مقایسه ترکیبات استخراج شده اسانس گیاه *Tanacetum sonbolii* با روش‌های استخراج جذبی از فضای فوقانی و تقطیر با آب

زهرا طالب‌پور[1]*، سیما نجفی[2]، علی سنبلی[3]، معصومه فیروزی[4]، مینو خسروشاهی[5]

۱- دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۳- استادیار، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
٤- دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد شیمی تجزیه، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
٥- کارشناس شیمی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
*آدرس مکاتبه: تهران، میدان شیخ بهایی، دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی
صندوق‌پستی: ۱۹۹۳۸۹٤۳۳٦
تلفن و نمابر: ۸۸۰٤۱۳٤٤ (۰۲۱)
پست الکترونیک: ztalebpour@yahoo.com، ztalebpour@alzahra.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۲۸ **تاریخ تصویب:** ۹۲/۵/۱٦

چکیده

مقدمه: تاکنون چندین گونه‌ی متفاوت از جنس ***Tanacetum*** در نواحی مختلف ایران گزارش شده است که یکی از آنها، گونه‌ی ***sonbolii* Mozaff.** است. برای استخراج اسانس این گیاه شرایط دمایی و زمان مورد نیاز در روش‌های استخراج، می‌تواند در ماهیت اسانس استخراج شده تأثیر گذارد. انتخاب روش مناسب استخراج که منجر به جداکردن اسانسی با ماهیتی هر چه نزدیک‌تر به اسانس طبیعی گیاه باشد، بسیار حائز اهمیت است.

هدف: استفاده از روش استخراج جذبی از فضای فوقانی **(HS-SE)** در دو شرایط دمایی طبیعی و بالا برای استخراج اسانس گیاه.

روش بررسی: استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی، به منظور بررسی کیفی و کمی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌های استخراج شده در شرایط مختلف (طبیعی و دمای بالا).

نتایج: روش تقطیر با آب تعداد ترکیب بیشتری (۲٦ ترکیب در ۹٦/۵ درصد کل اسانس) را از گیاه استخراج می‌کند اما این ترکیبات به لحاظ تعداد، نوع و مقدار مواد با ترکیبات استخراج شده از روش **HS-SE** در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد (٦ ترکیب در ۹۵/٦ درصد کل اسانس) متفاوت هستند. به طوری که ۸۱ درصد اسانس این گیاه که با روش **HS-SE** استخراج شده، حاوی مونوترپن‌های بتا و آلفا پینن است در صورتی که بیشتر از نصف اسانس استخراج شده با روش تقطیر با آب در دمای بالا، سزکویی‌ترپن‌های الکلی مانند آلفا کادینول و گلوبولول است.

نتیجه‌گیری: اجزای اصلی اسانس استخراج شده از گونه‌ی ***sonbolii* Mozaff.**، با آنچه از دیگر گونه‌های این جنس گزارش شده، متفاوت است. همچنین، اعمال دما به مدت طولانی منجر به تغییر ماهیت اسانس طبیعی گیاه انتخابی می‌شود.

گل‌واژگان: ***Tanacetum sonboli* Mozaff**، استخراج جذبی از فضای فوقانی **(HS-SE)**، تقطیر با آب، کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی

مقدمه

تیره کاسنی یکی از بزرگ‌ترین تیره‌های گیاهان دو لپه‌ای دارای حدود ۱۶۰۰ – ۱۷۰۰ جنس و ۲۳۰۰۰ گونه است که تقریباً در تمام سطح کره زمین پراکنده‌اند و به ویژه در مناطق معتدل و سرد به طور فراوانی می‌رویند [۱]. جنس *Tanacetum* از این تیره با ۱۶۰ گونه در سراسر اروپا و غرب آسیا پراکنده شده است [۲]. گونه‌ی *Tanacetum parthenium* از زمان‌های گذشته به منظورهای مختلف دارویی استفاده می‌شده است و امروزه اهمیت چشمگیری به واسطه توانایی در تسکین علایم میگرن، آرتروز و جلوگیری از انباشتگی پلاکت خون پیدا کرده است [۳]. در تعدادی از گزارش‌ها، اجزای اسانس استخراج شده از گونه‌های *vulgare* [٤]، *parthenium* [٥]، *aucheranum* و *chiliophyllum* [٦]، *argenteum* [٧] و *balsamita* L. و *chiliophyllum* [٨] این گیاه که با استفاده از روش تقطیر با آب جدا شده‌اند، تعیین شده است. بر این اساس، camphor، α pinene، trans-chrysanthenol و camphor، به ترتیب جزء اصلی اسانس استخراج شده از گونه‌های *parthenium*، *argenteum*، *balsamita* و *chiliophyllum* هستند.

گیاه مورد مطالعه در این تحقیق با نام *Tanacetum sonbolii* Mozaff. برای نخستین بار در سال ۲۰۰۵ در ایران معرفی شد [۹]. این گیاه به شکل پشته‌ای، پوشیده از کرک‌های بلند و جدای خاکستری فشرده، بیخ ساقه پر ساقه، ساقه‌ها با ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر در بخش قاعده‌ای با برگ‌های انبوه، کم و بیش شیاردار، در بخش فوقانی برگ‌دار یا عریان است. این گیاه در شمال غرب ایران، منطقه‌ی آذربایجان، تکاب به چهارتاق، روستای بدرلو، اطراف تالاب چملی، به مساحت ۲٤۱۸ مترمربع رویش دارد. ترکیب شیمیایی اسانس استخراج شده‌ی این گیاه با استفاده از روش تقطیر با آب توسط همین گروه تحقیقاتی تعیین و همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی آن بررسی شده است [۱۰].

روش مناسب استخراج اسانس از گیاهان با توجه به نوع گونه، اندام گیاه، نوع ماده مؤثر (آلکالوئید، فلاونوئید، ترپن‌ها و قندها) و در نهایت درجه خلوص محصول نهایی انتخاب می‌شود [۱۱]. متداول‌ترین روش استخراج اسانس گیاهان، تقطیر مستقیم بافت‌های گیاه، با آب یا بخار آب است. از آنجایی که در این روش‌ها دمای اعمالی در سیستم بالا است امکان ایجاد مواد تخریبی و یا تغییر یافته در اسانس وجود دارد. بنابراین انتظار تفاوت بین نتایج حاصل از این روش و اسانس استنشاق شده در شرایط طبیعی از گیاه وجود دارد.

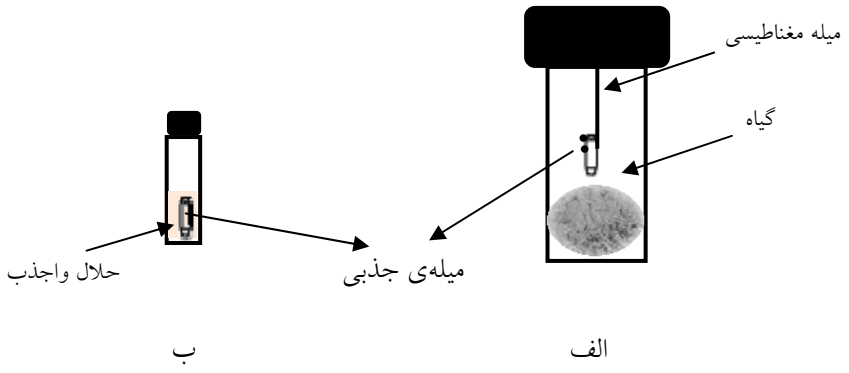
امروزه علاوه بر تقطیر، روش‌های دیگری مانند استخراج با حلال [۱۲]، استخراج با کربن دی اکسید فوق بحرانی [۱۳] و استخراج با استفاده از روش‌های مختلف جذبی مورد توجه گسترده‌ای قرار گرفته است. در این میان، توجه محققان بیشتر به روش‌های ریز استخراج فاز جذبی معطوف شده است که به دلیل عدم نیاز به حلال‌های آلی سمی و یا مصرف بسیار ناچیز آنها در زمره‌ی روش‌های دوستار محیط زیست قرار می‌گیرد. به علاوه عدم استفاده از دماهای بالا برای زمان‌های طولانی در این روش‌ها، امکان به حداقل رساندن تغییر در ماهیت طبیعی اسانس استخراج شده را ایجاد می‌سازد [١٤].

از جمله‌ی روش‌های ریز استخراج جذبی می‌توان به ریز استخراج فاز جامد (Solid Phase Microextraction) (SPME)، اشاره کرد که امروزه هم در محیط آزمایشگاه و هم در شرایط طبیعی، به صورت گسترده‌ای برای استخراج اسانس به کار می‌رود. مقالات دوره‌ای به چاپ رسیده در این زمینه مؤید این مطلب است [۱۷ – ۱۵]. پرکاربردترین جاذب استفاده شده در این روش، پلی دی متیل سیلوکسان (PDMS) (Polydimethylsiloxane) است که با قرار گرفتن در فضای فوقانی نمونه ترکیبات موجود در اسانس را جذب می‌کند. در بیشتر گزارش‌ها موجود در این زمینه دیده شده که شرایط آماده‌سازی نمونه مانند دما و زمان اعمالی باعث تغییر پروفایل اسانس استخراج شده از گیاه می‌شود [۱۸،۱۹]. ظرفیت پایین استخراج با روش SPME به دلیل حجم کم جاذب به کار برده شده، جزء محدودیت‌های اصلی آن به حساب می‌آید. بر پایه‌ی این مشاهدات، در سال ۱۹۹۹، بالتوسن (Baltussen) و همکارانش روش استخراج جذبی با میله چرخان (SBSE) را

معرفی کردند [۲۰]. در این روش از یک میله چرخان که با یک لایه به ضخامت ۱ – ۰/۵ میلی‌متر از PDMS پوشیده شده، استفاده می‌شود. مزیت اصلی روش SBSE نسبت به SPME، حجم بیشتر PDMS به کار رفته در آن می‌باشد که باعث ایجاد بازیابی‌های بالاتر و ظرفیت نمونه‌ای بیشتر می‌شود.

روش SBSE به دو صورت مستقیم (Direct SBSE) و نمونه‌برداری از فضای فوقانی (Headspace Sorptive Extraction) (HS-SE) در درجه‌ی حرارت محیط و یا در درجه‌ی حرارت‌های بالاتر انجام می‌شود. در روش اول، میله چرخان در داخل یک نمونه مایع قرار گرفته و نمونه برای مدت مشخصی هم زده می‌شود. در حالت دوم، مقداری از یک نمونه جامد یا مایع در ظرف قرار می‌گیرد و میله چرخان به صورت آویزان در فضای بالای نمونه قرار داده می‌شود (شکل شماره ۱– الف). در هر دو روش، پس از طی زمان و جذب آنالیت به داخل لایه‌ی PDMS، میله چرخان از محیط خارج شده و خشک می‌شود. سپس با استفاده از حجم کمی از یک حلال آلی (Liquid desorption) (LD) (شکل شماره ۱ – ب) آنالیت از روی پوشش PDMS واجذب شده و به داخل سیستم تجزیه‌ای تزریق می‌شود.

روش SBSE برای تعیین ترکیبات مختلف در نمونه‌های زیست محیطی [۲۲، ۲۱]، دارویی [۲٤، ۲۳] و غذایی [۲٦، ۲۵] به صورت گسترده‌ای استفاده می‌شود. به علاوه گزارش‌هایی پیرامون استفاده از روش‌های مختلف SBSE برای استخراج اسانس گیاهان مختلف وجود دارد که در مقاله‌های دوره‌ای به چاپ رسیده به آنها اشاره شده است [۲۸، ۲۷]. به طور مثال، اسانس چهار گیاه دارویی rosemary، sage، thyme و valerian با استفاده از روش HS-SE استخراج شده و در مقایسه با روش HS-SPME، ظرفیت غلظتی بسیار بالایی نشان داده است [۲۹]. به علاوه در بررسی دیگر، اثر نسبت فازی، حجم و اندازه‌ی جاذب و دما و زمان اعمالی در مرحله‌ی استخراج بر روی بازیافت برخی از ترکیبات فرار موجود در اسانس‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است [۳۰]. تجزیه‌ی انتخابی مونوترپن‌های کایرال موجود در اسانس گیاهان مختلف مانند thyme، eucalyptus و tea tree با استفاده از روش‌های مختلف SBSE از دیگر گزارش‌هایی است که در این زمینه موجود است. نکته‌ی حائز اهمیت در این گزارش تفاوت نسبت انانتیومری دیده شده در اسانس استخراج شده از گیاه خشک و زنده است [۳۱].



شکل شماره ۱– طرح واره‌ی روش استخراج از فضای فوقانی نمونه با میله جذبی (HS-SE) در مرحله‌ی الف) جذب و ب) واجذب

هدف از این پژوهش، استفاده از روش استخراج جذبی از فضای فوقانی (HS-SE) گیاه به منظور استخراج اسانس استنشاقی گیاه *Tanacetum sonboli* Mozaff. است. پس از بهینه شدن شرایط استخراج، اثر دمای محیط بر درصد ترکیبات اسانس استخراج شده بررسی شد. به علاوه نتایج حاصل با ترکیبات مشخص شده در اسانس استخراج شده با تقطیر با آب، مقایسه شد. شناسایی کیفی و تعیین درصد ترکیبات اسانس با استفاده از کروماتوگرافی گازی – طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) و کروماتوگرافی گازی (GC) انجام شد. از آنجایی که فرد هرگز در هنگام تماس با یک گیاه، با کل مواد فرار استخراج شده با روش‌های کلاسیک روبرو نیست بلکه تنها اجزای خاص و فراری از اسانس است که در شرایط طبیعی از گیاه به مشام می‌رسد، با این بررسی می‌توان تفاوت بین ترکیبات اسانس گیاه در شرایط مختلف را با یکدیگر مقایسه نمود. از سوی دیگر، اغلب روش‌هایی که برای استخراج کل اسانس یک ماده مورد استفاده قرار می‌گیرند، نظیر اعمال دما، میکروویو و حلال فوق بحرانی، با اعمال استرس می‌توانند ساختار ماده اسانسی را نیز تغییر دهند.

مواد و روش‌ها

معرف‌های شیمیایی

دی اتیل اتر و کلروفرم از شرکت رانکم (Rankem) (هند) و هگزان، اتیل استات، بوتانول، سیکلو هگزان و سدیم سولفات از شرکت مرک (Merck) (آلمان) خریداری شدند. متانول از شرکت کالدون (Caledon) (کانادا) تهیه شد.

منابع گیاهی مورد استفاده

گونه *Tanacetum sonbolii* توسط جناب آقای دکتر علی سنبلی شناسایی و با شماره هرباریومی MPH-999 در هرباریوم پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی (MPH) دانشگاه شهید بهشتی نگهداری می‌شود. این گیاه از رویشگاه طبیعی آن واقع در روستای بدرلو شهر تکاب استان آذربایجان غربی جمع‌آوری شد. منابع گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل اندام هوایی گل‌دار گیاه بود. نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده پس از انتقال به آزمایشگاه، در سایه و به دور از نور مستقیم خورشید خشک شد. گیاه قبل از اسانس‌گیری خرد شده و سپس عملیات آزمایشگاهی بر روی آن انجام گرفت.

دستگاه‌ها

برای آنالیز اسانس گیاه مورد نظر از یک دستگاه GC-MS مدل ۵۹۷۳ (اجیلنت، آمریکا)، مجهز به ستونی از نوع HP-5 (30 m × 0.25 mm) استفاده شد. در برنامه‌ریزی دمایی ستون، دمای آون به مدت ۱ دقیقه در ٦۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد و سپس با سرعت 5° C min^{-1} تا دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و در آن دما یک دقیقه ثابت ماند. پس از آن با سرعت ۵ ^{o} min C^{-1} تا دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش پیدا کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در آن دما نگه داشته شد. از حالت تزریق انشعابی (Split) با نسبت انشعاب (Split ratio) ۱ به ۱۰۰ استفاده شد و دمای محل تزریق در ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد ثابت شد. در هر دو مورد از گاز حامل هلیم با سرعت ۱/۱ mL min^{-1} استفاده شد. شناسایی ترکیبات با استفاده از محاسبه‌ی اندیس بازداری و مقایسه‌ی طیف جرمی هر ترکیب با نمونه‌های موجود در کتابخانه انجام شد [۳۲]. به منظور محاسبه اندیس بازداری، مخلوطی از آلکان‌های نرمال شش تا بیست و چهار کربنی در شرایط مشابه دستگاهی، به سیستم تزریق شدند و اندیس کواتز هر ترکیب محاسبه شد [۳۳]. مراحل بهینه‌سازی روش استخراج پیشنهادی با استفاده از از یک سیستم GC مدل ٦۸۹۰، متعلق به شرکت اجیلنت (Agilent) (آمریکا) مجهز به ستونی از نوع HP-5 (30 m × 0.32 mm) و با همان برنامه‌ریزی دمایی ذکر شده در بالا، انجام شد.

روش استخراج اسانس

روش استخراج جذبی از فضای فوقانی (HS-SE)

در این پژوهش از میله چرخان مدل تویستر (Twister) که از شرکت گرستل (Gerstel) (آلمان) تهیه شده بود، استفاده شد. طول این قطعه ۱۰ میلی‌متر بود که لایه‌ای از PDMS به

ضخامت ۰/۵ میلی‌متر و حجم ۲٤ میکرولیتر روی آن قرار داشت. به منظور آماده‌سازی میله چرخان برای اولین بار، ابتدا میله چرخان در یک میلی‌لیتر مخلوط استونیتریل - متانول (v/v) ۲۰: ۸۰ برای مدت ۲٤ ساعت قرار گرفت و بعد از این زمان میله چرخان از محلول خارج شده و با دستمال کاغذی خشک شد. همچنین میله چرخان بعد از هر بار استفاده نیز آماده‌سازی می‌شد. به این منظور، میله چرخان در یک میلی‌لیتر متانول برای مدت نیم ساعت قرار می‌گرفت و سپس با دستمال نرم کاغذی خشک شده، برای استخراج بعدی استفاده می‌شد.

در هر بار استخراج با استفاده از این روش، ۵ گرم از گیاه تازه پس از خرد شدن در داخل ویال قرار داده شد و مطابق شکل شماره ۱- الف، میله جذبی با استفاده از یک آهن‌ربا بالای فضای فوقانی ویال که دمای آن بالا برده شده بود، ثابت شد. پس از گذشت زمان معین، میله جذبی از ویال جدا شد و واجذب نمونه به روش LD (شکل شماره ۱- ب) انجام شد. حجم حلال استفاده شده در این مرحله ۳۰۰ میکرولیتر بود و نوع حلال، دما و زمان واجذب از عواملی بودند که در مرحله‌ی بهینه‌سازی مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت محلول واجذب به دستگاه GC یا GC- MS تزریق شد. به منظور بهینه‌سازی زمان لازم برای جذب، مدت‌های ۱۵، ٤۵ و ٦۰ دقیقه بررسی شدند. همچنین تأثیر دمای محیط بر درصد ترکیبات استخراج شده با انجام جذب در دماهای ۲۳، ۵۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد مطالعه شد.

استخراج با روش تقطیر با آب

روش تقطیر با آب با استفاده از دستگاه کلونجر انجام شد. در هر بار اسانس‌گیری با این روش، مقدار ۳۰۰ گرم گیاه خشک با مخلوط‌کن خرد شده و عمل اسانس‌گیری در حضور یک لیتر آب به مدت ۲۱۰ دقیقه ادامه یافت. سپس مایع روغنی به دست آمده با اضافه کردن مقداری اتر از فاز آبی جدا شد و توسط مواد جذب کننده رطوبت (سدیم سولفات) خشک شد. پس از پراندن اتر با استفاده از جریان گاز نیتروژن، اسانس به دست آمده به دقت توزین شده و در ظرف‌های مخصوص تا هنگام آنالیز در یخچال نگهداری شد. درصد وزنی - وزنی اسانس استخراج شده بر اساس وزن خشک گیاه، ۰/۱۵ به دست آمد.

نتایج

بهینه‌سازی روش استخراج جذبی از فضای فوقانی (HS-SE)

از آنجایی که در روش استخراج جذبی از فضای فوقانی (HS-SE)، از یک سو حجم جاذب استفاده شده بیشتر از روش SPME است و از سوی دیگر حجم حلال مورد نیاز برای واجذب بسیار کم است، این روش دارای بازیابی و ظرفیت نمونه‌ای بسیار مناسب به همراه فاکتور تغلیظ بالا است. از این رو با استفاده از این روش، می توان استخراجی با کارایی بالا را در دمای محیط و بدون اعمال هیچ‌گونه تنش انجام داد. عوامل متعددی بر میزان استخراج گونه‌های خارج شده در این روش تأثیرگذار هستند که بهینه‌سازی آنها، جزء مراحل ابتدایی تحقیق است. این روش استخراجی دارای دو مرحله جذب و واجذب است که به صورت جداگانه بهینه شدند.

مهم‌ترین عامل تأثیرگذار بر روی مقدار آنالیت واجذب شده از پوشش، نوع حلال واجذب است. برای بررسی این عامل، پس از انجام استخراج در شرایط یکسان، در مرحله‌ی واجذب از چهار حلال دی اتیل اتر، هگزان، سیکلوهگزان و هگزانال استفاده شد. پس از ثبت کروماتوگرام‌های محلول‌های واجذب، نتایج از نظر تعداد گونه‌ی استخراج شده و همچنین میزان آنها مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان دادند که از بین حلال‌های استفاده شده، پایین‌ترین سطح زیر پیک‌ها برای ترکیبات مشاهده شده در کروماتوگرام، مربوط به زمانی است که از هگزان به عنوان حلال واجذب استفاده شده است. در مقابل حداکثر کارایی واجذب با استفاده از حلال هگزانال به دست آمد.

ترکیب‌های شاخص واجذب شده با حلال هگزانال، آلفا پینن، بتا پینن، جرماکرن دی، ۱ و ۸ سینئول، گلوبولول و آلفا - کادینول بودند. این ترکیبات دارای نقطه جوش کمی هستند و عموماً در ستون‌های کروماتوگرافی گازی از اولین

ترکیباتی هستند که خارج می‌شوند. مولکول‌های سنگین‌تر که در گزارش قبلی‌مان برای این گیاه دیده شده، اغلب دارای فراریت کمتری هستنند.

پارامتر مهم دیگری که اثر آن بر فرایند واجذب مورد مطالعه قرار گرفت، دما بود. برای بررسی این پارامتر، دو دمای ۲۳ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای مرحله‌ی واجذب انتخاب شد و فرایند واجذب در این دو دما با استفاده از حلال هگزانال انجام گرفت. سپس سطح زیر پیک ترکیبات استخراج شده با بررسی کرماتوگرام‌های به دست آمده مقایسه شد. نتایج نشان داد که میزان استخراج ترکیبات شاخص اسانس در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، بیشتر است که می‌توان آن را به از دست رفتن نمونه در دمای بالا به دلیل فراریت ترکیبات نسبت داد. آخرین عامل مورد آزمایش در این مرحله، زمان واجذب بود که در دو مقدار ۱۵ و ۳۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که در مورد تمامی ترکیبات استخراج شده، افزایش زمان واجذب از ۱۵ به ۳۰ دقیقه منجر به کاهش محسوس سطح زیر پیک آنها می‌شود. بنابراین حلال هگزانال، دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و مدت ۱۵ دقیقه، به عنوان شرایط بهینه‌ی مرحله‌ی واجذب انتخاب شدند.

در ادامه اثر زمان جذب نیز در در روش HS-SE مورد بررسی قرار گرفت. سه مدت استخراج ۱۵، ٤٥ و ٦٠ دقیقه‌ای برای مرحله‌ی جذب انتخاب شد و با ثابت بودن عوامل دیگر، آزمایش‌ها انجام گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش زمان جذب از ۱۵ به ٤٥ دقیقه، سطح زیر پیک تمامی ترکیبات ظاهر شده در اسانس افزایش محسوسی کرده ولی پس از افزایش این زمان به ٦٠ دقیقه، سطح زیر پیک‌ها کاهش می‌یابد. بنابراین ٤٥ دقیقه به عنوان زمان مناسب برای فرایند استخراج روی میله‌ی جذبی انتخاب شد.

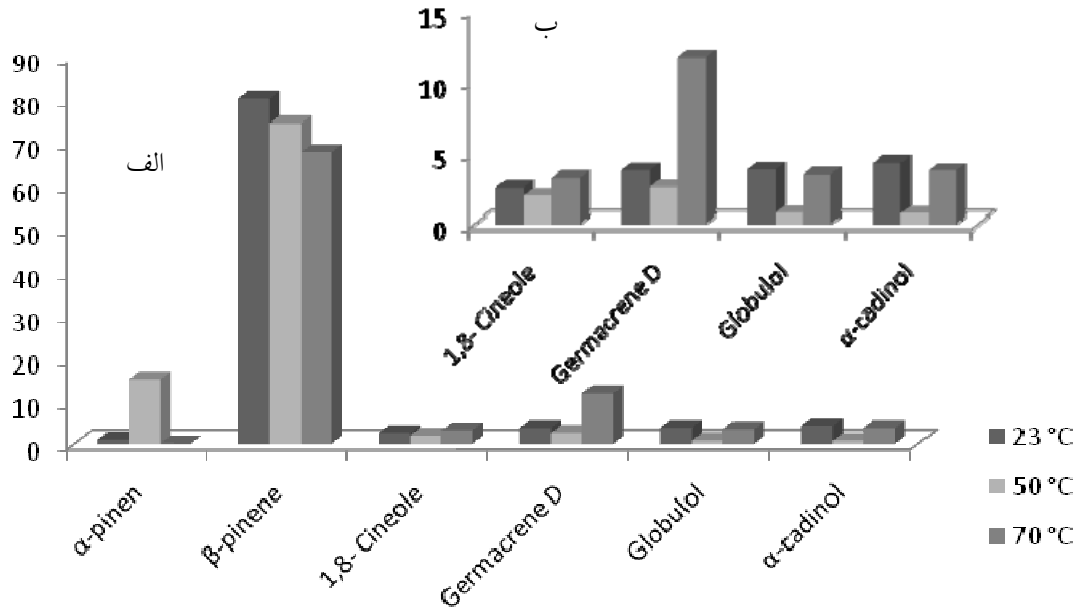
اثر دمای محیط بر پروفایل اسانس استخراج شده توسط روش HS-SE

به منظور بررسی اثر دما بر پروفایل ترکیب‌های اسانس استخراج شده، استخراج اسانس از گیاه جامد در سه دمای ۲۳، ۵۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد و پس از واجذب در هگزانال، کروماتوگرام‌های آن ثبت شد. نتایج مربوط به دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد که نزدیک‌ترین شرایط را به اسانس تنفسی از این گیاه در حالت طبیعی دارد، نشان داد که این اسانس حاوی ۸۰/۳ درصد بتا پینن، ٤/۳ درصد آلفا – کادینول، ۳/۸ درصد جرماکرن دی، ۳/۸ درصد گلوبولول، ۲/۵ درصد ۱ و ۸ سینئول و ۰/۹ درصد آلفا پینن است. با بالا بردن دمای محیط تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد، سطح زیر پیک تمامی ترکیبات استخراج شده به مقدار نامساوی افزایش یافت به طوری که میزان آلفا پینن به ۱۵/۰ درصد کل اسانس استخراج شده رسید. این در حالی بود که درصد گلوبولول و آلفا کادینول در این دما کاهش محسوسی کرد. با افزایش دمای مرحله ی جذب به ۷۰ درجه سانتی‌گراد، درصد بتا و آلفا پینن نسبت به دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت و درصد جرماکرن دی در نمونه به ۱۱/۷ رسید. به علاوه در این دما، این شش ترکیب، ۹۰/۱ درصد اسانس استخراج شده را تشکیل می‌دادند و ترکیبات دیگری نیز در مخلوط دیده شد. کلیه‌ی این تغییرات در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج مشخص است که دمای محیط، پروفایل غلظتی اسانس گیاه را تحت تأثیر می‌گذارد.

بحث

اعمال دما در روش‌های استخراج مختلف اگرچه ممکن است کارایی استخراج را بالا برده و ترکیبات بیشتری را از گیاه بیرون بکشد اما به دلیل احتمال وجود تخریب ترکیب‌ها و یا تبدیل آنها به گونه‌های دیگر، نشان‌دهنده‌ی ماهیت اسانس تنفسی در حالت طبیعی نیست. در روش HS-SE، تغلیظ ترکیبات فرار و معطر گیاه جامد، بدون نیاز به دمای بالا و به عبارت دیگر در شرایط طبیعی امکان‌پذیر است. همچنین با کنترل دما در مرحله‌ی جذب، این امکان فراهم می‌شود که تغییر احتمالی ماهیت اسانس استخراج شده با دما، مورد بررسی قرار گیرد.

به این منظور مقایسه‌ای بین ترکیبات استخراج شده از گیاه *Tanacetum sonbolii* Mozaff. با استفاده از روش پیشنهادی HS-SE و روش تقطیر با آب که در مطالعه‌ی قبلی توسط همین گروه تحقیقاتی انجام شده است، صورت گرفت.



شکل شماره ۲- الف) اثر دمای محیط در مرحله‌ی جذب بر درصد ترکیبات استخراج شده با روش HS - SE، ب) بزرگ شده‌ی قسمتی از منحنی ۲- الف

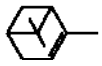
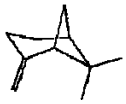
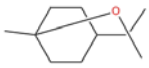
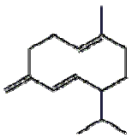
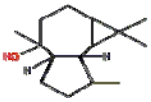
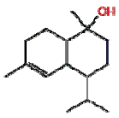
در یک نگاه کلی مشخص می‌شود که ۹۵/٦ درصد از ترکیبات موجود در اسانس استخراج شده توسط روش HS-SE در شرایط طبیعی (۲۳ درجه سانتی‌گراد)، شناخته شدند که سهم اصلی آن مربوط به مونوترپن بتا- پینن (۸۰/۳٤ درصد) است. همچنین آلفا - کادینول (٤/۳ درصد) جرماکرن دی (۳/۸ درصد) و گلوبولول (۳/۸ درصد) نیز به مقدار قابل توجهی در این اسانس دیده می‌شوند. در مقابل اسانسی که با روش تقطیر با آب در دمای حدود ۱۰۰ - ۸۰ درجه سانتی‌گراد استخراج شده، حاوی ۲٦ ترکیب شناخته شده است که ۹٦/۵ درصد آن را تشکیل می‌دهند که ۷۳/۲ درصد آن شش ترکیبی است که در استخراج با روش HS-SE نیز دیده شده است. ترکیبات شاخص اسانس استخراج شده به روش تقطیر با آب، سزکویی‌ترپن‌هایی همچون آلفا - کادینول (۳۵/۳ درصد)، گلوبولول (۲۰/۱ درصد) و جرماکرن دی (۵/۸ درصد) هستند و ترکیبات دیگری همچون ۱،۸ سینئول (۸/٦ درصد)، وریدیفلورول (۳/۹ درصد)، ترانس وربنول (۳/۲ درصد)، آلفا پینن (۲/۸ درصد) و ترپینن ٤ ال (۲/۵ درصد) نیز در این اسانس وجود دارند. لازم به ذکر است که مقدار بتا - پینن در این اسانس بسیار ناچیز است. درصد شش ترکیب مشابه موجود در این دو اسانس که در شرایط دمایی متفاوت استخراج شده‌اند، در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

همان‌طور که مشخص است حدود ۸۱ درصد اسانس این گیاه که در شرایطی مشابه شرایط طبیعی تنفس می‌شود، حاوی مونوترپن‌های بتا و آلفا پینن است در صورتی که بیشتر از نصف اسانس استخراج شده در دمای بالا، سزکویی‌ترپن‌های الکلی مانند آلفا کادینول و گلوبولول است. همچنین احتمال دارد بسیاری از ترکیبات اکسیژن‌دار مشاهده شده در روش تقطیر با آب، از جمله مواد اکسید شده در شرایط گرم و حضور اکسیژن باشند.

بدیهی است به منظور معرفی ویژگی‌های گیاه و مشخص کردن تأثیر آن بر محیط اطراف و یا بررسی احتمال وجود حساسیت به گیاه، اطلاعاتی در مورد ترکیبات موجود در اسانس آن که در حالت طبیعی استنشاق می‌شوند، لازم است. بر این اساس روش استخراجی مناسب است که بتوان با استفاده از آن با حداقل دستکاری در پروفایل ترکیبات موجود در اسانس، اجزاء را شناسایی کرد و درصد آنها را مشخص نمود. به عبارت دیگر می‌توان نتایج به دست آمده از روش HS-SE را درخصوص معرفی اسانس گیاه مد نظر، واقعی‌تر از

نتایج روش‌های دیگر که از گرما استفاده کرده و در حضور اکسیژن و آب انجام می‌گیرند، دانست.

جدول شماره ۱- مقایسه‌ی درصد ترکیبات استخراج شده با دو روش استخراج جذبی از فضای فوقانی (HS-SE) در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و تقطیر با آب

نام ترکیب	ساختار شیمیایی	RI[a]	HS-SE (درصد)	تقطیر با آب (درصد)
α-Pinene		۹۳۹	۰/۹	۲/۸
β-Pinene		۹۷۹	۸۰/۳	۰/٦
1,8- Cineole		۱۰۳۱	۲/۵	۸/٦
Germacrene D		۱٤۸۵	۳/۸	۵/۸
Globulol		۱۵۹۰	۳/۸	۲۰/۱
α-Cadinol		۱٦۵۲	٤ /۳	۳۵/۳
درصد کل			۹۵/٦	۷۳/۲

[a] اندیس بازداری نسبی روی ستون BP-5 نسبت به آلکان‌های نرمال (C_6-C_{24})

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله لازم است از شورای محترم پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه الزهرا جهت حمایت از پژوهش انجام شده تشکر و قدردانی به عمل آید.

منابع

1. Funk V, Susanna A, Stuessy TF and Bayer R. (Eds), Systematics, evolution, and biogeography of the compositae. IAPT, 2009, Vienna.

2. Oberprieler C, Vogt R and Watson LE. Tribe anthemideae cass. In Kadereit JW and Jeffrey C (Eds.), The families and genera of vasicular plants, Flowering Plants, Eudicots, Asterales, Springer, Berlin, 2006, Vol. 8, pp: 342 - 74.

3. Pfaffenrath V, Diener HC, Fischer M, Friede M and Henneicke-von Zepelin HH. The efficacy and safety of Tanacetum parthenium (feverfew) in migraine prophylaxis-a double-blind, multicentre,

randomized placebo-controlled dose–response study. *Cephalalgia* 2002; 22: 523 – 32.

4. Chiasson H, Belanger A, Bostanian N, Vincent C and Poliquin A. Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. *Journal of Economic Entomol*. 2001; 94: 167 - 71.

5. Mirjalili MH, Salehi P, Sonboli A and Mohammadi Vala M. Essential oil composition of feverfew (Tanacetum parthenium) in wild and cultivated populations from IRAN. *Chemistry of Natural Compounds* 2007; 43: 218 - 20.

6. Salamci E, Kordali S, Kotan R, Cakir A and Kaya Y. Chemical compositions, antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish Tanacetum aucheranum and Tanacetum chiliophyllum var. chiliophyllum. *Biochemical Systematics and Ecology* 2007; 35: 569 – 81.

7. Tabanca N, Demirci F, Demirci B, Wedge DE and Baser KHC. Composition, enantiomeric distribution, and antimicrobial activity of *Tanacetum argenteum* subsp flabellifolium essential oil. *Journal of Pharmaceurical and Biomedical Analysis* 2007; 45: 714 - 9.

8. Bagci E, Kursat M, Kocak A and Gur S. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamita* and *T. chiliophyllum* (Fisch. et Mey.) Schultz Bip. *var. chiliophyllum* (Asteraceae) from Turkey. *Jeobp*. 2008; 11: 476 – 84.

9. Mozaffarian V. Notes on the tribe Anthemideae (Compositae), new species, new records and new combinations for Iran. *Nordic Journal of Botany* 2005; 11: 115 – 27.

10. Firozy M, Talebpour Z and Sonboli A. Essential oil composition and antioxidant activities of the various extracts of Tanacetum sonbolii Mozaff. (Asteraceae) from Iran. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* 2011; 26: 2204 - 7.

11. Richter J and Schellenberg I. Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 2007; 387: 2207 – 17.

12. Hashemi P, Abolghasemi MM, Ghiasvand AR, Ahmadi S, Hassanvand H and Yarahmadi A. A Comparative Study of Hydrodistillation and Hydrodistillation–Solvent Microextraction Methods for Identification of Volatile Components of Echinophora cinerea. *Chromatographia* 2009; 69: 179 - 182 A.

13. Zarena AS Sankar KU. Supercritical carbon dioxide extraction of xanthones with antioxidant activity from *Garcinia mangostana*: Characterization by HPLC/LC–ESI-MS. *Journal of Supercritical Fluids* 2009; 49: 330 – 33.

14. Chen Y, Guo Z, Wang X and Qiu C. Sample preparation, *Journal of Chromatography A* 2008; 1184: 191 – 219.

15. Duan C, Shen Z, Wu D and Guan Y. Recent developments in solid-phase microextraction for on-site sampling and sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry* 2011; 30: 1568 - 74.

16. Ouyang G, Vuckovic D and Pawliszyn J. Nondestructive Sampling of Living Systems Using in Vivo Solid-Phase Microextraction. *Chemical Review* 2011; 111: 2784 – 814.

17. Zhu F, Xu J, Ke Y, Huang S, Zeng F, Luan T and Ouyang G. Applications of in vivo and in vitro solid-phase microextraction techniques in plant analysis: A review. *Analytica Chimica Acta*, http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.05.016.

18. Martendal E, de Souza Silveira CD, Nardini GS and Carasek E. Use of different sample temperatures in a single extraction procedure for the screening of the aroma profile of plant matrices by headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218: 3731 – 6.

19. Peng L, Sheu M, Lin L, Wu C, Chiang H, Lin

W, Lee M and Chen H. Effect of heat treatments on the essential oils of kumquat (Fortunella margarita Swingle). *Food Chemistry* 2013; 136: 532 - 7.

20. Baltussen E, Sandra P, David F and Cramers C. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations* 1999; 11: 737 - 47.

21. Marce RM, Bratkowska D, Cormack PAG, Borrull F and Fontanals N. Development and application of a polar coating for stir bar sorptive extraction of emerging pollutants from environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* 2011; 706: 135 – 42.

22. Ochiai N, Ieda T, Sasamoto K, Takazawa Y, Hashimoto S, Fushimi A and Tanabe K. Stir bar sorptive extraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry for ultra-trace analysis of organochlorine pesticides in river water. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218: 6851 - 60.

23. Kole LP, Millership J and McElnay JC. Determination of diclofenac from paediatric urine samples by stir bar sorptive extraction (SBSE)–HPLC–UV technique. *Talanta,* 2011; 85: 1948 - 58.

24. Vas G, Huang JT, Alquier L, Kaisa JP, Reed G and Gilmor T. Method development and validation for the determination of 2,4,6-tribromoanisole, 2,4,6-tribromophenol, 2,4,6-trichloroanisole, and 2,4,6-trichlorophenol in various drug products using stir bar sorptive extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* 2011; 1262: 196 - 204.

25. Ridgway K, Lalljie SPD and Smith RM. An alternative method for analysis of food taints using stir bar sorptive extraction. *Analytica Chimica Acta* 2010; 677: 29 – 36.

26. Hernandez-Cordoba M, Cacho JI, Campillo N and Vinas P. Determination of alkylphenols and phthalate esters in vegetables and migration studies from their packages by means of stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2012; 1241: 21 –7.

27. Prieto A, Basauri O, Rodil R, Usobiaga A, Fernández LA, Etxebarria N and Zuloaga O. Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217: 2642 – 66.

28. Bicchi C, Cordero C, Liberto E, Sgorbini B and Rubiolo P. Headspace Sampling in Flavor and Fragrance Field. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation* 2012; 4: 1 - 25.

29. Bicchi C, Cordero C, Iori C, Rubiolo P and Sandra P. Headspace Sorptive Extraction (HSSE) in the Headspace Analysis of Aromatic and Medicinal Plants. *Journal of High Resolution Chromatography* 2000; 23: 539 - 46.

30. Bicchi C, Cordero C, Liberto E, Rubiolo P, Sgorbini B and Sandra P. Impact of phase ratio, polydimethylsiloxane volume and size, and sampling temperature and time on headspace sorptive extraction recovery of some volatile compounds in the essential oil field. *Journal of Chromatography A* 2005; 1071: 111 - 8.

31. Kreck M, Scharrer A, Bilke S and MosandlL A. Enantioselective analysis of monoterpene compounds in essential oils by stir bar sorptive extraction (SBSE)-enantio-MDGC–MS. *Flavour Fragrance Journal* 2003; 17: 32 – 40.

32. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography quadropole mass spectroscopy. Carol Stream. Allured Publishing Corporation, 2007.

33. Grob RL and Barry BF. Modern practice of gas chromatography, Fourth Eds. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2004, pp: 87 - 9.