DOI: http://dx.doi.org/10.22104/jift.2017.452

فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، سال چهارم، شماره ۱۶، صفحه ۱۲-۱، تابستان ۱۳۹۶

بهینه‌سازی استخراج کورکومین از زردچوبه (*کورکوما لونگا*) با استفاده از مایعات یونی کربماتی به‌عنوان حلال سبز

فوزیه صحنه[1]، مائده السادات محمدی[2*]، قاسم نجف‌پوردرزی[3]، علی اکبر مقدم‌نیا[4]

1. دانشجوی دکتری، مرکز پژوهشی بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل
2. استادیار، مرکز پژوهشی بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل
3. استاد، مرکز پژوهشی بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل
4. استاد، بخش داروسازی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

(تاریخ دریافت: **95/10/4**، تاریخ پذیرش: **95/11/11**)

چکیده

استفاده از روش‌های نوین برای استخراج ترکیبات موثره گیاهان دارویی توجه ویژه‌ای را در سال‌های اخیر به خود جلب کرده است. مایعات یونی تمایل بسیار زیادی برای حل‌کردن ترکیبات آلی از خود نشان داده‌اند و از جمله حلال‌های سبز برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال گیاهی به‌شمار می‌روند. در این پژوهش، ابتدا N,N-دی‌پروپیل آمونیوم N´,N´-دی‌پروپیل کربمات (DPCARB) و N,N-دی‌اتیل آمونیوم N´,N´-دی‌اتیل کربمات (DECARB) با استفاده از یخ خشک و آمین نوع دوم، به‌ترتیب دی‌پروپیل آمین و دی‌اتیل آمین، سنتز و سپس برای استخراج کورکومین، ترکیب زیست‌فعال زردچوبه، به‌کار گرفته شدند. سپس، استخراج کورکومین با استفاده از DPCARB و DECARB سنتز شده، در دماهای 15، 25، 35 و 45 °C و زمان‌های مختلف استخراج به مدت 1، 3، 6 و 8 ساعت بررسی گردید. با توجه به نتایج حاصل، بالاترین بازده استخراج کورکومین با استفاده از DPCARB و DECARB در دمای 25 °C و زمان 3 ساعت، به‌ترتیب 3/86 و 3/16٪ به‌دست آمد. هم‌چنین خلوص کورکومین استخراج شده با استفاده از DPCARB بر اساس آنالیز HPLC، حدود 85٪ تعیین گردید. نتایج نشان داد که مایعات یونی سنتز شده بازده استخراج خوبی در دمای محیطی و زمان استخراج به‌نسبت کوتاه داشتند؛ هم‌چنین، خلوص بالای کورکومین استخراج شده نشان دهنده گزینش پذیری بالای این حلال‌ها نسبت به کورکومین در مقایسه با سایر ترکیبات آلی موجود در ساختار زردچوبه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کورکومین، مایع یونی کربماتی، زردچوبه، استخراج.

* نویسنده مسئول: m.mohammadi@nit.ac.ir

1- مقدمه

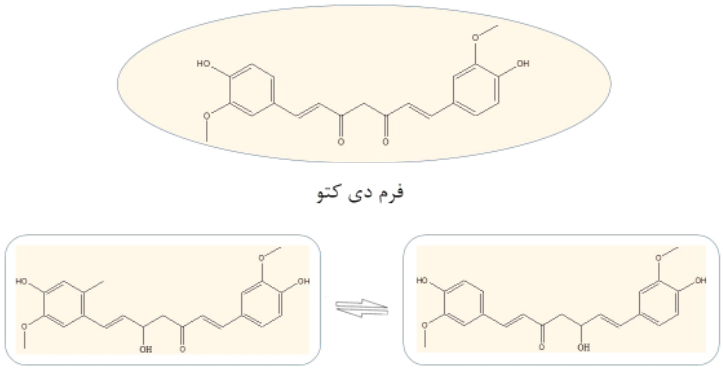
در طول چند دهه اخیر گسترش تحقیقات در زمینه پزشکی و علوم مختلف باعث رشد چشمگیری در کشف و بررسی ترکیبات زیست‌فعال دارویی شده است. یکی از این ترکیبات کورکومین نام دارد که اولین بار در سال 1842 توسط ووگل از ریشه گیاه *کورکوما لونگا*[1] استخراج گردید [1، 2]. زردچوبه که در واقع همان ساقه زمینی (ریزوم) *کورکوما لونگا* می‌باشد، به‌صورت سنتی به‌عنوان ادویه و رنگ دهنده غذایی استفاده می‌شود [3]. زرچوبه هم‌چنین نقش مهمی را در طب سنتی در میان کشورهای آسیای جنوب شرقی داشته و به‌عنوان عامل تسکین‌دهنده زخم و تورم از هزاران سال پیش در کشورهای چین و هند به‌کار گرفته می‌شد [4]. این خصوصیات بارز، به‌دلیل وجود کورکومین در ساختار زردچوبه می‌باشد که به‌عنوان یک ترکیب زیست‌فعال شناخته شده است [5]. ریشه گیاه *کورکوما لونگا* به‌طور متوسط دارای 9-2٪ کورکومین می‌باشد. کورکومین که نام شیمیایی آن دی فرولویل متان است، یک ترکیب پلی‌فنلی کریستالی زرد رنگ می‌باشد. کورکومین به‌طور طبیعی به همراه دو ترکیب دیگر، دمتوکسی کورکومین و بیس دمتوکسی کورکومین وجود دارد که این سه ترکیب با هم، کورکومینوئید[2] نامیده می‌شوند [6]. ساختار کورکومین متشکل از دو حلقه فرولیک اسید می‌باشد که با یک زنجیره آلفا-بتا دی‌کتون به هم متصل شده‌اند. انول و کتو دو ایزومر پایدار کورکومین هستند که دارای پیوند هیدروژنی می‌باشند و با تغییر pH محیط تغییر می‌یابند (شکل 1) [7، 8].

1. *Curcuma longa*
2. Curcuminoids

مطالعات انجام شده بر روی فعالیت‌های بیولوژیکی کورکومین نشان داده است که این ترکیب دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی بالقوه‌ای می‌باشد. خواص درمانی کورکومین مربوط به گروه‌های فنلی، بتا-دی کتو و گروه‌های متوکسی می‌باشد. کورکومین می‌تواند با تغییر مکان الکترون‌های اکسیژن کربونیل گروه انول موجود در ساختار آن، به‌عنوان دهنده رادیکال عمل کند و نقش مهمی را در جاروب‌کردن رادیکال‌های آزاد ایفا کند؛ این عمل می‌تواند از بیماری‌های آلزایمر و پارکینسون جلوگیری کند. از دیگر خواص بارز کورکومین تاثیر بر روی مسیرهای سیگنالی فاکتور هسته‌ای kB (فاکتور رونویسی در بسیاری از یوکاریوت‌ها برای تنظیم ژن، که فعالیت این فاکتور باعث ایجاد تورم و در نتیجه تکثیر و ایجاد سلول‌های توموری می‌شود) است که می‌تواند از تورم، ایجاد و رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری به‌عمل آورد [9]. کورکومین می‌تواند با بسیاری از مولکول‌های بیولوژیکی مثل سیتوکین‌های توموری، فاکتورهای رونویسی، کینازها، آنزیم‌ها، گیرنده‌ها، فاکتورهای رشد، پروتئین‌ها و سایر لیگاندها برهم‌کنش دهد [10].

شرط لازم برای فعالیت‌های بیولوژیکی کورکومین در بدن انسان، دسترسی‌زیستی[1] آن می‌باشد. این در حالی است که بیش از 90٪ کورکومین به‌دلیل جذب پایین در روده و متابولیسم سریع در کبد، بدون تغییر از طریق کیسه صفرا همراه با مدفوع دفع می‌شود. بنابراین محققین به دنبال روش‌هایی برای به‌کارگیری این ترکیب فعال گیاهی و افزایش دسترسی‌زیستی آن هستند [11]. مطالعات کمی و کیفی بر

1. Bioavailability



شکل (1) ساختار شیمیایی کورکومین و ایزومرهای آن

روی کورکومین به انتخاب روش‌های مناسب استخراج بستگی دارد. استخراج کورکومین با استفاده از حلال‌های آلی بسیار زمان‌بر بوده و نیازمند استفاده از مقدار زیادی حلال در دمای عملیاتی بالا می‌باشد که در نهایت باعث آلودگی محیط زیست و بازدهی پایین می‌شود [12]. با توجه به این مشکلات استفاده از روش‌های نوین به‌دلیل مصرف اندک مواد شیمیایی آلی و سنتزی، زمان استخراج کوتاه و کیفیت و بازده بالای محصول بسیار گسترش پیدا کرده است [13]. در طول دهه گذشته، مایعات یونی کربناتی به‌دلیل خواص فیزیکی-شیمیایی برجسته مثل فشار بخار پایین، سمیت و اشتعال‌پذیری پایین و فعالیت‌های بیولوژیکی جایگاه ویژه‌ای را در زمینه استخراج به خود اختصاص داده‌اند [14].

مایعات یونی نمک‌های ذوب شده متشکل از آنیون و کاتیون می‌باشند که بر حسب نوع ترکیب شدن آن‌ها باهم، مایعات یونی با ساختارهای مختلف حاصل می‌شود که فقط انواع بسیار اندکی از آن‌ها دارای خواص فیزیکی-شیمیایی مناسب به‌عنوان حلال می‌باشند. مایعات یونی کربناتی زیرمجموعه‌ای از مایعات یونی می‌باشند که با اضافه کردن دی‌اکسیدکربن جامد به آمین نوع دوم در حمام آب صفر درجه حاصل می‌گردند که به‌طور معمول مایعاتی بی‌رنگ می‌باشند. محصول واکنش، بسته به نوع آمین مورد استفاده، N,N-دی آلکیل آمونیوم N´,N´-دی آلکیل کربمات نامیده می‌شود. این حلال‌ها، بسته به نوع آمین اولیه و وزن مولکولی آن، می‌توانند مایع و یا گاز باشند که با تغییر نسبت مولی آمین و دی‌اکسیدکربن جامد به‌صورت مایع حاصل می‌شوند. تحقیقات نشان داده است که خاصیت بارز مایعات یونی کربناتی، ظرفیت بالای آن‌ها در حلالیت ترکیبات آلی می‌باشد [13]. هم‌چنین مایعات یونی کربناتی را می‌توان پس از استخراج، بدون فروپاشی در دماهای پایین تقطیر نمود [15]. توجه به این نکته ضروری است که فقط انواع خیلی محدودی از آمین‌های نوع دوم مثل N-اتیل N پروپیل آمین، N-اتیل N-بوتیل آمین، بنزیل متیل آمین و دی‌پروپیل آمین و غیره برای سنتز مایعات یونی کربناتی مناسب می‌باشند، سایر آمین‌های سبک‌تر مانند اتیل متیل آمین و متیل پروپیل آمین به‌دلیل اشتعال‌پذیری و فراریت بالا به‌کار گرفته نمی‌شوند [16].

انواع مختلفی از مایعات یونی کربناتی توسط ویجایاراواگان و مک‌فارلان [13] برای استخراج کورکومین از زردچوبه سنتز شد. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که بازده استخراج به‌دست آمده با استفاده از این نوع حلال‌ها حدود 2/5 برابر بیش‌تر از حلال‌های آلی بوده است. در این مطالعه، سنتز N,N-دی‌پروپیل آمونیوم N´,N´-دی‌پروپیل کربمات (DPCARB) و N´,N´-دی‌اتیل آمونیوم N´,N´-دی‌اتیل کربمات (DECARB) انجام گردید. استخراج کورکومین با استفاده از مایعات یونی کربناتی سنتز شده به‌عنوان حلال استخراجی انجام شد. پارامترهای زمان و دمای استخراج کورکومین برای حلال‌های سنتز شده بررسی گردید و بازده استخراج کورکومین پس از خالص‌سازی آن تعیین گردید. هم‌چنین به‌منظور تعیین حداکثر کورکومین موجود در زردچوبه از روش سوکسله که به‌عنوان یکی از روش‌های مرجع برای مقایسه بازده استخراج می‌باشد، استفاده گردید.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

ساقه زمینی (ریزوم) گیاه زردچوبه از بازار محلی مشهد خریداری شد. کورکومین استاندارد (شماره‌ی کد 820345)، دی‌پروپیل آمین، دی‌اتیل آمین و متانول از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. دی‌اکسیدکربن جامد از شرکت واحد زرین (کرج، تهران) تهیه شد.

2-2- روش‌ها

2-2-1- آماده سازی پودر زردچوبه

زردچوبه خریداری شده در آون در دمای 70°C به مدت 24 ساعت خشک شد و سپس با استفاده از آسیاب به‌صورت پودر درآورده شد. پودر به‌دست آمده با استفاده از الک با مش‌های سایز 80-40 الک شد تا پودر با توزیع ذرات یکنواخت با اندازه 0/42-0/18 میلی‌متر به‌دست آید. پودر به‌دست آمده به‌منظور جلوگیری از جذب رطوبت در یخچال نگه‌داری گردید.

2-2-2- سنتز مایع یونی کربناتی

برای سنتز مایع یونی کربناتی، دی‌اکسیدکربن جامد (یخ خشک) به آرامی با نسبت مولی 1 به 2 به‌صورت جداگانه با دی‌پروپیل آمین و دی‌اتیل آمین در حمام آب یخ مخلوط

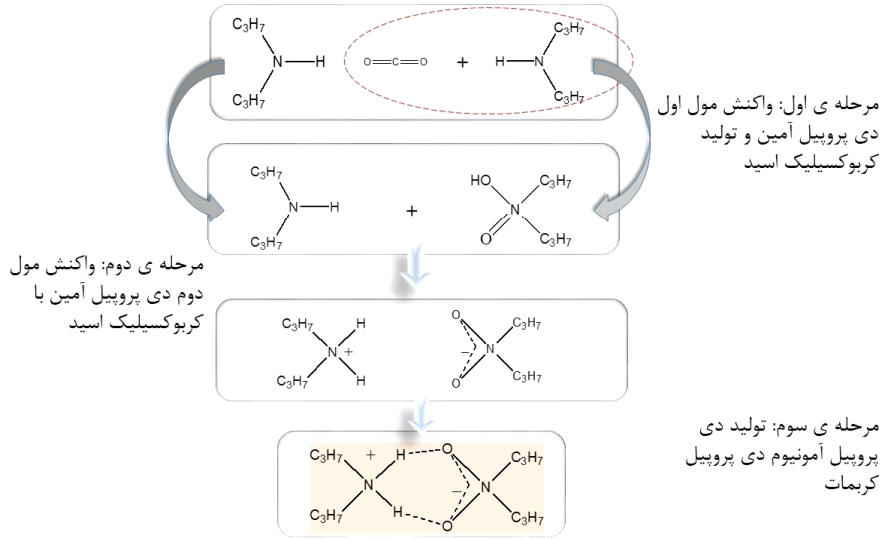
شد و به مدت چند دقیقه بر روی همزن مغناطیسی هم زده شد. روی فلاسک ارلن مایر حاوی نمونه با درپوش مناسبی بسته شده تا از تبخیر دی‌اکسیدکربن در حین واکنش جلوگیری شود. با اتمام واکنش، مخلوط به حالت ژل مانند درآمده و ویسکوزیته به‌صورت ناگهانی افزایش یافت که نشان دهنده پایان واکنش بود. مایعات یونی کربماتی سنتز شده، N,N-دی‌پروپیل آمونیوم N´,N´-دی‌پروپیل کربمات (DPCARB) و N,N-دی‌اتیل آمونیوم N´,N´-دی‌اتیل کربمات (DECARB) نامیده شدند. بر اساس نتایج حاصل از استخراج، مشخصات مایع یونی کربماتی با بازده استخراج بالاتر با آنالیز FT-IR بررسی شد. هم‌چنین دانسیته و ویسکوزیته نیز به‌ترتیب با پیکنومتر و ویسکومتر اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری قابلیت مخلوط شدن با آب نیز، حجم‌های مساوی از مایعات یونی کربماتی و آب با هم مخلوط شدند [13]. شمای کلی واکنش سنتز مایع یونی کربماتی DPCARB در شکل (2) نشان داده شده است.

2-2-3- استخراج کورکومین با استفاده از مایعات یونی سنتز شده

کورکومین موجود در زردچوبه با استفاده از مایعات یونی کربماتی سنتز شده در مرحله قبل استخراج شد. در این آزمایشات، یک گرم پودر زردچوبه خشک با 30 گرم از مایع یونی کربماتی مخلوط شد و سپس در شیکر انکوباتور در دمای 45-15 °C به مدت 8-1 ساعت همزده شد. پس از آن، مخلوط در مکانی ساکن شده و مایع رویی با استفاده از سیستم میلی‌پور فیلتر گردید. مایع فیلتر شده با استفاده از دستگاه تبخیر روتاری تحت خلا در دمای 40 °C تقطیر و مایع یونی کربماتی بازیافت گردید. اولئورزین به‌دست آمده از فرایند استخراج با روش ستون کروماتوگرافی مایع خالص‌سازی شد تا کورکومین با خلوص بالا به‌دست آید. برای اطمینان از تکرارپذیری نتایج استخراج کورکومین از زردچوبه با استفاده از مایعات یونی، بیش‌تر آزمایشات دوبار تکرار گردیدند؛ عدم قطعیت نتایج 2±٪ بود.

2-2-4- خالص سازی کورکومین از اولئورزین

به‌منظور خالص سازی کورکومین استخراج‌شده، از روش ستون کروماتوگرافی مایع استفاده گردید. ستون کروماتوگرافی با جاذب سیلیکاژل با مساحت سطح 500 مترمربع بر گرم پر شد. سپس، مقدار 50 میلی گرم از اولئورزین به‌دست آمده در مقدار مشخصی از دی کلرومتان حل شد و در دمای 40 °C تبخیر گردید؛ سپس در 10 میلی‌لیتر متانول حل شد و در بالای ستون کروماتوگرافی قرار داده شد. قطبیت حلال با استفاده از n-هگزان تغییر داده شد. پس از گذشت مدت زمان معین لایه‌های مختلفی در ستون ظاهر شد. با جداسازی لایه‌ها و با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک، کورکومین خالص شناسایی گردید. خلوص کورکومین استخراج شده و بازده



شکل (2) شمای کلی واکنش سنتز مایع یونی کربماتی DPCARB در شرایط محیطی

استخراج با آنالیز HPLC تعیین گردید.

2-2-5- استخراج کورکومین با روش سوکسله

روش سوکسله یکی از روش‌های قدیمی و سنتی استخراج می‌باشد که اولین بار توسط شیمیدان آلمانی فرنز ریتر سوکسله پیشنهاد شد و به‌عنوان یکی از روش‌های مرجع برای مقایسه و ارزیابی میزان بازدهی روش‌های جدید به‌کار گرفته می‌شود [17]. دستگاه استخراج کننده سوکسله ابتدا فقط برای استخراج چربی‌ها طراحی گردید، ولی امروزه به‌طور گسترده برای استخراج بیش‌تر ترکیبات زیست‌فعال از منابع گیاهی مختلف از جمله کورکومین به‌کار گرفته می‌شود. هم‌چنین از آن به‌عنوان روش مرجعی برای مقایسه با روش‌های جدید استخراج استفاده می‌شود. در این مطالعه، برای تعیین حداکثر کورکومین موجود در زردچوبه از روش سوکسله استفاده شد. بدین منظور، 15 گرم پودر زردچوبه با توزیع ذرات یکنواخت 0/18 میلی‌متر در داخل کارتوش مخصوص دستگاه سوکسله ریخته شده و سپس درون دستگاه قرار داده شد. استون با حجم 350 میلی‌لیتر به‌عنوان حلال استخراج استفاده گردید. فرایند استخراج در دمای 60 °C و به مدت 8 ساعت انجام گردید. با اتمام فرایند استخراج، استون با استفاده از دستگاه تبخیر روتاری تحت خلا تبخیر شد. اولئورزین به‌دست آمده خالص‌سازی شده و مقدار کورکومین آن با HPLC اندازه‌گیری گردید.

2-2-6- روش‌های آنالیز

آنالیزهای کمی برای تعیین بازده استخراج و خلوص کورکومین استخراج شده با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) انجام شد. دستگاه مجهز به ستون 18C با ابعاد 4/6×250 میلی‌متر همراه با پیش‌ستون، سیستم پمپاژ و آشکارساز فرابنفش (UV) بود. فاز متحرک متشکل از استونیتریل و آب با نسبت 90/10 بود. برای به‌دست آوردن منحنی استاندارد کورکومین، ابتدا محلول‌هایی با غلظت‌های 10، 8، 5، 2/5 میلی‌گرم بر لیتر ساخته شد و به دستگاه تزریق گردید. برای تعیین غلظت کورکومین استخراج شده، غلظت مشخصی از اولئورزین به‌دست آمده، مثلا 5 میلی‌گرم بر لیتر ساخته شد و به دستگاه تزریق شد. مقدار واقعی کورکومین موجود در اولئورزین با استفاده از سطح زیر نمودار به‌دست آمده و معادله منحنی استاندارد محاسبه شد.

از آنالیز طیف سنج مادون قرمز(FTIR) (Perkin-Elmer ساخت آلمان) در محدوده‌ی cm^{-1} 4000-400 برای اثبات سنتز مایع یونی کربماتی استفاده شد. هم‌چنین محلول استخراجی به‌منظور اثبات وجود کورکومین با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Vis (Analytic Jena آلمان) آنالیز شد.

3- نتایج

3-1- استخراج کورکومین با استفاده از DPCARB و DECARB

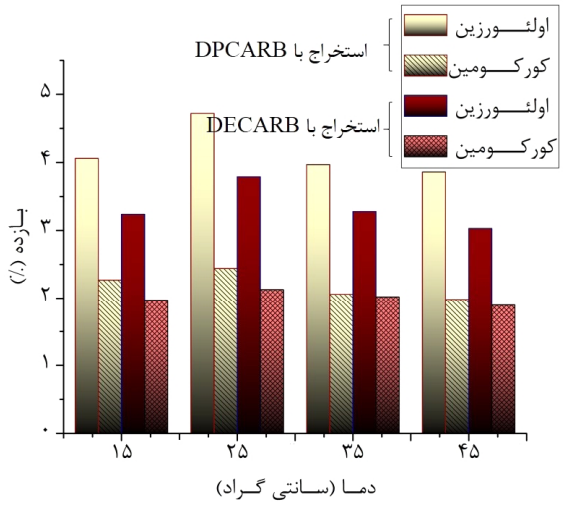
مایعات یونی سنتز شده در این مطالعه DPCARB و DECARB بودند که از واکنش دو مول آمین نوع دوم (دی‌پروپیل آمین، دی‌اتیل آمین) با یک مول دی‌اکسیدکربن جامد (یخ خشک) به‌دست آمدند. معادله کلی واکنش انجام شده به‌صورت زیر می‌باشد:

$$NHR_2 + CO_2 \quad \Leftrightarrow \quad R_2NCOOH \qquad (1)$$

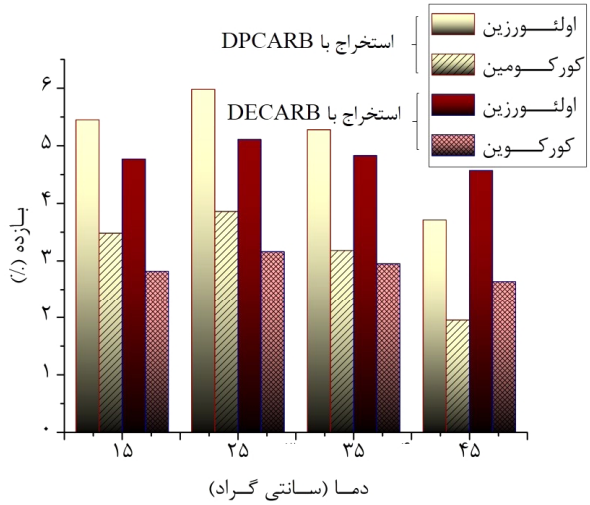
$$NHR_2 + R_2NCOOH \quad \Leftrightarrow \quad [R_2NH_2][OCOONR_2] \qquad (2)$$

در مرحله اول، یک مول دی‌پروپیل آمین و دی‌اتیل آمین با دی‌اکسیدکربن جامد واکنش داده و کربوکسیلیک اسید تشکیل می‌شود؛ در مرحله دوم، کربوکسیلیک اسید تولید شده با مول دوم آمین واکنش می‌دهد و به کاتیون دی‌پروپیل آمونیوم و آنیون دی‌پروپیل کربمات و کاتیون دی‌اتیل آمونیوم و آنیون دی‌اتیل کربمات تبدیل می‌شود [13]. سپس کورکومین با استفاده از مایعات یونی سنتزشده استخراج گردید.

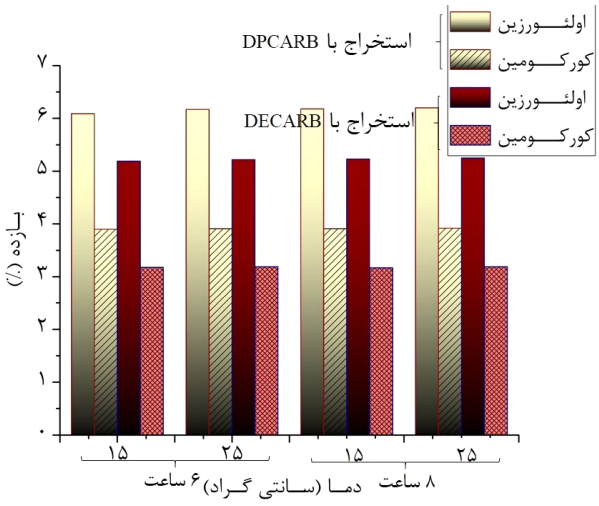
دما و زمان طولانی استخراج از جمله معایب استخراج با استفاده از روش‌های سنتی مانند سوکسله و یا استفاده از حلال‌های آلی مانند اتانول و استون می‌باشند؛ برای حل این مشکلات، استخراج کورکومین با استفاده از DPCARB و DECARB سنتز شده انجام شد. تاثیر دمای استخراج (15، 25، 35 و 45 °C) و زمان استخراج (1، 3، 6 و 8 ساعت) بر روی بازده استخراج کورکومین بررسی گردید و نتایج در شکل (3) گزارش شد.



(الف)



(ب)



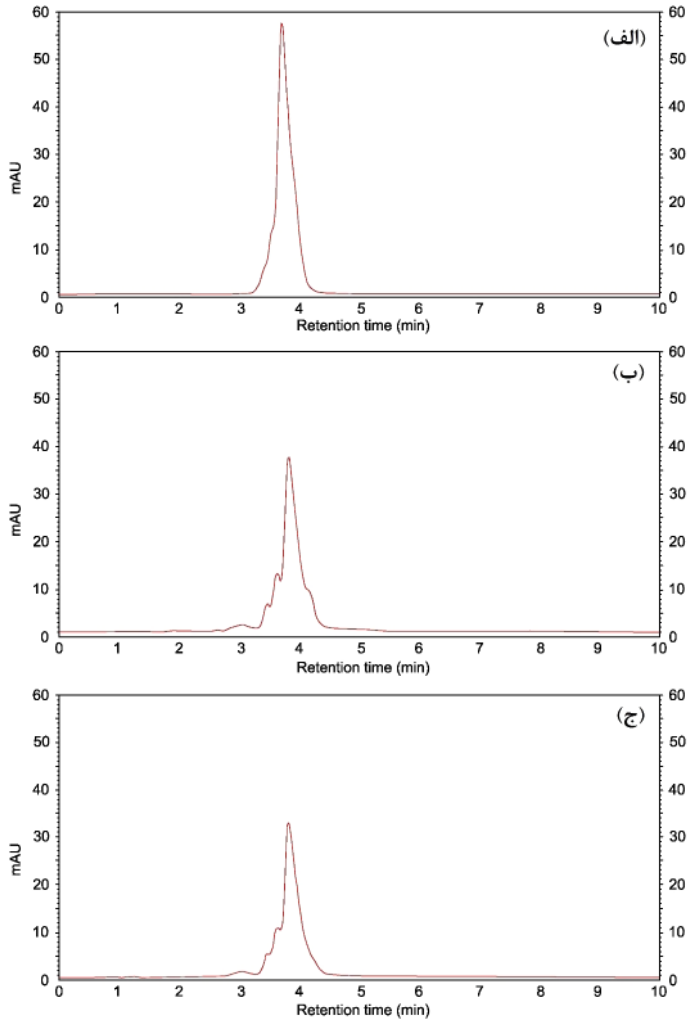
(ج)

شکل (3) نتایج حاصل از استخراج کورکومین با استفاده از DPCARB و DECARB سنتزشده در شرایط مختلف: الف) زمان استخراج 1 ساعت، ب) زمان استخراج 3 ساعت و ج) زمان‌های استخراج 6 و 8 ساعت

نتایج حاصل در شکل (3) نشان می‌دهد که افزایش دمای استخراج به بالاتر از 25°C موجب کاهش بازده استخراج کورکومین و اولئورزین گردید. برای مثال، بازده استخراج اولئورزین و کورکومین در 35°C و زمان استخراج 3 ساعت با استفاده از DPCARB به‌ترتیب 5/28 و 3/18 ٪ و در دمای 45°C، 3/71 و 1/97 ٪ بود که در مقایسه با بازده 5/98 و 3/86 ٪ که در دمای 25°C حاصل شد، کاهش یافت. کاهش بازده استخراج در دماهای بالا به‌طور حتم مربوط به تبخیر بخشی از DPCARB سنتز شده می‌باشد که دمای جوش آن بر طبق مقالات 52 °C گزارش شده است [13]. در فرایند استخراج، حلال باید ابتدا از لایه‌های سلولزی و سپس غشای فسفولیپیدی سلول عبور کرده و به داخل سلول گیاهی نفوذ کند، ترکیب هدف را در خود حل کند و سپس با نفوذ معکوس به توده حلال برگردد که انجام این مراحل مستلزم داشتن زمان کافی است. در حالی‌که در دماهای بالا، در مراحل اولیه فرایند حلال تبخیر می‌شود و بنابراین زمان کافی برای استخراج کورکومین را ندارد. به همین دلیل بازده استخراج در دماهای بالا نسبت به دماهای متوسط به‌دلیل عدم وجود حلال کافی در محیط استخراج و شرایط ناپایداری که با توجه به تبخیر حلال ایجاد می‌شود، کم‌تر است. بازده استخراج اولئورزین و کورکومین با استفاده از DECARB در دمای 25 °C و زمان 3 ساعت به‌ترتیب 5/11 و 3/16 ٪ بود، درحالی‌که بازده استخراج اولئورزین و کورکومین در دمای 35 °C به 4/83 و 2/95 ٪ در دمای 45 °C به 4/52 و 2/61 ٪ کاهش یافت. میزان کاهش بازده استخراج در دمای 35 و 45 °C برای DECARB کم‌تر از DPACRB بود که دلیل آن، دمای تبخیر بالاتر DECARB می‌باشد که بر طبق گزارشات 69 °C است [13]. با توجه به نتایج، درصد استخراج کورکومین با استفاده از DPCARB بالاتر از DECARB سنتز شده بود؛ بنابراین می‌توان ازDPCARB به‌عنوان حلال مناسب‌تری برای استخراج کورکومین استفاده کرد. هم‌چنین نتایج نشان داد که افزایش زمان استخراج از 1 به 3 ساعت موجب افزایش بازده استخراج کورکومین از 2/44 به 3/86 ٪ در دمای اتاق، 25 °C، شد. افزایش زمان استخراج تا 6 و 8 ساعت باعث افزایش بازده استخراج کورکومین با استفاده از DPCARB و DECARB به‌ترتیب تا 3/91 و 3/19 % شد که افزایش چندانی نسبت به زمان استخراج 3 ساعت نداشت. بنابراین زمان استخراج 3 ساعت به‌عنوان زمان مناسب برای رسیدن به مقدار 3/86 ٪ برای بازده استخراج کورکومین با استفاده از DPCARB در نظر گرفته شد و از افزایش نه چندان زیاد بازده استخراج در زمان‌های 6 و 8 ساعت به‌دلیل زمان‌بر بودن و به‌صرفه نبودن فرایند صرفه‌نظر شد. هم‌چنین به‌دلیل کاهش بازده استخراج کورکومین در دماهای 35 °C و 45، از بررسی این دماها در زمان‌های 6 و 8 ساعت اجتناب شد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که مایعات یونی کربناتی سنتز شده حلالی با بازده استخراج بالا در دمای اتاق و در زمان کوتاه در مقایسه با حلال‌های آلی می‌باشد [13].

3-2- آنالیز HPLC از کورکومین استخراج شده

اندازه‌گیری کمی کورکومین استخراج شده با استفاده از آنالیز HPLC انجام شد. شکل4-الف، 4-ب و 4-ج به‌ترتیب کروماتوگرام‌های کورکومین استاندارد، کورکومین استخراج شده از زردچوبه با استفاده از DPCARB و کورکومین استخراج شده از زردچوبه با استفاده DECARB در دمای 25 °C و زمان استخراج 3 ساعت را نشان می‌دهد. شدت بالای پیک به‌دست آمده از نمونه‌های استخراجی نشان دهنده انتخاب‌پذیری بالای DPCARB برای استخراج کورکومین از آنالوگ‌های آن می‌باشد. درصد کورکومین استخراج شده در شرایط بهینه استخراج با محاسبه سطح زیر پیک به‌دست آمده و معادله به‌دست آمده از منحنی کالیبراسیون کورکومین استاندارد، محاسبه گردید. خلوص کورکومین استخراج شده با DPCARB با استفاده از روش ستون کروماتوگرافی مایع حدود 85٪ به‌دست آمد که دارای خلوص مناسب برای بسیاری از کاربردهای دارویی و پزشکی می‌باشد. هم‌چنین خلوص کورکومین استخراج شده مشابه مقادیر گزارش شده در متون است. رضایی و همکاران [18] از اسید فرمیک و مایکروویو برای استخراج کورکومین از زردچوبه استفاده کردند، سپس از حلال آب و اتانول و کریستالیزاسیون برای خالص‌سازی کورکومین بهره گرفتند که با این روش، کورکومین با خلوص 82/4٪ حاصل شد. در مطالعه دیگری که توسط رواتی و همکاران [19] انجام شد، برای خالص‌سازی کورکومین از عصاره‌ای که از سوکسوله



شکل (4) کروماتوگرم‌های به‌دست آمده از آنالیز HPLC: الف) کورکومین استاندارد، ب) کورکومین استخراج شده از زردچوبه با استفاده از DPCARB و ج) کورکومین استخراج شده از زردچوبه با استفاده از DECARB در دمای 25 °C و زمان استخراج 3 ساعت

حاصل شده بود از ستون کروماتوگرافی استفاده گردید و سپس برای تعیین میزان خلوص از آنالیز اسپکتروسکوپی UV-Vis استفاده شد که کورکومین با خلوص84 ٪ به‌دست آمد. در پژوهشی که توسط سانگ و همکاران [20] انجام شد با بهره‌گیری از کروماتوگرافی سیال فوق بحرانی (CO_2 حاوی 15-8٪ متانول)، کورکومین از آنالوگ‌های آن جدا شد و خلوص کورکومین استخراج شده 97/9٪ بود.

3-3- تعیین مشخصات N,N-دی‌پروپیل آمونیوم N´,N´-دی‌پروپیل کربمات (DPCARB)

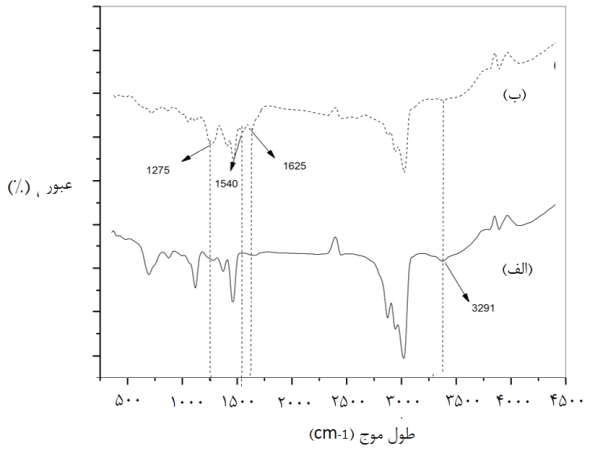
با توجه به نتایج حاصل از استخراج، DPCARB سنتزشده بازده استخراج بالاتری را نسبت به DECARB از خود نشان داد. بنابراین DPCARB به‌عنوان حلال استخراجی مناسب برای استخراج کورکومین در نظر گرفته شد. برای تایید سنتز DPCARB از آنالیز FT-IR استفاده شد. طیف FT-IR DPCARB سنتز شده و دی پروپیل آمین به‌ترتیب در شکل 5-الف و 5-ب نشان داده شده است. بر طبق نتایج، پیک N-H موجود در ساختار دی‌پروپیل آمین ($3291\ cm^{-1}$) که در طیف (الف) وجود دارد در طیف (ب) که مربوط به DPCARB سنتز شده است، حذف شد. حضور دو پیک متقارن C=O در 1625 و $1540\ cm^{-1}$ در طیف DPCARB و هم‌چنین باند C-O در $1275\ cm^{-1}$ مربوط به گونه‌های کربماتی می‌باشد که

نشان می‌دهد DPCARB به درستی سنتز شده است [13]. چگالی و ویسکوزیته برای DPCARB سنتز شده به‌ترتیب 0/8943 گرم بر سانتی‌متر مکعب و 29/41 میلی‌پاسکال ثانیه می‌باشد. هم‌چنین تست حلالیت نشان داد که مایع یونی سنتز شده محلول در آب می‌باشد.

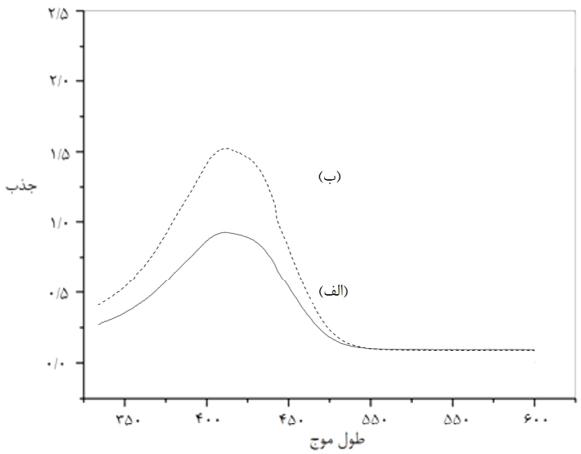
برای اثبات حضور کورکومین استخراج شده در مایع یونی کربماتی، طیف جذبی کورکومین استاندارد و کورکومین استخراج شده از زردچوبه در دمای 25°C و زمان استخراج 3 ساعت در محدوده 350 تا 600 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش بررسی گردید. شکل6-الف و 6-ب به‌ترتیب طیف کورکومین استاندارد و کورکومین استخراج شده از زردچوبه با استفاده از DPCARB را نشان می‌دهد. طیف جذبی کورکومین استاندارد در 420 نانومتر حداکثر جذب را نشان داد که مربوط به کروموفورهای دی‌آریل هپتانویید می‌باشد [21]. این پیک مشخصه کورکومین در نمونه‌ی استخراجی نیز وجود داشت که نشان می‌دهد مایع یونی سنتز شده قابلیت استخراج کورکومین از زردچوبه را دارد.

به‌منظور نشان دادن بازده بالای کورکومین استخراج شده با استفاده از مایع یونی کربماتی سنتز شده، نتایج حاصل از این روش، با سایر روش‌های استخراج که در تحقیقات قبلی انجام شده است، مقایسه گردید. گزارشات مربوط به مقایسه بازده استخراج در جدول (1) خلاصه شده است. در مطالعه انجام شده توسط ویجایاراواگان و مک‌فارلان [13] بازده استخراج با توجه به نوع مایع یونی کربماتی مورد استفاده متفاوت بوده است. البته در بررسی انجام شده توسط آن‌ها بازده استخراج کورکومینوئیدها (نه کورکومین خالص) گزارش شده است. هم‌چنین بازده استخراج با استفاده از N,N-دی متیل آمونیوم N´,N´-دی متیل کربمات (DMCARB) حدود 20٪ به‌دست آمد که این بازده بسیار بالا، بنابر اظهار نویسندگان آن مقاله، مربوط به سایر ترکیبات قابل استخراج مشابه با ساختار کورکومین می‌باشد. از آن‌جا که آن‌ها از آنالیز UV-Vis برای تعیین میزان کورکومینوئیدها استفاده کردند، وجود ترکیباتی با ساختار مشابه کورکومین موجب به‌دست آوردن نتایجی بیش از مقادیر واقعی گردید. در ضمن میزان بسیار بالای کورکومینوئید استخراج شده توسط آن‌ها که در کم‌تر گزارشی یافت می‌شود به گونه زردچوبه‌ی استفاده شده توسط آن‌ها و محتوای بالای کورکومینوئیدهای آن مربوط می‌شود. در پژوهش حاضر زردچوبه مورد استفاده دارای 6/9 ٪ کورکومین بود که با استفاده از روش سوکسله که به‌عنوان یک روش مرجع در نظر گرفته می‌شود، به‌دست آمد.

روش استفاده شده برای استخراج کورکومین یک فرایند ساده، در زمان کوتاه و دمای اتاق است که دارای بازده قابل قبولی در مقایسه با سایر روش‌های استخراج می‌باشد. اگرچه بهره‌دهی استخراج، با در نظر گرفتن حداکثر کورکومین موجود در زردچوبه استفاده شده که با روش سوکسله 6/9 ٪ به‌دست آمد، حدود 55 ٪ بود، اما با توجه به زمان کوتاه، دمای پائین و مصرف کم‌تر حلال در مقایسه با روش



شکل (5) طیف FT-IR الف) دی‌پروپیل آمین و ب) DPCARB سنتز شده



شکل (6) طیف مرئی-فرابنفش: الف) کورکومین استاندارد و ب) کورکومین استخراج شده از زردچوبه با استفاده از DPCARB

جدول (1) مقایسه بازده استخراج کورکومین با روش‌های استخراج مختلف.

روش استخراج	شرایط استخراج	بازده استخراج اولئورزین (٪)	بازده استخراج کورکومین (٪)	مرجع
مایع یونی کربماتی	زمان 3 ساعت و دمای 25 °C	5/98	3/86	پژوهش حاضر
استخراج با اتانول	زمان 12 ساعت و دمای 80 °C	-	3/4	[22]
استخراج با مایع تحت فشار و حلال اتانول	زمان 20 دقیقه و دمای 60 °C	-	4/3	[12]
استخراج با مایکروویو و حلال اتانول	زمان 4 دقیقه و توان 900 وات	-	3/231	[23]
مایع یونی کربماتی (DMCARB)	زمان 2 ساعت و دمای اتاق	-	*20	[13]
مایع یونی کربماتی (DECARB)	زمان 2 ساعت و دمای اتاق	-	*12/6	[13]
مایع یونی کربماتی (DPCARB)	زمان 2 ساعت و دمای اتاق		*12	[13]
مایع یونی کربماتی (DACARB)	زمان 2 ساعت و دمای اتاق		*14/5	[13]
مایع یونی کربماتی (DBCARB)	زمان 24 ساعت و دمای اتاق	-	*15/8	[13]

*این بازده استخراج مربوط به کورکومینوئیدها یعنی مجموع سه آنالوگ کورکومین، دی‌متوکسی کورکومین و بیس‌دی‌متوکسی کورکومین است.

سوکسوله می‌توان آن را روش مناسبی برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال دانست. مایعات یونی هم قابلیت حل شدن در آب را دارند و هم خواص مشابه با حلال‌های آلی مانند اتانول و متانول از خود نشان می‌دهند. بازده استخراج بالایی که از مایعات یونی کربماتی حاصل می‌شود به‌دلیل انحلال بالای کورکومینوئیدها در این حلال‌ها است. بسیاری از محققین بر این باورند که برهمکنش‌های آب‌گریز بین مایعات یونی آبی و ترکیبات زیست‌فعال نیروی محرکه اصلی در فرایند استخراج است. هم‌چنین نتایج حاصل از آنالیزهای HPLC و UV-Vis نشان داد که حلالیت کورکومین در DPCARB بسیار بالا بوده و گروه‌های دی‌آریل هپتانویید کورکومین استخراج شده کاملا دست‌نخورده و بدون نقص بودند که برای کاربردهای پزشکی و درمانی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. استفاده از مایعات یونی کربماتی به‌عنوان حلال یک روش نوین برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال مانند کورکومین با بازده بالا می‌باشد؛ هم‌چنین بازده استخراج را می‌توان با استفاده از روش‌های مایکروویو، اولتراسونیک و هیدرولیز آنزیمی به‌عنوان روش پیش‌تیمار افزایش داد.

4- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، استفاده از مایعات یونی کربماتی به‌عنوان یکی از روش‌های نوین برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال گیاهی معرفی گردید. این حلال‌ها به‌دلیل انتخاب پذیری بالا در استخراج ترکیبات آلی، در دما و شرایط محیطی توجه ویژه‌ای را به خود جلب کرده‌اند. در این پروژه سنتز N,N-دی‌پروپیل آمونیوم N´,N´-دی پروپیل کربمات (DPCARB) و N,N-دی‌پ اتیل آمونیوم N´,N´-دی اتیل کربمات (DECARB) به‌عنوان حلال‌های استخراجی انجام شد. استخراج کورکومین با مایعات یونی سنتزشده در دماها و زمان‌های مختلف بررسی گردید. نتایج حاصل از استخراج نشان داد که مایع یونی سنتزشده دارای بازده استخراج اولئورزین و کورکومین برای DPCARB به‌ترتیب 5/98 و 3/86٪ و برای DECARB به‌ترتیب 5/11 و 3/16٪ در دمای 25 °C و مدت زمان 3 ساعت می‌باشد؛ بنابراین DPCARB به‌عنوان حلال مناسب‌تر با بازده بالاتر انتخاب گردید. مقایسه نتایج استخراج حاصل از این روش با سایر روش‌های متداول نشان داد که مایع یونی کربماتی در مقایسه با حلال‌های آلی دارای بازده بالا در شرایط

محیطی بوده و به صرف انرژی و زمان بالا برای استخراج نیاز ندارد. هم‌چنین مایعات یونی کربناتی به‌دلیل آلودگی زیستی پایین در مقایسه با حلال‌های آلی، به‌عنوان حلال‌های سبز شناخته می‌شود که می‌توان از آن‌ها به‌طور گسترده برای استخراج ترکیبات آلی از منابع طبیعی استفاده کرد.

منابع

[1] Vogel, H., Pelletier, J. (1815). Curcumin-biological and medicinal properties. *J. Pharma*, 2, 50, 24-29.

[2] Esatbeyoglu, T., Huebbe, P., Ernst, I., Chin, D., Wagner, A.E., Rimbach, G. (2012). Curcumin—from molecule to biological function. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 5308-5332.

[3] Sasikumar, B. (2005). Genetic resources of curcuma: diversity, characterization and utilization. *Plant Genetic Resources: characterization and utilization*, 3, 230-251.

[4] Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Malani, N., Ichikawa, H. 2007. Curcumin: the Indian solid gold. in: *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*, Springer, 595, 1-75.

[5] Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M., Ghafoor, K., Norulaini, N., Omar, A. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *J. Food Eng.*, 117, 426-436.

[6] Gopal, J., Muthu, M., Chun, S.-C. (2015). One-step, ultrasonication-mobilized, solvent-free extraction/synthesis of nanocurcumin from turmeric. *RSC Adv.*, 5, 48391-48398.

[7] Extraction of bioactive compound curcumin from turmeric (Curcuma longa L.) via different routes: a comparative study. *Pak. J. Biotechnol.*, 13, 173-180.

[8] Gafner, S., Lee, S.-K., Cuendet, M., Barthélémy, S., Vergnes, L., Labidalle, S., Mehta, R.G., Boone, C.W., Pezzuto, J.M. (2004). Biologic evaluation of curcumin and structural derivatives in cancer chemoprevention model systems. *Phytochemistry*, 65, 2849-2859.

[9] Bairwa, K., Grover, J., Kania, M., Jachak, S.M. (2014). Recent developments in chemistry and biology of curcumin analogues. *RSC Adv.*, 4, 13946-13978.

[10] Salem, M., Rohani, S., Gillies, E.R. (2014). Curcumin, a promising anti-cancer therapeutic: a review of its chemical properties, bioactivity and approaches to cancer cell delivery. *RSC Adv.*, 4, 10815-10829.

[11] Jayaprakasha, G., Rao, L.J., Sakariah, K. (2006). Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chem.*, 98, 720-724.

[12] Osorio-Tobón, J.F., Carvalho, P.I., Rostagno, M.A., Petenate, A.J., Meireles, M.A.A. (2014). Extraction of curcuminoids from deflavored turmeric (Curcuma longa L.) using pressurized liquids: Process integration and economic evaluation. *J. Supercrit. Fluids*, 95, 167-174.

[13] Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D. (2014). CO2-Based Alkyl Carbamate Ionic Liquids as Distillable Extraction Solvents. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2, 1724-1728.

[14] Gorgani, L., Mohammadi, M., Najafpour, G.D., Nikzad, M. (2017). Piperine—The Bioactive Compound of Black Pepper: From Isolation to Medicinal Formulations. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 16, 124-140.

[15] Jessop, P.G., Heldebrant, D.J., Li, X., Eckert, C.A., Liotta, C.L. (2005). Green chemistry: Reversible nonpolar-to-polar solvent. *Nature*, 436, 1102-1102.

[16] Kreher, U.P., Rosamilia, A.E., Raston, C.L., Scott,

J.L., Strauss, C.R. (2004). Self-associated,“distillable” ionic media. *Molecules*, 9, 387-393.

[17] Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M., Ghafoor, K., Norulaini, N., Omar, A. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *J. Food Eng*., 117, 426-436.

[18] Rezaei, S., Najafpour, G., Mohammadi, M., Moghadamnia, A., Kazemi, S. (2016). Formic Acid and Microwave Assisted Extraction of Curcumin from Turmeric (Curcuma longa L.). *Int. J. Eng. Trans. B*, 29, 145-150.

[19] Revathy, S., Elumalai, S., Antony, M.B. (2011). Isolation, purification and identification of curcuminoids from turmeric (Curcuma longa L.) by column chromatography. *Asian J. Exp. Sci*., 2, 21-25.

[20] Song, W., Qiao, X., Liang, W.f., Ji, S., Yang, L., Wang, Y., Xu, Y.w., Yang, Y., Guo, D.a., Ye, M. (2015). Efficient separation of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin from turmeric using supercritical fluid chromatography: From analytical to preparative scale. *J. Sep. Sci*., 38, 3450-3453.

[21] Gangwar, R.K., Tomar, G.B., Dhumale, V.A., Zinjarde, S., Sharma, R.B., Datar, S. (2013). Curcumin conjugated silica nanoparticles for improving bioavailability and its anticancer applications. *J. Agric. Food. Chem.*, 61, 9632-9637.

[22] Paulucci, V.P., Couto, R.O., Teixeira, C.C., Freitas, L.A.P. (2013). Optimization of the extraction of curcumin from Curcuma longa rhizomes. *Rev. Bras. Farmacognosia*, 23, 94-100.

[23] Hmar, B.Z., Kalita, D., Srivastava, B. (2017). Optimization of microwave power and curing time of turmeric rhizome (Curcuma Longa L.) based on textural degradation. *LWT Food Sci. Technol.*, 76, 48-56.