

Optimization of Colchicine Extraction from *Colchicum Kurdicum* (Bornm.) Stef. Corm and Evaluating Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Activities of the Plant Extract

Ali Davoodi¹,
Seyed Jalal Hosseini²,
Saeed Emami³,
Masoud Azadbakht⁴,
Mohammad Azadbakht⁵

¹ PhD Student in Pharmacognosy, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Department of Radiopharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Medicinal Chemistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Plant Systematics, High Educational of Sanna Institute, Sari, Iran

⁵ Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received November 2, 2019 ; Accepted March 3, 2020)

Abstract

Background and purpose: *Colchicum kurdicum* (Bornm.) Stef. is a monocotyledon plant which is endemic to Iran. The corm and seeds of this plant have some bioactive compounds, especially tropolone alkaloids that are used in treatment of inflammations, rheumatoid arthritis, gout, joint pains, and cancers. This study aimed at optimization of colchicine extraction from the corms of *C. kurdicum* and evaluating anti-inflammatory and anti-oxidant activities of the extracts.

Materials and methods: The extraction of colchicine from *C. kurdicum* was optimized by the ultrasonic-assisted extraction method in methanol/deionized water (70:30) solvent system. The response-surface method was also used for analysis and optimization of the extraction. The effects of extraction time, solvent/plant ratio, and temperature were analyzed. Moreover, the extracted colchicine was assayed by HPLC. Finally, anti-inflammatory and anti-oxidant activities of the extracts were evaluated.

Results: Colchicine/g corm (0.98 ± 0.04 mg) was achieved in optimum condition; extraction time of 180 min, solvent/plant ratio of 20 ml/g, and temperature of 60 °C. Also, increase in temperature decreased the extraction time and solvent/plant ratio. The highest anti-inflammatory and anti-oxidant activities were found in extracts 7 and 12.

Conclusion: In this study, ultrasonic-assisted extraction was found as an effective method for extraction of colchicine from *C. kurdicum*.

Keywords: colchicine, antitubulin compound, colchicaceae family, optimization, ultrasonic

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (184): 126-135 (Persian).

* Corresponding Author: Mohammad Azadbakht - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: azadbakht110@gmail.com)

بهینه سازی استخراج کلشی سین از بنه گیاه سورنجان ایرانی *Colchicum Kurdicum* (Bornm.) Stef.)؛ بررسی فعالیت های ضد التهابی و آنتی اکسیدانی عصاره گیاه

علی داوودی¹
سیدجلال حسینی مهر²
سعید امامی³
مسعود آزادبخت⁴
محمد آزادبخت⁵

چکیده

سابقه و هدف: گیاه سورنجان ایرانی یک گیاه تک لپه ای و بومی ایران می باشد. بنه و دانه های این گیاه حاوی ترکیبات فعال دارویی مخصوصا آلکالوئیدهای تروپولونی بوده که در درمان التهابات، آرتريت روماتوئید، نقرس، دردهای مفصلی و سرطان کاربرد دارد. هدف اصلی این مطالعه ایده آل سازی استخراج کلشی سین از بنه این گیاه و بررسی فعالیت های ضد التهابی و آنتی اکسیدانی عصاره های آن می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه، استخراج کلشی سین از گیاه سورنجان با استفاده از روش اولتراسوند در سیستم حلال آب/متانل (70:30) بهینه سازی شده است. همچنین، از روش سطح - پاسخ برای آنالیز بهینه سازی استفاده شده و تاثیر 3 پارامتر زمان استخراج، نسبت حلال به گیاه و دما مورد آنالیز قرار گرفته است. تعیین مقدار کلشی سین با HPLC انجام شد. در نهایت فعالیت های ضد التهاب و آنتی اکسیدان عصاره ها مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: شرایط ایده آل شامل زمان استخراج 180 دقیقه، نسبت حلال به گیاه 20 و دمای 60 درجه سانتی گراد بود که باعث استخراج کلشی سین به میزان $0/98 \pm 0/04$ میلی گرم بر گرم بنه خشک شد. همچنین، افزایش دما باعث کاهش زمان عصاره گیری و کاهش نسبت حلال به گیاه گردید. بیش ترین فعالیت های ضد التهابی و آنتی اکسیدانی به ترتیب در عصاره های شماره 7 و 12 مشاهده شدند.

استنتاج: بر اساس این مطالعه، روش اولتراسوند به عنوان یک روش ایده آل برای استخراج کلشی سین معرفی شده است.

واژه های کلیدی: کلشی سین، ترکیب آنتی توبولین، خانواده سورنجان، ایده آل سازی، اولتراسونیک

مقدمه

گیاه سورنجان ایرانی با نام علمی *Colchicum kurdicum* (Bornm.) Stef. و از خانواده Colchicaceae، یکی از گیاهان تک لپه ای گل دار و چندساله می باشد.

E-mail: azadbakht110@gmail.com

مؤلف مسئول: محمد آزادبخت - ساری: 17 جاده فرح آباد، مجمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده داروسازی

1. دانشجوی PhD فارماکوگنوزی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. استاد، گروه داروسازی هسته ای، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه شیمی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

4. استادیار، گروه سیستماتیک گیاهی، موسسه آموزش عالی سنا، ساری، ایران

5. استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1398/8/11 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/8/18 تاریخ تصویب: 1398/12/13

این گیاه دارای بنه منحصر به فرد و تخمدان زیرزمینی بوده و به صورت اندمیک در مناطق مختلف دنیا مخصوصاً ایران، ترکیه و اروپا رویش دارد (۱،۲). تمامی اندام‌های این گیاه مخصوصاً بنه و دانه‌ها در طب ایرانی و بقیه فلسفه‌های طبی سنتی دنیا و اتنوبوتانی برای درمان التهابات، نقرس، آرتريت روماتوئید و بدخیمی‌ها استفاده می‌شده است. همچنین، این گیاه حاوی ترکیبات فعال زیستی متعدد به خصوص آلکالوئیدهای تروپولونی و ایزوکینولینی، ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی، گلیکوزیدها و کربوهیدرات‌ها بوده که این ترکیبات باعث ایجاد اثرات بیولوژیک مختلف در آن می‌شوند (۳،۴). ترکیبات تروپولون آلکالوئیدی موجود در این گیاه مخصوصاً ترکیب کلشی‌سین با مکانیسم مهار پلی‌مریزاسیون توبولین سلولی باعث مهار میتوز و مهاجرت سلولی سیستم ایمنی به محل التهاب شده و عملکرد ضد التهابی از خود نشان می‌دهند. همچنین، ترکیبات فلاوونوئیدی شبه کوئرستین گیاه با مهار آنزیم سیکلوآکسیژناز باعث مهار التهاب می‌شوند. بر اساس مطالعات برون تنی و داکینگ مولکولی، ترکیبات ایزوکینولین آلکالوئیدی گیاه نیز باعث مهار آنزیم استیل کولین استراز شده و بصورت بالقوه در بیماری آلزایمر کاربرد دارند (۴-۶).

داروی کلشی‌سین، یکی از آلکالوئیدهای تروپولونی بوده که از این خانواده گیاهی استخراج شده و در درمان بیماری‌های مختلفی مانند نقرس، سندروم بهجت و تب مدیترانه‌ای کاربرد فراوان دارد. با توجه به مصرف گسترده این ترکیب به عنوان دارو و ترکیب رهبر دارویی و دشواری سنتز، نیاز به استخراج آن از منابع طبیعی و در مقیاس بالا افزایش یافته است. همچنین بر اساس آمار جهانی میزان فروش داروی کلشی‌سین در دنیا ۹۲۰ میلیون دلار در سال ۲۰۱۸ بوده که این رقم طبق پیش‌بینی‌ها تا سال ۲۰۲۵ به رقم ۱۲۷۰ میلیون دلار در سال خواهد رسید (۷-۹). روش‌های متعددی در استخراج ترکیبات فعال گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. هر کدام از روش‌ها مانند ماسراسیون،

پرکولاسیون و سوکسله دارای مزایا و معایب متعددی است که از مهم‌ترین معایب این ۳ روش کارایی پایین تر آن‌ها برای استخراج ترکیبات در مقیاس بالا، نسبت به روش‌های جدیدتر می‌باشند. در روش‌های قدیمی عمدتاً زمان عصاره‌گیری طولان تری نیاز بوده تا ترکیبات در مقیاس متوسط به بالا استخراج شوند ولی با روش‌های کارآمدتر مانند اولتراسوند در زمان کم‌تر، مقیاس بالاتری از ترکیبات استخراج می‌شوند. همچنین با توجه به آمارهای جهانی بیش از ۸۰ درصد داروها به صورت مستقیم یا غیر مستقیم از منابع گیاهی تهیه می‌شود که اهمیت استخراج در مقیاس بالا را روشن تر می‌سازد (۱۰،۱۱).

روش اولتراسوند یکی از مهم‌ترین روش‌های جداسازی ترکیبات فعال زیستی است که با مکانیسم ضربات اولتراسونیک باعث تخریب دیواره سلول گیاهی و استخراج بهتر ترکیبات می‌شود. در این روش استخراج، متغیرهای متعددی مانند قدرت دستگاه، زمان استخراج، دما و نسبت حلال به گیاه وجود داشته که با ایده آل‌سازی هر کدام با روش آماری سطح-پاسخ، مقادیر بیش‌تر ترکیبات فعال زیستی استخراج می‌شوند. همچنین، در مورد ترکیبات آلکالوئیدی، متغیر pH نیز باعث تغییر در بازدهی استخراج می‌گردد (۱۲،۱۳). به طور کلی، برای استخراج بالای ترکیبات افزایش دما تا حد مشخص، افزایش زمان عصاره‌گیری، افزایش قدرت دستگاه تا حد مشخص و افزایش نسبت حلال به گیاه باعث افزایش بازدهی عصاره‌گیری می‌شود. با توجه به اهمیت بالای ترکیب آلکالوئیدی کلشی‌سین در درمان بیماری‌ها و ایجاد اندیکاسیون‌های جدید از آن، هدف این مطالعه، بهینه‌سازی استخراج کلشی‌سین از بنه گیاه سورنجان ایرانی (*C. kurdicum*) با روش اولتراسوند و مدل‌های سطح پاسخ و همچنین بررسی فعالیت‌های ضد التهابی و آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف آن و تاثیر متغیرهای استخراج در این فعالیت‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری و شناسایی گیاه

نمونه‌های گیاهی از ارتفاع بیش از 1500 متر منطقه تنگه راه در پارک ملی گلستان (37.366335, 55.780033) جمع آوری و بعد از تهیه نمونه هرباریومی توسط متخصص سیستماتیک گیاهی مورد تایید قرار گرفت (شماره هرباریومی E₁-11312). سپس بنه‌های گیاه جمع آوری و خشک شده و با آسیاب تا مش 200 خرد شدند.

طراحی آزمایش و ایده آل سازی روش استخراج

در این مرحله با استفاده از روش سطح-پاسخ، استخراج کلشی سین طراحی شد. برای طراحی روش از متغیرهای زمان استخراج، نسبت حلال به گیاه و دمای استخراج استفاده شد. همچنین، آنالیز با روش Central Composite و مدل‌های Polynomial و Box-Cox با نرم افزار Design-Expert software 7.0.0 انجام گردید. بعد از انتخاب مدل آنالیز، تعداد 20 حالت استخراج به دست آمده و بعد از مرحله استخراج، میزان کلشی سین به دست آمده به جدول داده‌ها اضافه شد (جدول شماره 1).

جدول شماره 1: طراحی آزمایش و داده‌های به دست آمده HPLC.

شماره آزمایش	دما (°C)	زمان استخراج (Min)	نسبت حلال به گیاه (ml/g)	میزان کلشی سین (mg/g)
1	60/00	180/00	5/00	0/64 ± 0/02
2	45/00	120/00	12/50	0/72 ± 0/01
3	30/00	60/00	5/00	0/62 ± 0/03
4	19/50	120/00	12/50	0/51 ± 0/01
5	45/00	120/00	12/50	0/96 ± 0/02
6	60/00	60/00	5/00	0/51 ± 0/03
7	60/00	180/00	20/00	0/98 ± 0/04
8	45/00	120/00	12/50	0/95 ± 0/01
9	45/00	120/00	12/50	0/96 ± 0/02
10	45/00	120/00	12/50	0/94 ± 0/02
11	30/00	180/00	20/00	0/92 ± 0/01
12	45/00	120/00	1/00	0/45 ± 0/04
13	45/00	19/00	12/50	0/65 ± 0/02
14	45/00	120/00	25/50	0/95 ± 0/03
15	70/00	120/00	12/50	0/69 ± 0/01
16	30/00	60/00	20/00	0/75 ± 0/02
17	45/00	120/00	12/50	0/70 ± 0/03
18	30/00	180/00	5/00	0/68 ± 0/01
19	60/00	60/00	20/00	0/75 ± 0/02
20	45/00	220/00	12/50	0/61 ± 0/01

همچنین، آنالیز واریانس انجام شده و مقادیر R^2 Predicted و R^2 Adjusted، P-Value، F-Value شدند (14، 13).

سیستم استخراج با روش اولتراسوند

استخراج کلشی سین با 20 حالت مورد آنالیز و با استفاده از دستگاه اولتراسوند و سیستم حلال آب/متانل (70:30) با pH برابر 5 انجام شد. همچنین میزان فرکانس دستگاه ثابت و روی 37 کیلوهرتز تنظیم گردید. بعد از اتمام عصاره گیری، 20 عصاره بدست آمده تحت خلا تغلیظ و با فریز - درایر خشک شده و در دمای منفی 20 درجه سانتی گراد نگهداری شدند (14، 13).

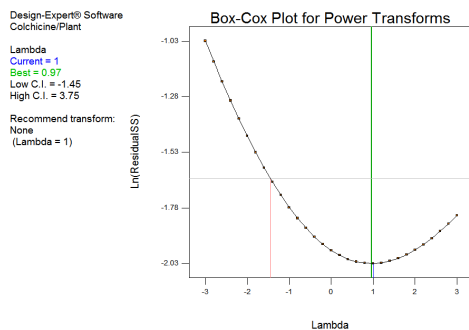
آنالیز HPLC عصاره‌ها

برای تعیین مقدار کلشی سین در عصاره‌های بدست آمده از روش HPLC و شناساگر UV استفاده شد. آنالیز HPLC با استفاده از دستگاه Smartline Manager مدل 5000 (Knauer, Germany) و پمپ Smartline مدل 1000 (4.6mm×250mm, 5µm particle size) C18 ستون در دمای 25 درجه سانتی گراد با شناساگر UV در طول موج 245 نانومتر انجام گردید. ابتدا غلظت 1 mg/ml از عصاره‌ها تهیه شده و به میزان 20 میکرولیتر به دستگاه تزریق شدند. همچنین، در مرحله تزریق از سیستم فاز معکوس و فاز متحرک گرادیانت (1ml/min) شامل استونیتریل 10 درصد (0 تا 5 دقیقه)، استونیتریل 100 درصد (5 تا 20 دقیقه) و استونیتریل 10 درصد (20 تا 30 دقیقه) استفاده شد. برای تهیه منحنی کالیبراسیون از استاندارد کلشی سین (مرک، آلمان) با غلظت‌های 125، 250، 500، 1000 و 2000 میلی گرم بر لیتر استفاده شد. در این مرحله هر نمونه عصاره 3 بار به دستگاه تزریق شده و نتایج بصورت میانگین ± انحراف استاندارد گزارش شدند (15-17).

بررسی برون تنی فعالیت ضد التهابی عصاره‌ها

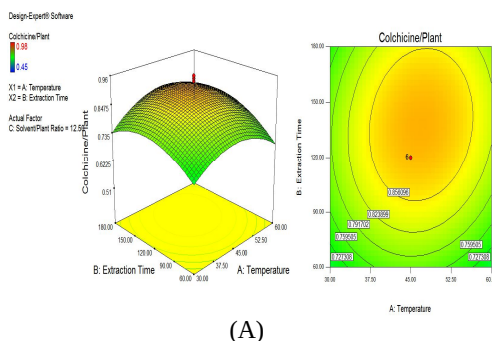
در این مرحله فعالیت ضد التهابی عصاره‌ها در

فعالیت‌های ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های به‌دست آمده مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین، اعتبار مدل مورد مطالعه و صحت آنالیز انجام شده مورد تایید قرار گرفتند. نمودار شماره 1 نمودار Box-Cox را نشان می‌دهد. براساس این نمودار، ارزش لامبدا $+0.97$ محاسبه شده که تعیین کننده تناسب عملکردی مدل مورد مطالعه بوده است.



نمودار شماره 1: نمودار Box-Cox.

نمودارهای کنتور و سطح-پاسخ پارامترهای مورد مطالعه در نمودار شماره 2 آورده شده است. در این شکل تاثیر متقابل هر 3 پارامتر بر روی بازدهی استخراج کلشی‌سین نشان داده شده که با توجه به داده‌های بدست آمده، بازدهی استخراج کلشی‌سین با نسبت حلال به گیاه ارتباط مستقیم و با دما و زمان استخراج ارتباط نرمال داشته و با افزایش آن‌ها تا حد مشخصی افزایش و بعد از آن کاهش می‌یابد.



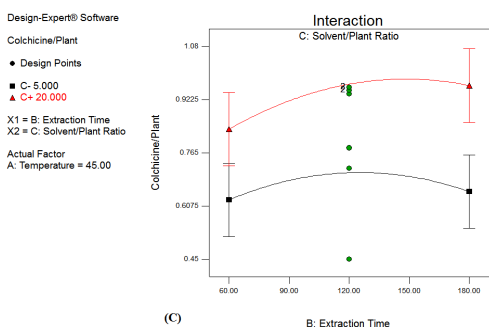
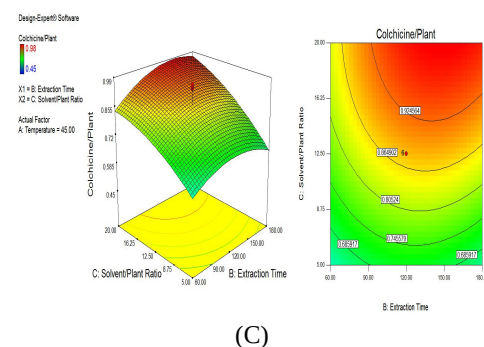
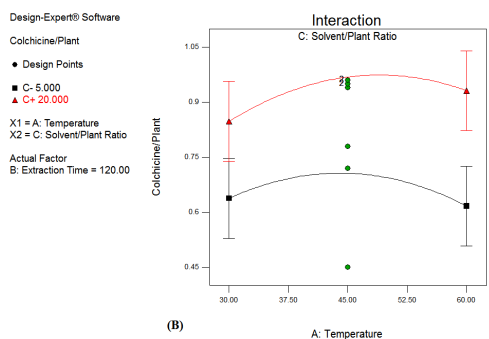
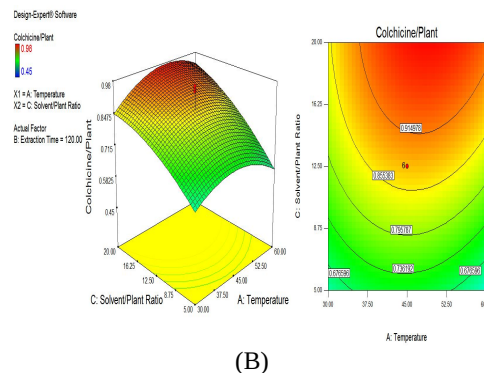
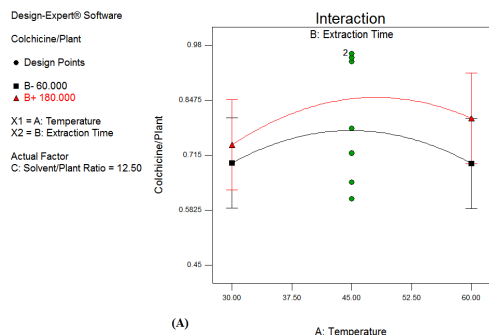
in vitro و با روش Albumin Denaturation تعیین شد. برای این منظور، میزان 5 میلی‌لیتر از هر عصاره (غلظت‌های 12/5، 25، 50، 100 و 200 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با 1 میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی 2 درصد و 1 میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس برای مدت 10 دقیقه در دمای 60 درجه سانتی‌گراد حرارت داده شده و به آن‌ها مقدار 3 میلی‌لیتر فسفات بافر سالین (pH=7.4) اضافه شده و در طول موج 600 نانومتر مورد آنالیز UV قرار گرفتند. همچنین، محلول کنترل منفی حاوی آب دیونیزه بجای عصاره و کنترل مثبت حاوی دیکلوفناک سدیم بودند. در این مرحله هر نمونه 3 بار مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد گزارش شدند (18، 19).

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها

فعالیت آنتی‌اکسیدانی و جاروبگری رادیکالی عصاره‌ها با استفاده از DPPH و در حضور کنترل مثبت ویتامین ث مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، میزان 2/5 میلی‌لیتر از محلول متانلی ترکیب DPPH (100 میکرومولار) با 2/5 میلی‌لیتر از غلظت‌های 12/5، 25، 50، 100 و 200 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هر عصاره مخلوط و برای مدت 30 دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس با استفاده از دستگاه UV در طول موج 517 نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. در نهایت، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای هر عصاره تعیین شدند. در این مرحله هر نمونه 3 بار مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد گزارش شدند (20، 21).

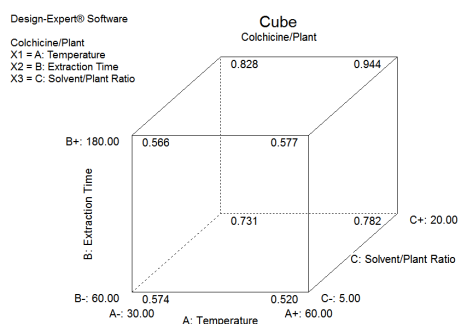
یافته ها

در این مطالعه، استخراج ترکیب کلشی‌سین با روش اولتراسوند و مدل‌های سطح-پاسخ، بهینه‌سازی شده و



نمودار شماره 2: نمودارهای کن تور و سطح- پاسخ پارامترهای مورد مطالعه (A): اثرات دما و زمان استخراج بر روی بازدهی استخراج کلشی سین، B: اثرات دما و نسبت حلال به گیاه بر روی بازدهی استخراج کلشی سین، C: اثرات زمان استخراج و نسبت حلال به گیاه بر روی بازدهی استخراج کلشی سین)

نمودار شماره 3: اثرات تداخل پارامترها بر روی میزان بازدهی استخراج کلشی سین (A): تداخل دما با زمان استخراج، B: تداخل دما با نسبت حلال به گیاه، C: تداخل زمان استخراج با نسبت حلال به گیاه)



تصویر شماره 4: مدل مکعبی تاثیر 3 پارامتر مورد مطالعه در بازدهی استخراج کلشی سین

نمودار شماره 3 تاثیر هر پارامتر را بر روی پارامتر دیگر در افزایش بازدهی استخراج کلشی سین نشان می‌دهد. بر اساس این مطالعه، افزایش دما، نیاز به افزایش زمان استخراج و نسبت حلال به گیاه را کاهش می‌دهد. همچنین در نمودار شماره 4 نمودار مکعبی بازدهی استخراج کلشی سین آورده شده است. در این نمودار، تاثیر همزمان هر 3 پارامتر را بر روی بازدهی استخراج کلشی سین نشان داده شده است.

جدول شماره 1 نتایج حاصل از هر روش استخراج را نشان می‌دهد. بر اساس داده‌های HPLC، شرایط شامل دمای 60 درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج 180 دقیقه و نسبت حلال به گیاه 20، بیش‌ترین میزان بازدهی عصاره‌گیری را ایجاد کرده که حدود 0/98 میلی‌گرم بر گرم بنه گیاه به‌دست آمد. فعالیت‌های ضد التهابی و آنتی اکسیدانی هر 20 عصاره در جدول شماره 2 آورده شده است. اعداد IC₅₀ همه عصاره‌ها بر اساس میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده که کاملاً متأثر از ترکیبات استخراجی در هر روش استخراج بوده است.

جدول شماره 2: فعالیت‌های ضد التهابی و آنتی اکسیدانی عصاره‌ها.

شماره عصاره	IC ₅₀ ضد التهابی (mg/ml)	آنتی اکسیدانی IC ₅₀ (mg/ml)
1	94/7 ± 3/8	45/7 ± 2/3
2	85/7 ± 4/5	53/8 ± 5/4
3	98/3 ± 2/1	74/3 ± 4/9
4	115/9 ± 6/8	62/8 ± 5/2
5	83/6 ± 3/4	72/9 ± 3/9
6	119/8 ± 9/2	49/8 ± 3/2
7	54/8 ± 2/6	87/4 ± 5/8
8	69/1 ± 4/2	67/8 ± 8/2
9	63/5 ± 5/7	78/9 ± 5/8
10	71/8 ± 3/7	67/4 ± 1/9
11	67/8 ± 8/2	72/8 ± 6/2
12	123/9 ± 2/3	34/9 ± 7/2
13	98/4 ± 4/3	102/9 ± 9/8
14	61/8 ± 4/9	79/9 ± 4/5
15	82/4 ± 2/9	53/9 ± 4/2
16	91/5 ± 3/8	60/8 ± 3/9
17	85/9 ± 8/2	58/6 ± 4/7
18	95/8 ± 4/8	53/7 ± 4/8
19	87/2 ± 7/5	64/9 ± 6/8
20	105/8 ± 3/9	45/8 ± 2/7
ویتامین ث	-	12/8 ± 1/4
دی‌کلروناک سدیم	26/5 ± 1/8	-

بحث

در این مطالعه، شرایط ایده‌آل استخراج کلشی‌سین با روش اولتراسوند مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین، فعالیت‌های ضد التهابی و آنتی اکسیدانی عصاره‌های به دست آمده مورد بررسی قرار گرفتند. براساس نتایج به‌دست آمده، روش اولتراسوند توانایی افزایش بازدهی استخراج کلشی‌سین از بنه گیاه *C. kurdicum* داشته است. همچنین در تمامی شرایط طراحی شده استخراج از گیاه، عملکرد ضد التهابی و آنتی اکسیدانی مناسبی به دست آمد.

در جدول شماره 1 شرایط استخراج نوشته شده که با استفاده از آزمون سطح - پاسخ طراحی شده است. سپس با توجه به این شرایط، عصاره‌گیری با اولتراسوند انجام شده و بعد از تعیین مقدار کلشی‌سین در عصاره‌های به‌دست آمده، مقادیر آن در جدول شماره 1 آورده شد. با توجه به این مطالعه، میزان استخراج کلشی‌سین با این شرایط افزایش یافت. همچنین، در مرحله مطالعه سطح - پاسخ، میزان صحت و دقت مطالعه و ارتباط بین متغیرها و تأثیر هر کدام در میزان استخراج کلشی‌سین مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به نمودار BOX-COX (نمودار شماره 1)، ارزش لامبدا معادل 0/97+ بوده که نشان‌دهنده تناسب عملکردی و صحت مدل مورد آنالیز می‌باشد.

در تصاویر شماره 2 تا 4 تأثیر هر 3 متغیر زمان استخراج، نسبت حلال به گیاه و دمای استخراج در میزان بازدهی استخراج کلشی‌سین آورده شده است. با توجه به این داده‌ها، افزایش نسبت حلال به گیاه، نیاز به افزایش دما و افزایش زمان استخراج را کاهش و افزایش دما نیز نیاز به افزایش زمان استخراج را کاهش داده و این تغییرات معنی‌دار می‌باشند. همچنین، با توجه به نمودار شماره 4، افزایش نسبت حلال به گیاه تأثیر بیش‌تری در افزایش استخراج کلشی‌سین نسبت به 2 متغیر دیگر داشت.

اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی برون‌تنی عصاره‌های به‌دست آمده از 20 شرایط مورد آنالیز در جدول شماره 2 آورده شده است. این اثرات کاملاً متأثر از ترکیبات استخراجی بوده که با توجه به ترکیبات زیست فعال موجود در بنه گیاهان این جنس گیاهی، عمدتاً مربوط به ترکیبات پلی فنلیک، فلاوونوئیدها و آلکالوئیدهای تروپولونی می‌باشند (22).

مطالعات مختلفی در زمینه ایده‌آل سازی استخراج ترکیبات فعال زیستی از منابع گیاهی انجام شده است. در مطالعه‌ای که Wong و همکارانش در سال 2017 انجام دادند، ایده‌آل سازی استخراج ترکیبات ایزوفلاوونوئیدی گیاه *Pueraria* با روش اولتراسوند را مورد بررسی

زمان عصاره گیری در صورت ثابت ماندن نسبت حلال به گیاه تا زمانی که تفاوت اسمولاریته وجود داشته باشد، باعث افزایش بازدهی استخراج می شود (26,25).

مطالعات بهینه سازی استخراج ترکیبات فعال زیستی و غذائی در صنایع مختلف داروئی و غذائی اهمیت بالائی دارند. در صنایع داروسازی با توجه به هزینه های بالای سنتز و تولید ترکیبات، ایجاد شرایط برای استخراج ترکیبات با بازدهی بالاتر بسیار حائز اهمیت بوده و صرفه جوئی زیادی در هزینه و وقت خواهد کرد. همچنین در صنایع غذائی، تهیه فرآورده های گیاهی مانند روغن ها مستلزم دارا بودن ترکیبات با منشأ طبیعی بخصوص گیاهی بوده که افزایش بازدهی استخراج آن ها از منبع مربوطه کمک بسیار زیادی در کاهش هزینه ها می کند. مطالعات فراوانی در زمینه بررسی اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی ترکیبات گیاهی انجام شده است. اثرات ضد التهابی ترکیبات اندیکاسیون های فراوانی را ایجاد کرده که شامل بیماری های آرتريت روماتوئید، استئوآرتريت، کولیت اولسروز و غیره می باشد. همچنین، فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات باعث اثربخشی آن ها در پیشگیری و درمان تعداد زیادی از بیماری ها مخصوصا آلزایمر، پیری زودرس، سمیت کبدی و کلیوی می شود (28,27).

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه دکترای تخصصی دکتر علی داوودی می باشد (شماره 1396-1102 و کد اخلاق IR.MAZUMS.REC1398.113). بدینوسیله از زحمات معاونت و پرسنل محترم پژوهشی، دانشکده داروسازی و پرسنل آزمایشگاه فارماکوگنوزی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. Kahraman A, Celep F. Anatomical Properties of 'Colchicum kurdicum' (Bornm.) Stef. (Colchicaceae). Australian Journal of Crop Science 2010; 4(5): 369-371.
2. Bayrak S, Sökmen M, Aytaç E, Sökmen A. Conventional and supercritical fluid extraction (SFE) of colchicine from Colchicum speciosum. Industrial crops and products 2018; 128: 80-84.
3. در این مطالعه، روش اولتراسوند عملکرد مناسبی را در استخراج این ترکیبات از خود نشان داد. همچنین شرایط ایده آل شامل دمای 16 درجه سانتی گراد، حلال اتانل 41 درصد و نسبت حلال به گیاه 44 برابر بوده است (13).
4. همچنین، در مطالعه ای که Chen و همکارانش در سال 2015 بر روی ایده آل سازی استخراج ترکیبات فنلی انجام دادند، از روش اولتراسوند استفاده کردند. در این مطالعه، اثر متغیرهایی مانند درصد حلال، زمان استخراج و دما بر روی بازدهی استخراج ترکیبات فنلی استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که حلال اتانل 63 درصد، دمای 50 درجه سانتی گراد و زمان 75 دقیقه باعث استخراج ایده آل ترکیبات فنلی می شود (12).
5. در پژوهشی که Dahmounie و همکارانش بر روی ایده آل سازی استخراج ترکیبات پلی فنولی انجام دادند از روش میکروویو استفاده کردند. در این مطالعه، تاثیر دما و نسبت حلال به گیاه بر روی بازدهی عصاره گیری مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس این مطالعه، شرایط بهینه عصاره گیری با اتانل 42 درصد و نسبت حلال به گیاه 32 برابر حاصل شد (23).
6. در مطالعه ای که حسینی و همکارانش بر روی استخراج پکتین انجام دادند، توانستند با روش میکروویو استخراج پکتین را ایده آل سازی کنند. در این مطالعه افزایش دما و زمان استخراج، بازدهی استخراج را افزایش داده است. همچنین، کاهش pH تا 1/5 باعث بهینه سازی استخراج پکتین گردید (24).
7. با توجه به مطالعات انجام شده، افزایش دما تا حدی که باعث تخریب ترکیبات موثره نشود باعث افزایش استخراج ترکیبات موثره گیاهان می شود. همچنین افزایش

3. Al-Snafi AE. Medicinal importance of Colchicum candidum-A review. The Pharmaceutical and Chemical Journal 2016; 3(2): 111-117.
4. Gulsoy-Toplan G, Goger F, Yildiz-Pekoz A, Gibbons S, Sariyar G, Mat A. Chemical Constituents of the Different Parts of Colchicum micranthum and C. chalcedonicum and their Cytotoxic Activities. Natural Product Communications 2018; 13(5): 535-538.
5. Basova NE, Rozengart EV, Suvorov AA. Cholinergic activity of isoquinoline alkaloids from the showy autumn crocus (Colchicum speciosum Stev.). Doklady Biochemistry and Biophysics 2006: Springer.
6. Roy A. A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. International Journal of Plant Biotechnology 2017; 3(2): 1-9.
7. Davoodi A, Khoshvishkaie E, Azadbakht M. Plant cells technology as an effective biotechnological approach for high scale production of pharmaceutical natural compounds; A meta-analysis study. Pharmaceutical and Biomedical Research 2019; 5(2): 1-9.
8. Colchicine Market 2019 Global Industry Demand, Recent Trends, Size and Share Estimation by 2025 with Top Players - ResearchReportsWorld.com. Published: Aug. 30, 2019. Available from: <https://www.marketwatch.com/press-release/colchicine-market-2019-global-industry-demand-recent-trends-size-and-share-estimation-by-2025-with-top-players---researchreportsworldcom-2019-08-30>. Accessed October 2, 2019
9. Kowalczyk K, Błaż A, Ciszewski WM, Wieczorek A, Rychlik B, Płażuk D. Colchicine metallocenyl bioconjugates showing high antiproliferative activities against cancer cell lines. Dalton Transactions 2017; 46(8): 17041-17052.
10. Evans WC. Trease and Evans Pharmacognosy, International Edition E-Book: 16th ed. Elsevier Health Sciences 2009.
11. Hosseini A, Shorofi SA, Davoodi A, Azadbakht M. Starting Dose Calculation for Medicinal Plants in Animal Studies; Recommendation of a Simple and Reliable Method. Research Journal of Pharmacognosy 2018; 5(2): 1-7.
12. Chen M, Zhao Y, Yu S. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. Food chem 2015; 172: 543-550.
13. Wong KH, Li GQ, Li KM, Razmovski-Naumovski V, Chan K. Optimisation of Pueraria isoflavonoids by response surface methodology using ultrasonic-assisted extraction. Food Chem 2017; 231: 231-237.
14. Tahmasebi-Boldaji R, Hatamipour MS, Khanahmadi M, Sadeh P, Najafipour I. Ultrasound-assisted packed-bed extraction of hypericin from Hypericum perforatum L. and optimization by response surface methodology. Ultrasonics sonochemistry 2019; 57: 89-97.
15. Fakhri M, Davoodi A, Parviz M, Sadeghi Ghadi Z, Mousavinasab SN, Farhadi R, et al. Characterization and HPLC analysis of manna from some cotoneaster species. Int J Pharma Sci Res 2017; 8(12): 5360-5366.
16. Azadbakht M, Ramzani M, Jahromi moghaddam M. Identification and determination of phenyl glycoside in the leaf of Pyrus boissieriana buhse by two methods of HPLC and spectrophotometry. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2003; 13(41): 1-8.

17. Joshi SA, Jalalpure SS, Kempwade AA, Peram MR. Development and validation of HPLC method to determine colchicine in pharmaceutical formulations and its application for analysis of solid lipid nanoparticles. *Current Pharmaceutical Analysis* 2018; 14(1): 76-83.
18. Rahman H, Eswaraiah MC, Dutta A. In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza Sativa* Var. joha rice (an aromatic indigenous rice of Assam). *Am Eurasian J Agric Environ Sci* 2015; 15: 115-121.
19. Jin JH, Kim JS, Kang SS, Son KH, Chang HW, Kim HP. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of total flavonoids of the roots of *Sophora flavescens*. *Journal of ethnopharmacology* 2010; 127(3): 589-595.
20. Khalili M, Fathi H, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity of bulbs and aerial parts of *Crocus caspius*, impact of extraction methods. *Pak J Pharm Sci* 2016; 29(3): 773-777.
21. Baghbadorani ST, Ehsani MR, Mirlohi M, Ezzatpanah H, Azadbakht L, Babashahi M. Antioxidant capability of ultra-high temperature milk and ultra-high temperature soy milk and their fermented products determined by four distinct spectrophotometric methods. *Adv Biomed Res* 2017; 6: 62.
22. Khan H, Tariq SA, Khan MA. Biological and phytochemical studies on corms of *Colchicum luteum* Baker. *Journal of Medicinal plants research* 2011; 5(32): 7031-7035.
23. Dahmoune F, Nayak B, Moussi K, Remini H, Madani K. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry* 2015; 166: 585-595.
24. Hosseini SS, Khodaiyan F, Yarmand MS. Optimization of microwave assisted extraction of pectin from sour orange peel and its physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers* 2016; 140: 59-65.
25. Salamanca CA, Fiol N, González C, Saez M, Villaescusa I. Extraction of espresso coffee by using gradient of temperature. Effect on physicochemical and sensorial characteristics of espresso. *Food Chemistry* 2017; 214: 622-630.
26. Santos JS, Deolindo CTP, Esmerino LA, Genovese MI, Fujita A, Marques MB, et al. Effects of time and extraction temperature on phenolic composition and functional properties of red rooibos (*Aspalathus linearis*). *Food Research International* 2016; 89: 476-487.
27. Hidalgo M, Sánchez-Moreno C, de Pascual-Teresa S. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry* 2010; 121(3): 691-696.
28. Kris-Etherton PM, Lefevre M, Beecher G, Gross M, Keen CL, Etherton TD. Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annu Rev Nutr* 2004; 24: 511-538.