

کاربرد حلالهای عمیق یوتکتیکی به عنوان حلال سبز جهت استخراج فلاونوئیدهای برگ سبز پیاز قرمز

مریم سادات نیکزادیان^۱ و مریم مهاجرانی^{۲*}

^۱ گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

^{۲*} گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

m.mohajerani@umz.ac.ir

چکیده

حلالهای عمیق یوتکتیک انواع جدیدی از حلالهای مایع یونی سبز با خواص فیزیکی مشابه مانند پایداری حرارتی مناسب، فراریت کم، قابلیت امتزاج پذیری بالا و رسانایی هستند. این مطالعه جهت بررسی و استفاده از سیستم های حلال یوتکتیک عمیق طبیعی به عنوان حلال سبز برای استخراج فلاونوئیدها از برگ سبز پیاز قرمز انجام شد. اندازه گیری مقدار کل فلاونوئیدهای استخراج شده برحسب کوئرستین و سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها بر اساس تست DPPH انجام شد. مقایسه محتوای فلاونوئیدی و فعالیت حذف رادیکال های آزاد نشان دادند که استفاده از حلالهای یوتکتیک عمیق طبیعی می تواند به عنوان یک حلال سبز و سازگار با محیط زیست جایگزین حلالهای آلی و صنعتی باشد.

واژه های کلیدی: حلال یوتکتیک عمیق، آنتی اکسیدان، پیاز قرمز، فلاونوئیدها.

۱. مقدمه

فلاونوئیدها که در خانواده پلی فنول ها یافت می شوند به وفور در سبزیجات و میوه ها وجود دارند. فلاونوئیدها دارای اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد حساسیت، ضد قارچی، ضد پلاکتی، ضد ترومبوز و ضد سرطان هستند. پیاز به عنوان یک غذای مهم در نظر گرفته می شود زیرا مولکول های گیاهی فعال شده مختلفی مانند اسید فنولیک، فلاونوئیدها، کوپائین ها، تیوسولفینات، ترکیبات ارگانوسولفور (OSCs)^۱ و آنتوسیانین را تامین می کند. در میان گونه های پیاز، پیاز قرمز دارای پلی فنل، فلاونوئید، فلاونول و تانن فراوان است. برخی از محققان گزارش کردند که پیاز قرمز دارای کوئرستین است که مقدار آن ۱۴ برابر سیر و دو برابر پیاز سفید می باشد (Lee et al., 2012).

کارایی روند استخراج ترکیبات فنولی با استفاده از حلال های مرسوم مانند متانول، اتیل استات یا کلروفرم منطقی است اما تاثیر منفی آنها بر محیط زیست و سمیت بالای آنها قابل اغماض نیست. در سال های اخیر، این حلال های سمی و خطرناک به طور موثر با حلال های سبز مانند مایعات یونی (ILs)^۲ جایگزین شده اند. علیرغم این واقعیت که مایعات یونی دارای خواص منحصر به فردی هستند، اما آنهايي که مبتنی بر ایمیدازولیوم هستند دارای معایبی مانند فرآیند سنتز پیچیده و پرهزینه

¹ Organo sulfur compounds

² Ionic liquids

بودن می‌باشند. حلال‌های عمیق یوتکتیک^۱ (DESS) انواع جدیدی از حلال‌های مایع یونی سبز با خواص فیزیکی مشابه مانند پایداری حرارتی مناسب، فراریت کم، قابلیت امتزاج پذیری بالا و رسانایی هستند. ولی تهیه آسان آنها از ترکیبات غیر سمی، زیست تخریب‌پذیر و هزینه کم می‌تواند آنها را جایگزین حلال‌های آلی معمولی و همچنین مایعات یونی کند (Lamei et al., 2017). تهیه DES به آسانی با حرارت دادن و مخلوط کردن دو جزء که اغلب جامد می‌باشند در دمای حدود ۷۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در محدوده زمانی چند دقیقه تا چند ساعت انجام می‌شود. بسیاری از محققان پیوندهای بین مولکولی (پیوندهای هیدروژنی) را عامل اصلی در تشکیل حلال‌های (DES) می‌دانند. بنابراین بر مبنای اینکه پیوند هیدروژنی بین دو مولکول شکل می‌گیرد کاهش قابل توجهی در دمای ذوب مخلوط به دست آمده، اتفاق می‌افتد (Tiecco et al., 2019). حلال‌های یوتکتیک عمیق طبیعی (NADESS)^۲ به عنوان مخلوطی از نسبت‌های مولی معینی از ترکیبات طبیعی مانند قندها، اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه و بازهای آلی که در موجودات به وفور یافت می‌شوند، تعریف می‌شوند. نقطه ذوب این مخلوط‌ها به طور قابل توجهی کمتر از نقطه ذوب اجزای جداگانه آنها و بسیار کمتر از دمای محیط است (Vanda et al., 2018). به عنوان یک حلال سبز جدید، حلال‌های اوتکتیک عمیق از اجزایی تشکیل شده‌اند که در طبیعت وجود دارند و به عنوان پذیرنده پیوند هیدروژنی (HBA) یا دهنده پیوند هیدروژنی (HBD) عمل می‌کنند. کولین کلراید (ChCl) که یک نمک آمونیوم چهارگانه می‌باشد بیشترین مورد استفاده به عنوان پذیرنده پیوند هیدروژنی و یون‌های آلی طبیعی مانند آمینواسیدها، پلی‌ساکاریدها، اسیدهای کربوکسیلیک و قندها اغلب به عنوان دهنده پیوند هیدروژنی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Chen et al., 2021).

DES ها به طور متمرث‌تری در فرآیندهای استخراج و پیش تغلیظ از منابع مختلف، شامل بخش‌های گیاهی و بیولوژیکی دیگر استفاده می‌شود. به طور خاص، ترکیبات فنلی با منشأ گیاهی با موفقیت استخراج/پیش تغلیظ می‌شوند زیرا با داشتن گروه هیدروکسیل و همچنین بخش‌های آروماتیک می‌توانند به عنوان گیرنده پیوند هیدروژنی عمل کنند و در شبکه پیوندهای هیدروژنی شرکت داشته باشند (Ciardi et al., 2021).

هدف از این مطالعه ارائه سیستم حلالی طبیعی و سبزی است که بتوان از آن جهت استخراج متابولیت‌های ثانویه گیاهان شامل فنول‌ها و فلاونوئیدها استفاده کرد. در این راستا از گیاه پیاز قرمز ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی استخراج شده و با سیستم‌های حلالی آلی نظیر اتانول مقایسه خواهد شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد

کولین کلراید (با خلوص ۹۸٪)، سیتریک اسید، لاکتیک اسید گلیسرول و اوره متعلق به شرکت سیگما-آلد ریچ اتانول ۹۶٪ و متانول از شرکت مرک تهیه گردید.

۲-۲ تهیه حلال‌های اوتکتیک عمیق طبیعی

کولین کلراید با نسبت مولی معین با گلیسرول (به عنوان الکل)، اسید لاکتیک و اسید سیتریک (به عنوان اسیدهای آلی) و اوره (به عنوان یک ترکیب آمین‌دار) ترکیب شدند. جدول ۱، مقدار ترکیبات و نسبت مولی آنها را نشان می‌دهد. مخلوط‌های به دست آمده در دمای ۶۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد و با همزن مغناطیسی، هم‌زده شد تا حلال شفاف و یکنواخت تشکیل شود. سپس به هر کدام از حلال‌های تشکیل شده مقدار $\left(\frac{w}{w}\right)$ ۳۰٪ آب مقطر اضافه شد (Savi et al., 2019) مجدداً ۲ دقیقه دیگر هم‌زده شد و برای اطمینان از عدم رسوبدهی، حلال‌های به دست آمده، ۷۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند.

¹ Deep eutectic solvents

² Natural Deep eutectic solvents

جدول ۱. (مواد و نسبت‌های مولی تشکیل‌دهنده DES^۱)

نسبت مولی	اهدا کننده پیوند هیدروژنی	پذیرنده پیوند هیدروژنی	نام حلال
۱:۲	گلیسرول	کولین کلراید	DES-1
۱:۱	لاکتیک اسید	کولین کلراید	DES-2
۱:۱	سیتریک اسید	کولین کلراید	DES-3
۱:۲	اوره	کولین کلراید	DES-4

شکل ۱- حلالهای اوتکتیک سنتز شده



۲-۳- روش استخراج

۲-۳-۱- گیاه استفاده شده

برگهای سبز پیاز قرمز از مزارع اطراف شهرستان بابل جمع‌آوری، شسته و خشک شد (در دمای ۳۷ درجه) و با آسیاب برقی پودر شد. پودر گیاه تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

۲-۳-۲- استخراج عصاره

مقدار ۰/۰۵ گرم از پودر برگ پیاز در ۱/۵ میلی‌لیتر از حلالهای یوتکتیک عمیق طبیعی به نسبت جامد به مایع ۳۰:۱، خیسانده شد مقداری هم‌زده شد تا عصاره‌ها یکنواخت شوند پس در لوله‌ی آزمایش در حمام اولتراسونیک به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه قرار گرفتند برای ثابت نگه داشتن دما از تکه‌های یخ استفاده شد. در کنار DESها، عصاره‌گیری با حلال اتانول ۷۰٪ با همان نسبت جامد: مایع و به همان روش انجام شد. پس مخلوط‌های به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۸۴۸ سانترفیوژ شد. سوپرناتانت به دست آمده در میکروتیوب در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-۴- اندازه‌گیری اسپکترومتری (UV-VIS)

۲-۴-۱- فلاوونوئید

مقدار فلاوونوئید با روشی که توسط Hamrouni-sellamietal منتشر شد با کمی تغییر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. در ۱ μl ۷۰۰ آب مقطر، ۳۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ای که ۳ بار رقیق شده بود ریخته شد سپس به آن ۶۰ μl محلول (۵٪) NaNO₂ اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی قرار گرفت. مرحله‌ی بعد ۶۰ μl محلول (۱۰٪) AlCl₃ را به مخلوط اضافه کرده و ۶ دقیقه فرصت داده شد سپس ۴۰۰ میکرولیتر از NaOH (۱ μ) و ۴۸۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر به آن اضافه شد و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه جذب در λ_{max} = ۵۱۰ خوانده شد. مقدار کل فلاوونوئید در عصاره با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک محاسبه شد (mg QUE/gdw)

۵-۲ فعالیت آنتی اکسیدانی

۵-۱-۲ فعالیت حذف رادیکال DPPH

قدرت عصاره برای خنثی کردن رادیکالهای آزاد با استفاده از روش حذف رادیکال DPPH (۲و۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل) مورد ارزیابی قرار گرفت. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر عصاره برداشته شد و به میزان ۱۰ برابر رقیق شد سپس حجمهای ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ میکرولیتر از آنرا در پلیت ۹۶ خانه ای ریخته و حجم هر چاهک را به ۱۰۰ میکرولیتر رساندیم سپس به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۰.۱ میکرو مولار DPPH اضافه کرده و ۳۰ دقیقه در تاریکی نگه میداریم. از آب مقطر به عنوان کنترل استفاده میکنیم. جذب نمونه‌ها در $\lambda_{max} = 517\text{nm}$ خوانده شد مطابق با (Thaipong et al. 2006) با کمی تغییر. درصد خنثی سازی رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\%I = \left(\frac{A_{\text{کنترل}} - A_{\text{عصاره}}}{A_{\text{کنترل}}} \right) \times 100$$

I= درصد مهار و A= مقدار جذب خوانده شده

۵-۲-۲ ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی بر مبنای احیای آهن

توانایی عصاره‌ها برای کاهش کمپلکس بی رنگ Fe^{3+} -۲و۴- تری پیریدیل -S- تریازین به کمپلکس آبی رنگ Fe^{2+} -۲و۴- تری پیریدیل -S- تریازین با روش FRAP ارزیابی شد. در این روش به ۶۰ میکرولیتر از عصاره که ۲۵ بار رقیق شده میزان ۱/۸ میلی لیتر از محلول FRAP اضافه شد. طبق روش (Benzie & Strain ۱۹۹۶) با کمی تغییر. بعد از ۶ دقیقه استراحت در دمای اتاق جذب کمپلکس آبی رنگ بوجود آمده در طول موج $\lambda = 593\text{nm}$ خوانده شد. نتیجه با استفاده از منحنی استاندارد FeSO_4 محاسبه شد و به صورت (mg FeSO_4 /gdw) گزارش شد.

۳- بحث و نتیجه گیری

تمام حلالهای NADES تشکیل شده در دمای ۶۰-۷۰ درجه سانتی گراد در مدت زمان ۳۰ تا ۴۵ دقیقه تشکیل شدند. تمام نمونه‌ها بعد از گذشت ۷۲ ساعت در دمای محیط به شکل مایع باقی ماندند.

۱-۳ اندازه گیری اسپکتوفتومتری فلاونوئید در عصاره‌ها

راندمان استخراج با استفاده از اندازه گیری اسپکتوفتومتری فلاونوئیدها در برگهای سبز پیاز قرمز در جدول ۲ نمایش داده شده است. بالاترین میزان فلاونوئید برای سیستم NADES شامل گلیسرول: لاکتیک اسید (18/53 mg QUE/ gdw) مشاهده شد و بقیه حلالهای NADES نسبت به اتانول ۷۰٪ کارایی کمتری نشان دادند. میزان استخراج NADES به شدت به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آنها بستگی دارد. (Shang, Tan, Du, Liu & Zgang ۲۰۱۸).

جدول ۲. اندازه گیری اسپکتوفتومتری فلاونوئید کل در برگهای سبز پیاز قرمز

حلال استخراج کننده	میزان فلاونوئید کل (mg QUE/ gdw)
(۱:۱) گلیسرول: کولین کلراید	16.7
(۱:۱) لاکتیک اسید: کولین کلراید	18.53
(۱:۱) سیتریک اسید: کولین کلراید	6.96
(۱:۲) اوره: کولین کلراید	11.82
اتانول ۷۰٪	17.33

۲-۳ فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ سبز پیاز قرمز که در حلالهای NADES و حلال مرسوم اتانول ۷۰٪ تهیه شدند از طریق سنجش DPPH و FRAP مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که تمامی عصاره‌های NADES به جز سیتریک اسید خاصیت مهار رادیکال DPPH را در غلظتی کمتر از اتانول ۷۰٪ نشان دادند. بیشترین میزان مهار مربوط به کولین کلراید: گلیسرول با درصد مهار ۸۵٪ می‌باشد درصدهای مهار محاسبه شده در جدول ۳ بیان شده است. قدرت آنتی اکسیدانی بالاتر عصاره‌های NADES نسبت به اتانول به خاطر وجود بر همکنشهای بین مولکولی به خصوص شکل‌گیری پیوند هیدروژنی می‌باشد که باعث پایداری ترکیبات مولی می‌شود (Barbieri et al, 2020). در سنجش FRAP، بالاترین پتانسیل کاهش Fe^{3+} به Fe^{2+} در سیستم شامل کولین کلراید: لاکتیک اسید مشاهده شد ($37/9\text{ mg Feso4/gd.w}$) نتایج در جدول ۳ گزارش شده است در هر دو سنجش آنتی اکسیدانی کمترین مقدار مربوط به سیتریک اسید: کولین کلراید مشاهده شد.

جدول ۳- فعالیت آنتی اکسیدانی

نام حلال	سنجش DPPH (درصد مهار)	سنجش FRAP ($\text{mg FeSO}_4/\text{gdw}$)
کولین کلراید: گلیسرول	۸۵٪	۲۲/۷
کولین کلراید: لاکتیک اسید	۸۲٪	۳۷/۹
کولین کلراید: سیتریک اسید	۷۶٪	۲۱/۶
کولین کلراید: اوره	۸۴٪	۲۲/۰۲
اتانول ۷۰٪	۷۸٪	۲۳/۷

۴- نتیجه‌گیری

در میان ۴ نوع حلال یوتکتیک سنتز شده، NADES شامل کولین کلراید و لاکتیک اسید به عنوان بهترین NADES معرفی شدند بنابراین حلالهای اوتکتیک عمیق طبیعی بر پایه کولین کلراید، به عنوان یک حلال سبز و غیر سمی می‌تواند نسبت به حلال‌های صنعتی و آلی جایگزین مناسبی برای جداسازی ترکیبات از منابع گیاهی باشند و همچنین می‌توانند در صنایع غذایی، دارویی و شیمیایی به عنوان یک حلال جدید، پایدار، ارزان قیمت و دوستدار محیط زیست مورد توجه قرار گیرند.

مراجع

- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.
- Chen, X.-Q., Li, Z.-H., Liu, L.-L., Wang, H., Yang, S.-H., Zhang, J.-S., & Zhang, Y. J. L. (2021). Green extraction using deep eutectic solvents and antioxidant activities of flavonoids from two fruits of *Rubia* species. 148, 111708.
- Ciardi, M., Ianni, F., Sardella, R., Di Bona, S., Cossignani, L., Germani, R., . . . Clementi, C. J. M. (2021). Effective and Selective Extraction of Quercetin from Onion (*Allium cepa* L.) Skin Waste Using Water Dilutions of Acid-Based Deep Eutectic Solvents. 14(21), 6465.
- Hamrouni-Sellami, I., Rahali, F. Z., Rebey, I. B., Bourgo, S., Limam, F., & Marzouk, B. (2013). Total Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) Plants as Affected by Different Drying Methods. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 806–817
- Lamei, N., Ezoddin, M., & Abdi, K. J. T. (2017). Air assisted emulsification liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for preconcentration of methadone in water and biological samples. 165, 176-181
- Lee, B., Jung, J.-H., Kim, H.-S. J. F., & toxicology, c. (2012). Assessment of red onion on antioxidant activity in rat. 50(11), 3912-3919

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19(6-7), 669-675..

Tiecco, M., Cappellini, F., Nicoletti, F., Del Giacco, T., Germani, R., & Di Profio, P. J. J. o. M. L. (2019). Role of the hydrogen bond donor component for a proper development of novel hydrophobic deep eutectic solvents. 281, 423-430.

Tiecco, M., Cappellini, F., Nicoletti, F., Del Giacco, T., Germani, R., & Di Profio, P. J. J. o. M. L. (2019). Role of the hydrogen bond donor component for a proper development of novel hydrophobic deep eutectic solvents. 281, 423-430.

Savi, L. K., Dias, M. C. G. C., Carpine, D., Waszczynskyj, N., Ribani, R. H., & Haminiuk, C. W. I. (2019). Natural deep eutectic solvents (NADES) based on citric acid and sucrose as a potential green technology: A comprehensive study of water inclusion and its effect on thermal, physical and rheological properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(3), 898–907

الزامات اخلاقی نگارش مقاله

نویسنده / ارسال کننده مقاله خانم مریم سادات نیک زادیان متعهد می شود:

- مقاله ارسالی حاصل کار پژوهشی ایشان (و همکاران) بوده و در مواردی که از دستاوردهای تحقیقاتی دیگران استفاده شده، مطابق ضوابط و رویه معمول، مشخصات منابع مورد استفاده درج شده است.
- مقاله ارسالی (یا ترجمه آن) و مقاله‌ای با همپوشانی قابل توجه با این مقاله قبلاً در هیچ مجله و یا کنفرانسی ارائه نشده و به طور همزمان نیز در حال ارزیابی در مجله یا کنفرانس دیگری نیست.
- همه نویسندگان مقاله از کلیه محتویات علمی و نیز ترتیب قرارگیری نام و مشخصات و وابستگی شغلی خود در مقاله آگاهی و رضایت کامل دارند.
- چنانچه هر زمان خلاف موارد فوق و یا بروز هرگونه تقلب یا تخلف پژوهشی در رابطه با این مقاله اثبات شود، عواقب ناشی از آن متوجه نویسنده مقاله است و دبیرخانه کنفرانس مجاز است با ایشان (و همکاران) مطابق با ضوابط و مقررات رفتار نموده و هیچ گونه ادعایی قابل قبول نخواهد بود.

محل امضا

