه بذربنچ



این معادله برای بیان میزان تأثیر پارامترها بر روی فرآیند قابل استفاده می‌باشد. شکل معادله بر حسب پارامترهای کد نشده در معادله شماره ۳ نشان داده شده است. معادله بالا بیان‌کننده ارتباط میان پاسخ (مقدار هیوسین) و متغیرهای مستقل دما بر حسب درجه سلسیوس، زمان بر حسب ساعت و اندازه ذره‌ای بر حسب مش در فرآیند استخراج می‌باشد.

بررسی آماری بر روی نتایج
بعد از طراحی آزمایش و انجام آزمایش‌ها نیاز به بررسی آماری روی داده‌های به دست آمده می‌باشد به این منظور از روش تحلیل واریانس^۱ (ANOVA) استفاده می‌شود. نتایج حاصل از تحلیل واریانس در جدول شماره ۳ مشاهده می‌شود. در ارتباط میان پارامترها و پاسخ به صورت یک معادله درجه دوم کامل^۲ به دست آورده شد. صورت کلی این معادله در معادله شماره ۱ نشان داده شده است. معادله شماره ۱ می‌تواند به دو صورت بیان شود: بر مبنای پارامترها به صورت کد شده (معادله شماره ۲) و بر مبنای پارامترها به صورت کد نشده (معادله شماره ۳).

¹ Analysis of Variance

² Quadratic Polynomial Equation

جدول شماره ۳ - تحلیل آماری نتایج اندازه‌گیری درصد هیوسین در عصاره

| منبع | مجموع مربعات | درجه آزادی | میانگین Square | مقدار F | مقدار P | توضیح |
|--------------------|--------------|------------|----------------|---------|----------|------------------------|
| <i>Model</i> | ۲۱/۸۰ | ۹ | ۲/۴۲ | ۴۶/۹۲ | ۰/۰۰۰۳ | <i>significant</i> |
| <i>A-T</i> | | ۱ | ۶ | ۱۱۶/۲۵ | ۰/۰۰۰۱ | |
| <i>B-time</i> | ۰/۱۸ | ۱ | ۰/۱۸ | ۳/۴۹ | ۰/۱۲۰۹ | |
| <i>C-S</i> | ۳/۱۱ | ۱ | ۳/۱۱ | ۶۰/۲۸ | ۰/۰۰۰۶ | |
| <i>AB</i> | ۰/۲۵ | ۱ | ۰/۲۵ | ۴/۸۴ | ۰/۰۷۹۱ | |
| <i>AC</i> | ۰/۲۳ | ۱ | ۰/۲۳ | ۴/۵۶ | ۰/۰۸۵۹ | |
| <i>BC</i> | ۰/۰۳۶ | ۱ | ۰/۰۳۶ | ۰/۷ | ۰/۴۴۱۲ | |
| <i>A^2</i> | ۱۰/۷۵ | ۱ | ۱۰/۷۶ | ۲۰۸/۳۷ | < ۰/۰۰۰۱ | |
| <i>B^2</i> | ۱/۲۶ | ۱ | ۱/۲۶ | ۲۴/۴۴ | ۰/۰۰۴۳ | |
| <i>C^2</i> | ۰/۹۸ | ۱ | ۰/۹۹ | ۱۹/۱۲ | ۰/۰۰۷۲ | |
| <i>Residual</i> | ۰/۲۵ | ۵ | ۰/۰۵۲ | | | |
| <i>Lack of Fit</i> | ۰/۲۳ | ۳ | ۰/۰۷۸ | ۶/۳۷ | ۰/۱۳۸۷ | <i>not significant</i> |
| <i>Pure Error</i> | ۰/۰۲۴ | ۲ | ۰/۰۱۲ | | | |
| <i>Cor Total</i> | ۲۲/۰۶۴ | ۱۴ | | | | |

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 - 1 \text{ معادله شماره ۱}$$

$$Y = 8.04 + 0.87x_1 + 0.15x_2 + 0.62x_3 - 0.25x_1x_2 + 0.24x_1x_3 - 1.71x_1^2 - 0.58x_2^2 - 0.52x_3^2 - 2 \text{ معادله شماره ۲}$$

$$28.02 + 1.46x_1 + 3.48x_2 + 0.06x_3 - 0.025x_1x_2 + 1.21 \times 10^{-3}x_1x_3 - 0.017x_1^2 - 0.58x_2^2 - 1.29 \times 10^{-3}x_3^2 - 3 \text{ معادله شماره ۳}$$



بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات بسیاری در زمینه استخراج و شناسایی مواد مؤثره گیاهان دارویی انجام گرفته است. همچنین استخراج و شناسایی مواد تشکیل‌دهنده بذرالبنج به روش‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است. اما بررسی اثر پارامترهای مؤثر بر راندمان فرآیند استخراج و مدل‌سازی معادله حاکم بر استخراج هیوسین از گیاه بذرالبنج با توجه به اهمیت بسیار زیاد آن برای اولین بار در این تحقیق مورد توجه قرار گرفت. متغیرهای مستقل در این معادله شامل دمای استخراج، زمان استخراج و اندازه ذره‌ای می‌باشند و متغیر وابسته مقدار هیوسین استخراج شده است. نقطه بیشینه این معادله نشان‌دهنده بالاترین مقدار متغیر وابسته (میزان هیوسین) است. به همین علت این نقطه تعیین شد. نقطه بیشینه معادله در دمای ۴۲/۸۲ درجه سانتی‌گراد و زمان استخراج ۱۲۹/۶ دقیقه و با اندازه ذره‌ای مش

۴۳/۲۶ است. در این نقطه مقدار هیوسین استخراج شده بیشترین مقدار خود را از نظر تئوری دارا می‌باشد که مقدار آن در این نقطه برابر ۸/۳۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است. بعد از تعیین این نقطه، آزمایش در نزدیک‌ترین و قابل دسترس‌ترین شرایط به این نقطه انجام گرفت. به این منظور آزمایش در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد و با اندازه مش ۴۵ و در زمان ۱۳۰ دقیقه انجام شد. تحت این شرایط دیده شد که مقدار هیوسین استخراج شده ۸/۳۶ می‌باشد که با مقدار پیش‌بینی شده اختلاف اندکی دارد.

تشکر و قدردانی

در اینجا از همکاری اعضای پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی علی‌الخصوص گروه فارماکونوزی و داروسازی در انجام این تحقیق تشکر می‌شود.

منابع

1. Farsi M, Zolala J. Plant biotechnology. (in Persian). ACECR- Mashhad Branch Publication. 2003, 87 - 120.
2. Starmans D, Nijhuis H. Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. *Trends in Food Sci & Technol*. 1996; 7: 191 - 7.
3. Verpoorte R, Memelink J. Engineering Secondary metabolite production in plants. *Crop in Biotechnol*. 2002; 8: 181 - 7.
4. Cordell, G. A.; Introduction to alkaloids. John Willey and Sons, New york, 1981, pp: 567.
5. Kumar J, Gupta PK. Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnol Rep*. 2008; 2: 93 - 112.
6. Hughes E, shanks J. metabolic engineering of plants for alkaloid production. *Metab Eng*. 2001; 4: 41 - 8.
7. Leete E. Recent development in the biosynthesis of Tropane alkaloids *Planta Med*. 1990; 56: 339 - 52.
8. Bown D. Encyclopedia of Herbs and their uses. Dorling Kindersley. UK. 1995, pp: 295.
9. Parr AJ, payne J, Eagles J, Chapman T, Robins RJ, Rhodes MJ. Variation in Tropane alkaloid accumulation. *Phytochem*. 1990; 29: 2545 - 50.
10. Klan Z. Influence of period of vegetative and development of plant on the alkaloidal Content of *Hyoscyamus niger*. *J. Amer. Pharm. Assoc*. 1931; 20: 1163 - 75.
11. Nyman S, soderman A and Simola LK. Metabolism of Arginine and Ornithin in suspension- Cultured cells and Aseptic roots of intact plants of *Atropa belladonna*. *J. of Experimental Botany* 1993; 44: 869 - 77.
12. Hashimoto T, Yun D, Yamada Y. Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. *Phytochem*. 1993; 42: 713 - 8.
13. Hashimoto T, Yamada Y. Alkaloid biogenesis:



molecular aspects. *Annu. Rev. Plant Phys.* 1994; 45: 257 - 85.

14. Lea PJ and Leegood R. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley. Chichester 1999, pp: 385 - 400.

15. Milen I, Atanas I, Pavlov B. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 74: 1175 - 85.

16. Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier A. Production of secondary metabolites: a historical perspective *Plant Sci.* 2001; 161: 839 - 51.

17. Manske RHF and Holmes HL. *The alkaloids chemistry and physiology*. Academic Press Inc.

Publishers. New York. 1950.

18. Nussbaumer P, Kapetanidis I. and Christen Ph. Hairy roots of *Datura candida* X *D. aurea*: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Reports* 1998; 17: 405 - 9.

19. Kutchan TM. Alkaloid biosynthesis- The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell* 1995; 7: 1059 - 70.

20. Huie CW. A Review of Modern Sample-Preparation Techniques for the Extraction and Analysis of Medicinal Plants, *Anal. Bioanal. Chem.* 2002; 373: 23 - 30.

