

## تعیین شرایط بهینه در ریز استخراج مایع - مایع پخشی ترکیبات موجود در عرق گیاهان رزماری و میخک به روش کمومتریکس و شناسایی آنها به روش GC/MS

فرشته نعمت اللهی<sup>a\*</sup>، کامبیز لاریجانی<sup>b</sup>، سیروان محمدی آذر<sup>c</sup>

<sup>a</sup> استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، گروه شیمی، تهران، ایران  
<sup>b</sup> استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه شیمی، تهران، ایران  
<sup>c</sup> استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنج، گروه شیمی، سنج، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۹/۶

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۴/۱۸

### چکیده

**مقدمه:** تغییر زندگی انسانها به سمت زندگی صنعتی و ماشینی باعث بروز بیماریها و مشکلات جدیدی شده و تمایل مردم برای استفاده از داروها و عرقیات گیاهی، بیشتر شده است. از آنجاییکه گیاهان دارویی در طب سنتی کشور ما، جایگاه ویژه ای دارد، تولید عرقیات گیاهی با کیفیت بالا، قیمت پایین و درصد خلوص مناسب، از جمله دغدغه های تولیدات صنعتی می باشد. روشهای آماری به ما کمک میکند تا بتوانیم بهترین شرایط را جهت تولید و استخراج مواد موثره این گیاهان، انتخاب کنیم.

**مواد و روشها:** عرق دو گیاه رزماری و میخک از بازار تهیه شده و با حلالهای مختلفی مانند اتانل، متانل، تترا کلرید کربن و کلروفرم، استخراج مواد موثر انجام گردید. ترکیبات استخراج شده به دستگاه GC/MS تزریق شده و کروماتوگرام حاصل، بررسی و شناسایی گردید. **یافتهها:** روش های آماری به کار گرفته شده نشان دادند که می توان با حداقل حجم حلال (مخلوطی از ۴۴۲ میکرولیتر اتانل و ۲۰ میکرو لیتر تتراکلرید کربن) استخراج مایع - مایع پخشی را انجام داد، بیش از ۸۸٪ از ترکیبات موجود در عرق گیاه رزماری و تقریباً ۱۰۰٪ از ترکیبات شیمیایی موجود در عرق میخک شناسایی گردید.

**نتیجه گیری:** روش response surface method، شرایط بهینه در عمل میکرو استخراج مایع - مایع پخشی را در این آزمایش، تعیین نموده و نشان داد که در عمل میکرواستخراج می توان با استفاده از حداقل حجم حلال، بهترین استخراج را انجام داد.

**واژه های کلیدی:** عرق رزماری، عرق میخک، میکرو استخراج مایع - مایع پخشی

تعیین شرایط بهینه در ریز استخراج مایع - مایع پخشی ترکیبات موجود در عرق گیاهان

## مقدمه

کردن درد دندان استفاده می‌شود. میخک تقویت کننده مغز می‌باشد و کسانیکه حافظه ضعیف دارند باید از دم کرده میخک استفاده کنند. برای گردش خون و قلب مفید است. استفاده از میخک گرفتگی عضله را از بین می‌برد.

تعیین درجه خلوص عرقیات گیاهی، یکی از مهم ترین عوامل تاثیر گذار بر روی اثر بخشی این ترکیبات در طب سنتی می باشد. هر چه حجم حلال های مصرفی در طی عمل استخراج مواد موثره، کمتر باشد، علاوه بر اینکه سلامتی آزمایشگر کمتر به خطر می افتد، هزینه های مربوط به استخراج کم تر شده، در وقت صرفه جویی شده و قیمت عرقیات گیاهی در بازار تجاری کمتر خواهد شد. دلایل انتخاب عرق این دو گیاه عبارتند از:

الف) گیاه رزماری

آب مقطر حاصل از گلپای این گیاه بعنوان شوینده چشم بکار می‌رود. گیاه رزماری، ضدنفخ، ضد عفونی کننده، سبب افزایش ترشحات شیره گوارشی و صفرا می‌شود. این گیاه در تهیه لوازم آرایشی نیز به کار می رود و روغن آن یکی از اجزای مواد تقویت کننده و شامپوهای مخصوص موی سر می باشد (صمصام، ۱۳۷۱).

از این گیاه برای درمان رماتیسم و میگرن، جلوگیری از ریزش مو و درمان کم مویی مصرف می‌شود ولی مصرف زیاد آن در خانم‌های باردار مضر می‌باشد. همچنین در تهیه ادکلن ها، خوشبو کننده شامپوها، کرم ها و صابون و لوازم آرایشی و بهداشتی مصرف می‌شود. پزشکان طب سنتی، جوشانده رزماری (اکلیل کوهی) را در موارد خستگی ضعف عمومی، سستی بدن و بیماری‌های کبدی تجویز می‌کنند (جایمند، ۱۳۸۰).

ب) گیاه میخک

اوزنول که ماده اصلی میخک می‌باشد التیام بخش و ضد عفونی کننده است و از آن در دندانپزشکی برای آرام

## مواد و روش ها

در این تحقیق روش ریز استخراج مایع - مایع پخشی برای استخراج مواد موجود در عرقیات گیاهان رزماری و میخک مورد استفاده قرار گرفت. مواد موجود پس از استخراج به وسیله کروماتوگرافی گازی توام طیفسنج جرمی جداسازی و شناسایی شدند (Zhou et al., 2008). اثر پارامترهای مختلف از قبیل نوع و حجم فازهای استخراج کننده و پخش کننده و اثر نمک بر روی کارایی استخراج بررسی گردید. از روش response surface کمک گرفته و شرایط بهینه انتخاب گردید (Sereshti et al., 2009).

### - مواد و وسایل لازم

کلیه مواد لازم شامل حلال های استخراج کننده کلروفرم، تتراکلرید کربن، کلروبنزن، تتراکلرو اتیلن و حلال‌های پخش کننده شامل اتانول، متانل، استون و استونیتریل با درجه خلوص تجزیه ای از شرکت merck خریداری شدند. عرقیات گیاهی از شرکت نارون کاشان تهیه گردید. ازدستگاه کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنج جرمی (GC-MS) موجود در آزمایشگاه تخصصی ۲ واحد علوم تحقیقات، جهت تهیه طیف‌های کروماتوگرام، استفاده گردید. مشخصات دستگاه GC/MS در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- مشخصات و شرایط دستگاه GC/MS بکار رفته جهت آنالیز عرقیات گیاهی

مدل HP-6890 شرکت HEWLETT PACKARD آمریکا	دستگاه GC:
HP-5MS (5% phenyl di methyl siloxan)	نوع ستون:
طول ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت فیلم ۰/۳۲ میکرون	ابعاد ستون:
دمای اولیه C ۶۰ (۳ دقیقه)، گرادیان دمایی C/min ۵، دمای نهایی C ۲۲۰	برنامه ریزی دمایی ستون:
Split/split less (نسبت ۱ به ۲۰)	محل تزریق:
C ۲۵۰	دمای محل تزریق:
هلیوم ۹۹/۹۹٪ با شدت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه	گاز حامل:
مدل HP-5973 شرکت HEWLETT PACKARD آمریکا	دستگاه Mass:
۷۰ الکترون ولت	انرژی یونش (EI)
۲۳۰ درجه سانتیگراد	دمای محفظه یونش:
کوادرپل	تجزیه گر جرمی:
۱۵۰ درجه سانتیگراد	دمای تجزیه گر جرمی:

## - روش

مخلوط حلال‌های استخراج کننده و پخش کننده به کمک سرنگ و با سرعت به درون نمونه آبی تزریق می‌شود. اگر این مخلوط را به آرامی به نمونه تزریق شود، محلول ابری تشکیل نمی‌شود و یا با شدت تشکیل می‌شود. از این رو به منظور دستیابی به سطح تماس بالا میان حلال استخراج کننده و آب و در نتیجه کارایی بالا بهتر است عمل تزریق بسیار سریع انجام شود. به همین دلیل استفاده از سرنگی که به کمک آن بتوان تزریق را به سهولت و با سرعت زیاد به درون محلول انجام داد، اهمیت بسیار دارد، هم چنین هر چه سوزن سرنگ قطر کمتری داشته باشد اندازه قطرات حلال استخراج کننده کوچک تر و پخش بطور مناسبی انجام می شود.

## - طراحی آزمایش

طراحی آزمایش به عنوان روش موثر برای طراحی چگونگی و مسیر انجام آزمایش‌ها در نظر گرفته می‌شود. به طوری که بتوان نتایج معتبر و عینی را از داده‌ها در نظر گرفته می‌شود. عبارت طراحی آزمایش معمولاً برای توصیف مراحل زیر بکار می رود:

- ✓ مشخص کردن عواملی که ممکن است بر نتیجه یک آزمایش اثر بگذارد.
- ✓ طراحی آزمایش به گونه‌ای که اثرات عوامل کنترل نشده به کمترین مقدار کاهش یابند.
- ✓ استفاده از تحلیل‌های آماری برای تفکیک اثرات عوامل مختلفی که مداخله می‌کنند.

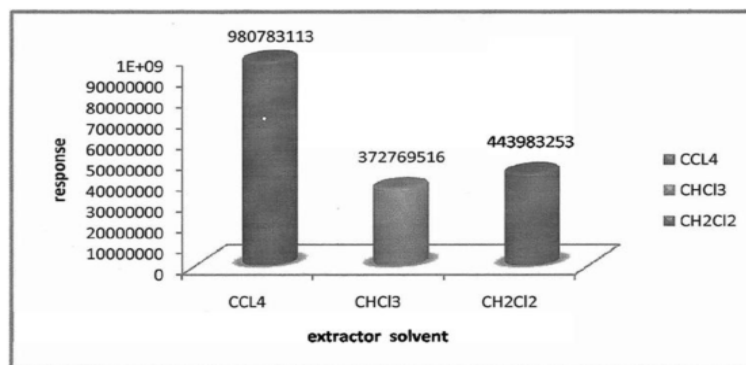
## یافته‌ها

### - بررسی اثر نوع حلال استخراج کننده و نوع حلال پخش کننده

جهت تعیین بهترین حلال استخراج کننده، از حلال‌های مورد نظر به میزان ۰/۵ میلی لیتر به ۵ میلی لیتر از عرق گیاهی مورد نظر اضافه و پس از سانتریفوژ با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه، ۱ میکرولیتر از فاز آلی به دستگاه GC-MS تزریق می‌شود. نتایج این بررسی به صورت راندمان استخراج در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که راندمان استخراج تتراکلرید کربن بیشتر از سایر حلال‌ها می‌باشد و سطح زیر منحنی محلول تترا کلرید کربن بیشتر بوده است (۹۸۶۷۱۵۲۱۶). بنابراین تتراکلرید کربن به عنوان حلال استخراج کننده انتخاب گردید.

حلال پخش کننده باید امتزاج پذیری مناسبی را با هر دوفاز آبی و حلال استخراج کننده داشته باشد. برای این منظور استفاده از حلال‌های متانل، اتانل، استونیتریل، استون مورد بررسی قرار گرفت (Rezaee et al., 2006; Berijani et al., 2006). یک سری آزمایش با استفاده از ۲۰ میکرولیتر تتراکلرید کربن در ۱ میلی لیتر از این حلال‌های پخش کننده انجام شد. پس از اضافه کردن حلال استخراج کننده و پخش کننده و سانتریفوژ ۱ میکرولیتر از فاز آلی به دستگاه GC-MS تزریق شد. نتایج نشان می‌دهد استخراج با اتانل راندمان بیشتری نسبت به سایر حلال‌های پخش کننده دارد، بنابراین اتانل به عنوان حلال پخش کننده انتخاب گردید.

CCL4	980783113
CHCl3	372769516
CH2Cl2	443983253

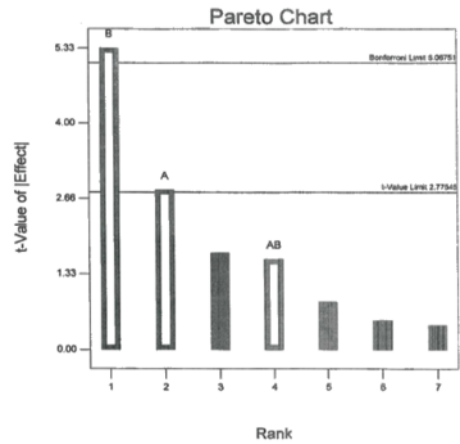


شکل ۱- بررسی اثر حلال‌های استخراج کننده مختلف بر روی راندمان استخراج

تعیین شرایط بهینه در ریز استخراج مایع- مایع پخشی ترکیبات موجود در عرق گیاهان

می‌شود که وجود حلال های اتانل و تتراکلرید کربن راندمان استخراج را بالا برده ولی افزودن نمک بی تاثیر است. ۱۴ آزمایش طی دو روز انجام گردید و نتایج زیر را در بر داشت (جدول ۳).

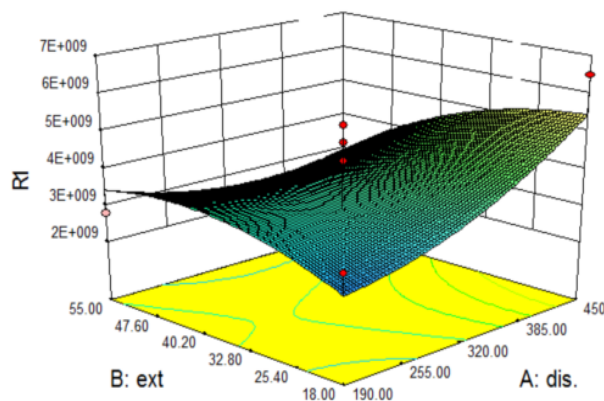
بررسی اثر نمک - طبق نتایج بدست آمده از نرم افزار design expert- 8 و رسم نمودار pareto chart، (شکل ۲) نتیجه



شکل ۲- افزودن نمک ، تاثیری بر راندمان استخراج ندارد

جدول ۳- شرایط ۱۴ آزمایش انجام شده در ۲ روز

شماره آزمایش	روزهای آزمایش	حجم اتانل	حجم تتراکلرید کربن
1	Block 1	320.00	36.50
2	Block 1	320.00	36.50
3	Block 1	450.00	18.00
4	Block 1	190.00	55.00
5	Block 1	450.00	55.00
6	Block 1	190.00	18.00
7	Block 1	320.00	36.50
8	Block 2	320.00	36.50
9	Block 2	503.85	36.50
10	Block 2	136.15	36.50
11	Block 2	320.00	62.66
12	Block 2	320.00	10.34
13	Block 2	320.00	36.50
14	Block 2	320.00	36.50



شکل ۳- نقطه ماکزیمم شکل، شرایط بهینه می‌باشد

پارکها و حاشیه خیابانها و باغچه خانهها بسیار رواج یافته است (جایمند، ۱۳۸۰).

همانطور که مشاهده میشود، بیش از ۸۷٪ از عرق این گیاه شناسایی شد که بیشترین درصد مربوط به  $\alpha$ -pinen می‌باشد.

#### - بررسی و شناسایی عرق گیاه میخک (*Dianthus persicus* Hausskn)

درخت میخک بومی جزایر اندونزی و اقیانوسیه است و به علت زیبایی خاصی که دارد امروزه در بیشتر نقاط دنیا به عنوان درخت زینتی پرورش داده می‌شود (مظفریان، ۱۳۷۷). میخک درختی است کوچک و مخروطی شکل که برگهای آنها هیچ وقت زرد نمی‌شود و در تمام طول سال سبز است. اسانس میخک دارای بوئی قوی و طعمی سوزاننده می‌باشد. این اسانس سفید رنگ بوده که اگر در مجاورت هوا قرار گیرد رنگ آن تیره و غلیظ می‌شود

غنچه‌های درخت میخک پس از باز شدن یعنی قبل از اینکه رنگ خاکستری و ارغوانی آن تبدیل به قرمز شود باید چیده و خشک نمود. میخک که بعنوان ادویه و دارو بکار می‌رود، پودر این غنچه‌ها می‌باشد (صمصام، ۱۳۷۱). عرق گیاه میخک پس از عمل میکرو استخراج به دستگاه GC/MS تزریق و طیف کروماتوگرام حاصل، بررسی و اجزای تشکیل دهنده آن شناسایی گردید و در جدول ۵ آمده است.

شرایط بهینه آزمایش: با توجه به داده‌های حاصل از نتایج آزمایش‌های فوق شرایط بهینه برای استخراج ترکیبات موجود در عرقیات گیاهی مذکور عبارتند از:

- حجم اتانل ۴۴۲ میکرولیتر
- حجم تتراکلرید کربن ۲۰ میکرولیتر
- افزودن نمک ضرورتی ندارد

#### - روش کار در شرایط بهینه

مقدار ۵ میکرولیتر عرق میخک و رزماری را به ۴۴۲ میکرولیتر اتانل و ۲۰ میکرولیتر تتراکلرید کربن اضافه گردید، پس از ۵ دقیقه سانتریفوژ با ۳۵۰۰ دور در دقیقه، فاز آلی به دستگاه GC-MS تزریق گردید. برای هر نوع عرق آزمایش ۵ بار انجام گردید. طیف‌های بدست آمده با استفاده از ضریب بازداری نسبی (ضریب کواتس) شناسایی گردید.

#### - بررسی و شناسایی عرق گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.)

این جنس یک گونه درختچه‌ای همیشه سبز دارد و معمولاً دارای اسانس می‌باشد. عموماً علفی و بندرت دارای نمونه‌های پیچنده یا درختچه می‌باشد. این گیاه، ساقه‌های چهارگوش، معطر با برگ‌های متقارن دارد. وجود خطوط برجسته روی کاسه گل و ظاهر جام گل، کمک موثر در تشخیص این گیاهان می‌کند. به عنوان گیاه دائمی و همیشه سبز نقش مهمی در طراحی فضای سبز بازی می‌کند در سال‌های اخیر کشت رزماری (اکلیل کوهی) در

جدول ۴- ترکیب در صد مواد موجود در عرق گیاه رزماری

نام ترکیب شیمیایی	ضریب کواتس	درصد ترکیب
$\alpha$ -pinene	939	16.7
camphene	954	6.6
verbenene	968	0.9
3-octanone	984	4.6
myrcene	991	3.8
p-cymenen	1221	1.4
limonene	1029	4.8
1,8-cineol	1031	8.5
$\gamma$ -terpinene	1060	0.8
$\alpha$ -terpinolene	1089	0.9
linalool	1097	2.5
chrysanthenone	1128	1.4
camphor	1146	9.1
Trans- pinocamphone	1160	1.4
borneole	1169	7.6

تعیین شرایط بهینه در ریز استخراج مایع- مایع پخشی ترکیبات موجود در عرق گیاهان

جدول ۵- طیف کروماتوگرام، بررسی و اجزای تشکیل دهنده حاصل عرق گیاه میخک

نام ترکیب	ضریب کواتس	درصد ترکیب
methyl salicilate	1192	0.6
eugenol	1359	56.4
$\alpha$ -copaene	1377	0.9
E- $\beta$ -caryophyllene	1419	28.7
$\alpha$ -hummulene	1455	5.4
$\alpha$ -amorphene	1485	0.3
E-E- $\alpha$ -farenzene	1506	0.5
eugenyl acetate	1523	6.4
$\delta$ -cadinene	1523	0.5
caryophyllene oxide	1583	0.3

بهترین استخراج را انجام داد.

### منابع

جایمند، ک. (۱۳۸۰). تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، مرکز تحقیقات جنگل ها و مراتع.  
صمصام شریعت، س. (۱۳۷۱). عصاره گیری و استخراج مواد موثره گیاهان دارویی و روش های شناسایی و ارزشیابی آنها، انتشارات مانی.  
مظفریان، و. (۱۳۷۷). فرهنگ نامهای گیاهان ایران - انتشارات فرهنگ معاصر.

Berijani, S., Assadi, Y., Anbia, M., Milani Hosseini, M. R. & Aghaee, E. (2006) Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection: Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water, J. Chromatogr A 1123, p.1-9.

Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M. R., Aghaee, E., Ahmadian, F. & Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, J. Chromatogr A 1161, p. 1-9.

Sereshti, H. (2009). Application of response surface method for optimization of DLLME of roseascena mill essential oil. J. Chromatogr A 1216, 198-204.

Zhou, Q., Bai, H., Xie, G. & Xiao, J. (2008). Temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction, J. Chromatogr A 1177, p. 43-40.

www.tebyan.net

همانطور که مشاهده می شود تقریباً ۱۰۰٪ اجزای تشکیل دهنده عرق این گیاه شناسایی شده است و بیشترین مقدار متعلق به Eugenol (56.4%) می باشد.

### بحث

استفاده از اسانس و عرقیات گیاهی، از زمان های قدیم در طب سنتی ما رواج داشته و بررسی عرقیات مختلف و تعیین مواد موثره آنها اهمیت دارد.

روش میکرواستخراج، روش مناسبی جهت استخراج مواد موثره موجود در عرقیات گیاهی می باشد. مواد موثره عرقیات گیاهی دارای غلظت اندک بوده و استفاده از حداقل، خطای استخراج را کاهش می دهد و در وقت و مصرف مواد شیمیایی، صرفه جویی شده و سلامتی آزمایشگر کمتر در معرض خطر خواهد بود.

استفاده از روش های کموتری در تعیین شرایط بهینه، از انجام آزمایشات تکراری جلوگیری می نماید.

در پی این مزیت ها، علاوه بر تولید عرقیات گیاهی با درجه خلوص بالاتر، قیمت محصول نیز کاهش خواهد یافت که به نفع مصرف کننده خواهد بود.

### نتیجه گیری

روش response surface method، شرایط بهینه در عمل میکرو استخراج مایع - مایع پخشی را در این آزمایش، تعیین نموده و نشان داد که در عمل میکرو استخراج می توان با استفاده از حداقل حجم حلال،