

بررسی شرایط بهینه در میکرو استخراج مایع - مایع ترکیبات موجود در عرق گیاه *Menthe piperita*، به روش تاگوچی

فرشته نعمت الهی^a، شهلا مظفری^b، سام صارمی^c

^aاستادیار گروه شیمی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^bاستادیار گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

^cدانشجوی کارشناسی ارشد گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۹۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۹/۱۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۶/۳

چکیده

مقدمه: روش های میکرو استخراج به ایی اطلاق می گردد که در آنها حجم فاز استخراجی بسیار کمتر از حجم نمونه باشد و بنابراین به دلیل ظرفیت پایین فاز استخراجی، استخراج به طور کامل صورت نمی گیرد و فقط کسر کوچکی از آنالیت به داخل فاز استخراج کننده منتقل می شود و در مواردی، پس از استخراج، غلظت گونه در محلول نمونه با غلظت اولیه اش برابری می کند. پس در واقع استخراج از نوع تعادلی می باشد.

مواد و روش ها: عرق گیاه نعناع از بازار تهیه شده و به وسیله اتانل بعنوان حلال پخش کننده و کلروفرم بعنوان حلال استخراج کننده، مواد موثره آن استخراج گردید. ترکیبات استخراج شده به دستگاه GC-MS تزریق شده و کروماتوگرام حاصل بررسی گردید. طراحی آزمایشات برای استخراج بهینه مواد موثره به روش تاگوچی انجام شد

یافته ها: استفاده از روش تاگوچی نشان داد که با استفاده از ۵۰۰ میکرولیتر اتانل و ۶۰ میکرولیتر کلروفرم می توان بهترین میکرواستخراج را انجام داد. بیش از ۹۳٪ از ترکیبات شیمیایی عرق نعناع شناسایی گردید. استفاده از روش های آماری مانند تاگوچی در طراحی آزمایشات کمک فراوانی می نماید.

نتیجه گیری: با استفاده از طراحی آزمایش می توان در وقت، مواد مصرفی و تعداد آزمایشات صرفه جویی نمود و بهترین جواب با کمترین تعداد آزمایش نتیجه می شود. بیش از ۹۳٪ ترکیبات شیمیایی عرق نعناع با کمترین حجم حلال مصرفی شناسایی گردید.

واژه های کلیدی: روش تاگوچی، طراحی آزمایش، عرق نعنا، کروماتوگرافی گازی، میکرواستخراج

مقدمه

این روش شاخه ای از استخراج مایع- مایع است که برای کاهش مصرف حلال آلی طراحی شده است و سه جزء حلال آلی استخراج کننده، محلول آبی و حلال آلی پخش کننده به گونه ای با یکدیگر مخلوط می شوند که حلال آلی استخراج کننده بصورت قطرات بسیار ریزی در بین لایه های حلال آلی پخش می گردد.

این روش به طور گسترده در زمینه های دارویی، غذایی و آلاینده های محیط زیست استفاده می شوند و جزء روش های حساس و با صحت بالا می باشند. در این روش ها از یک سرنگ میکرو لیتری برای نگه داشتن حلال آلی استفاده می شود. حلال آلی به صورت قطره میکرو لیتری در نوک میکرو سرنگ آویزان می گردد و استخراج آنالیت به درون قطره انجام می شود.

اندازه این قطرات به حدی کوچک است که جرم آنها توانائی غلبه بر نیروهای بین مولکولی آب را نداشته و نمی تواند بدون حضور یک نیروی خارجی به یکدیگر متصل شده و ته نشین گردند. البته نیروهای جاذبه کوچک ناشی از برهم کنش های مولکولی حلال آب با مولکول های استخراج کننده نیز در پایداری این سیستم تاثیرگذار است.

در اثر پخش حلال آلی استخراج کننده درون آب، سطح تماس مولکول های آب و حلال آلی به میزان بسیار زیادی در مقایسه با استخراج مایع- مایع معمولی افزایش می یابد. این امر باعث می شود که زمان لازم برای تعادل رسیدن گونه استخراج شونده بین آب و حلال آلی کاهش یابد و به حد ثانیه برسد.

درجه خلوص عرقیات و داروهای گیاهی بر روی اثربخشی این ترکیبات تاثیر به سزایی دارد و هرچه استفاده از مواد و حلال های شیمیایی در استخراج این ترکیبات کمتر باشد درجه خلوص آن بیشتر، هزینه مصرفی کمتر و زمان لازم جهت انجام آزمایشات به حداقل خواهد رسید.

کلیه فرآیندها دارای ورودی، خروجی، تعدادی عوامل قابل کنترل و غیر قابل کنترل می باشند. بنابراین اگر میزان و شیوه اثرگذاری هر عامل در جریان تبدیل ورودی به خروجی مشخص باشد، می توان فرآیند را کنترل کرد. به عبارتی طراحی آزمایش ها (Design of Experiment) مجموعه ای از آزمایش هاست که در آن ها با ایجاد تغییرات هدفمند در متغیرهای ورودی یک فرآیند، تغییرات ایجاد

شده بر روی متغیر خروجی یا پاسخ ارزیابی می گیرد. روش های آماری در شیمی تجزیه از جمله روش تاگوچی به محققان کمک میکند تا یک روش بهینه طراحی کرده و از انجام آزمایشات تکراری جلوگیری می شود (Ranjit, 2000).

عرق گیاه نعناع تقویت کننده معده و بدن است. ضد تشنج و ضد سرفه است. نعناع، مسکن و آرام بخش است. برای بی خوابی، کم خوابی و ناراحتی های شبانه یک داروی موثر است. نعناع برای درمان سرماخوردگی و آنفلوآنزا مفید می باشد، ناراحتی های عصبی را برطرف می کند و برای تسکین درد دندان، بسیار مفید است. آشامیدن دم کرده نعناع و یا عصاره آن خونریزی سینه را قطع می کند.

مواد و روش ها

در این تحقیق از روش ریز استخراج مایع - مایع پخشی برای استخراج مواد موجود در عرق گیاه نعناع مورد استفاده قرار گرفت. مواد موجود پس از استخراج به وسیله کروماتوگرافی گازی توام طیف سنج جرمی جداسازی و شناسایی شدند. اثر پارامترهای مختلف از قبیل حجم فازهای استخراج کننده و پخش کننده بر روی کارایی استخراج بررسی شد (شریعت، ۱۳۷۱).

از روش تاگوچی برای تعیین شرایط بهینه آزمایش استفاده گردید. پاسخ، متغیر خروجی فرآیند و به عبارتی مشخصه ای است که در پایان انجام آزمایش ها اندازه گیری می شود و شرایط بهینه بر اساس نزدیک بودن به اهداف پاسخ مشخص می شوند. پاسخ هایی از نوع بزرگ تر- بهتر مواقعی استفاده می شود که در پایان آزمایش ها حد بالای پاسخ اندازه گیری شده در نظر باشد: مانند درصد خلوص محصول، میزان تولید، میزان پیشرفت واکنش، راندمان فرآیند و

در این تحقیق از نرم افزار mini tab -16 جهت کارهای آماری استفاده گردید (Ranjit, 2000). کلیه مواد لازم از جمله حلال های کلروفرم و اتانول، با درجه خلوص تجزیه ای از شرکت Merck خریداری شدند. عرق گیاه نعناع از شرکت گل قطره تهیه گردید. ازدستگاه GC-MS جهت تهیه طیف های کروماتوگرام، استفاده شد. مشخصات دستگاه GC/MS در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- مشخصات و شرایط دستگاه GC/MS بکار رفته جهت آنالیز عرق نعناع

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 ۶۰ °C (۳ دقیقه)، گرادیان دمایی ۵C°/min، دمای نهایی ۲۲۰ °C	برنامه ریزی دمایی ستون:
Split/split less (نسبت ۱ به ۲۰)	محل تزریق:
۲۵۰ °C	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 سانتی گراد	دمای محفظه یونش:
کوادروپل	تجزیه گر جرمی:
۱۵۰ درجه سانتی گراد	دمای تجزیه گر جرمی:

روش کار

بدست آورد.

بررسی اثر حجم حلال های استخراج کننده و پخش کننده:
محلول کلروفرم بعنوان حلال استخراج کننده و با حجم های ۲۰-۶۰ میکرولیتر و محلول اتانول بعنوان حلال پخش کننده و با حجم های ۲۰۰-۵۰۰ میکرولیتر انتخاب شدند. غلظت نمک افزوده شده به نمونه، ۰-۱/۱ مولار انتخاب شد.

در روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی ابتدا محلول همگنی از حلال آلی استخراج کننده و حلال آلی پخش کننده به نسبت معینی تهیه می گردد و مقدار مشخصی از این محلول توسط یک سرنگ سریعاً به درون محلول آبی حاوی آنالیت تزریق می شود. در اثر این عمل، محلول کدر (ابری) می شود که این حالت به دلیل پخش ذرات ریز حلال آلی استخراج کننده در درون محلول آبی می باشد. این مخلوط تا حد زیادی پایدار بوده و می تواند ساعتها به همین حالت باقی بماند. سپس مخلوط سانتریفوژ می شود و ذرات بسیار ریز حلال آلی استخراج کننده که دارای دانسیته بالاتری نسبت به آب می باشند ته نشین می گردند. مخلوطی از حلال اتانول و کلروفرم به کمک سرنگ و با سرعت به درون نمونه آبی تزریق گردید. 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 (Lambropoulon et al., 2004). به همین دلیل استفاده از سرنگی که به کمک آن بتوان تزریق را 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 کوچکتر و پخش بطور مناسبی انجام می شود (Rezaee et al., 2006).
طراحی آزمایش به عنوان روش موثر برای طراحی چگونگی و مسیر انجام آزمایشها در نظر گرفته می شود. به طوری که بتوان نتایج معتبری را در مدت زمان کمتر

جدول ۲- آزمایشات طراحی شده به روش تاگوچی

شماره آزمایش	حجم کلروفرم (μL)	حجم اتانول (μL)	غلظت نمک M	سطح زیر منحنی کروماتوگرام
۱	۱	۱	۱	۲/۴۲
۲	۱	۲	۲	۲/۸۲
۳	۲	۱	۲	۴/۳۲
۴	۲	۲	۱	۶/۳۰

تعداد فاکتورها در این تحقیق ۳ (حلال استخراج کننده - حلال پخش کننده - غلظت نمک) و تعداد سطوح برای هر فاکتور ۲ می باشد. به همین علت آرایه ارتوگونال L4 انتخاب شده و تعداد ۴ آزمایش با شرایط مشخص شده توسط روش تاگوچی، انجام شد.

یافته ها

در طراحی آزمایش دو هدف باید در نظر گرفته شود.

بررسی شرایط بهینه در میکرو استخراج مایع - مایع ترکیبات عرق نعناع

اتانل و ۶۰ میکرولیتر کلروفورم اضافه گردید، پس از ۵ دقیقه سانتریفوژ با ۳۵۰۰ دور در دقیقه، فاز آلی به دستگاه GC-MS تزریق گردید. آزمایش ۵ بار تکرار شد. طیف‌های بدست آمده با استفاده از ضرب بازداری نسبی (ضریب کوئاس) شناسایی گردید.

اول تعداد آزمایش‌های انجام شده و دوم شرایطی که باید برای هر آزمایش مشخص باشد. تعداد ۴ آزمایش انجام شد و پاسخ آشکارساز برای هر آزمایش تعیین شد. از جدول ۲ نتیجه گرفته میشود که پاسخ آزمایش چهارم بهترین جواب است.

* شرایط بهینه این آزمایش عبارت است از:

✓ حجم کلروفورم: ۶۰ میکرولیتر

✓ حجم اتانول: ۵۰۰ میکرولیتر

✓ غلظت نمک: ۰ مولار (افزودن نمک تاثیری بر

کارایی استخراج ندارد)

روش کار در شرایط بهینه تعیین شده:

مقدار ۷ میکرو لیتر عرق نعناع را به ۵۰۰ میکرولیتر

- بررسی و شناسایی عرق گیاه نعناع

شناسایی ترکیبات موجود در عرق گیاه با کمک مقایسه طیف‌های جرمی حاصل از دستگاه GC/MS با منابع استاندارد و همچنین کتابخانه نرم‌افزاری WILEY 275 صورت گرفت. برای تایید شناسایی از شاخص بازداری کوئاس استفاده شد (Adams, 2004).

جدول ۳- ترکیب درصد مواد موجود در عرق گیاه نعناع

نوع ترکیب	شاخص بازداری کوئاس	% ترکیبات در عرق نعناع
α -pinene	939	1.7
α -terpinene	1017	0.4
p-cymene	1025	0.3
Limonene	1029	5.7
1,8-cineole	1031	6.8
benzene acetaldehyde	1042	0.3
γ -terpiene	1060	0.7
cis-sabinene hydrate	1070	2.9
α -terpinolene	1098	0.2
Isomenthone	1163	11.9
neo menthol	1166	8.1
Menthol	1172	18.6
iso menthol	1183	1.3
neo dehydrocarveol	1194	4.4
trans-dihydrocarvone	1201	2.3
Pulegone	1237	2.7
Carvone	1243	8.3
Piperitone	1253	1.3
neo menthyl acetate	1274	0.4
Thymol	1290	0.4
neoiso carvomethyl acetate	1350	5.1
β -bourbonene	1388	1.0
\bar{E} - β -caryophyllene	1419	3.3
Z- β -farnesene	1433	0.3
germacrene D	1485	3.5
Bicyclogermacrene	1500	0.6
Spathoulenol	1578	0.2
Viridilol	1593	1.4

بحث

روند تکاملی نوین در شیمی تجزیه به سمت ساده سازی و مینیاتوری شدن آماده سازی نمونه و همچنین کاهش مصرف حلال آلی است. بنابراین، چندین روش میکرو استخراج نوین برای کاهش مراحل آنالیز، افزایش ورودی نمونه و بهبود کیفیت و حساسیت روش‌های تجزیه‌ای معرفی شده است.

امکان استخراج هر نمونه آگریزی با این روش وجود دارد. در مواردیکه قطبیت گونه‌ها و حلالیت آنها در آب کم باشد، بدون نیاز به مراحل اضافه می‌توان عمل استخراج را انجام داد. توانایی این روش جهت استخراج هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای، آفت کش‌های ارگانوفسفره و کلرو بنزن‌ها به اثبات رسیده است. در مواردیکه حلالیت گونه‌ها در آب نسبتا بالا باشد، مثل کاتیون‌های محلول در آب، می‌توان با استفاده از لیگاندهای آلی و تشکیل کمپلکس، آنها را به گونه‌های آگریز تبدیل و سپس عمل استخراج را انجام داد.

در این روش معمولا معرف‌ها در یک مرحله اضافه می‌شوند و در نتیجه آماده‌سازی نمونه بسیار سریع‌تر از روش‌های استخراج معمولی است. بسیاری از مراحل آماده سازی نمونه حذف شده و در نتیجه آلودگی نمونه کاهش چشمگیری یافته است. از طرف دیگر در این روش میزان حساسیت افزایش و حد تشخیص کاهش یافته است تاگچی با استفاده از آرایه‌های متعامد تعداد آزمایش‌ها را بسیار کاهش داده است این آرایه‌ها با ویژگی‌های خاصی از بین تعداد کل آزمایش‌ها در روش فاکتوریل کامل انتخاب می‌شوند (مومنی، ۱۳۸۷)

نتیجه‌گیری

مطالعات و آزمایشات انجام شده نشان داد که مخلوط اتانل و کلروفرم با حجم‌های ذکر شده مناسب‌ترین مخلوط

برای ریز استخراج ترکیبات موجود در عرقیات می‌باشد و از این روش می‌توان برای استخراج ترکیبات با غلظت ناچیز استفاده نمود و سپس با روش‌های دستگاهی آنها را شناسایی کرد (Zhou *et al.*, 2008).

با استفاده از بکارگیری شرایط بهینه و با استفاده از روش میکرواستخراج عمل استخراج انجام شده و پس از تزریق به دستگاه GC/MS و شناسایی، در مجموع ۲۸ ترکیب شناسایی گردید که بیشترین در صد آن عبارتند از: منتول ۱۸/۶٪، ایزومنتون ۱۱/۹٪، کاروون ۸/۳٪.

منابع

مومنی، م. (۱۳۸۷). تحلیل آماری با استفاده از SPSS نویسنده: انتشارات کتاب نو.
جایمند، ک. (۱۳۸۰). تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، مرکز تحقیقات جنگل‌ها و مراتع.
صمصام، ش. (۱۳۷۱). عصاره‌گیری و استخراج مواد موثره گیاهان دارویی و روش‌های شناسایی و ارزشیابی آنها، انتشارات مانی.

Adams, R. P. (2004). Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, Allured Publishing Co.

Djozan, D. J. & Assadi, Y. (2004). Chromatographia, 60, 313.

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. Journal of Chromatogr., 1161, 1-9

Ranjit, R. (2000). A primer on the taguchi method.

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