

تأثیر روش استخراج بر ترکیبات فنولی زیست‌فعال موجود

در بافت گره گونه سرو سیمین

- ❖ **علی عبدالخانی***؛ دانشیار گروه مهندسی علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- ❖ **اکرم صداقت**؛ کارشناس ارشد صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- ❖ **فرامرز خدایان چگینی**؛ دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، تهران
- ❖ **محمد هادی قاسمی**؛ کارشناس ارشد شیمی آلی، جهاد دانشگاهی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

در این پژوهش تأثیر استخراج با دو روش سوکسله و غوطه‌وری بر میزان و نوع ترکیبات فنولی زیست‌فعال گره چوب سرو سیمین بررسی شد. ترکیبات چربی‌دوست و آب‌دوست با استفاده از سوکسله و براساس استاندارد T280 pm-99 به ترتیب با استفاده از هگزان و استون استخراج شدند. همچنین در روش غوطه‌وری نیز ابتدا ترکیبات چربی‌دوست با حلال هگزان حذف و سپس ترکیبات شیمیایی آب‌دوست با حلال اتانول-آب (۱:۹ v/v) استخراج شد. به‌منظور حذف قندها از عصاره اتانولی حاصل از روش غوطه‌وری، یک مرحله هیدرولیز قلیایی با محلول ۱ مولار NaOH انجام شد. سپس، برای شناسایی ترکیبات استخراجی، آنالیز GC/MS صورت گرفت. تحقیقات نشان داد استخراج با حلال اتانول-آب (۱:۹ v/v) برای استخراج ترکیبات فنولی زیست‌فعال نسبت به استفاده از حلال استون نتایج مطلوب‌تری دارد. همچنین روش غوطه‌وری برای استخراج ترکیبات فنولی زیست‌فعال مناسب است. دو لیگنان زیست‌فعال ماتایی رزینول (MR) و داینسترول به ترتیب با مقادیر ۱۱٫۲ و ۰٫۴ درصد و یک دی آریل هپتانوئید با نام کورکومین با مقدار ۰٫۹ درصد در عصاره اتانولی حاصل از روش استخراجی غوطه‌وری شناسایی شد. همچنین نتایج نشان داد هیدرولیز قلیایی باعث تخریب ترکیبات فنولی و عدم شناسایی آنها در آنالیز GC/MS می‌شود.

واژگان کلیدی: اتانول، استخراج، استون، ترکیبات فنولی زیست‌فعال، سوکسله، غوطه‌وری، گره چوبی، مواد استخراجی.

مقدمه

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی گره‌های درخت با تنه متفاوت است. گره‌های چوبی الیافی کوتاه‌تر و مواد استخراجی بالاتری نسبت به بافت چوبی تنه دارند. این موضوع موجب بروز مشکل در فرایندهای تولید خمیر کاغذهای شیمیایی [۱] و کاهش کیفیت خمیرهای مکانیکی می‌شود [۲]. به علاوه به دلیل اینکه گره‌های چوبی سخت‌تر از چوب نرم‌اند، تهیه چپس از بافت‌های حاوی گره زیاد مشکل‌تر است و به انرژی بیشتری نیاز دارند [۱]. به همین دلیل باید گره‌ها قبل از فرایند خمیر کاغذسازی از ماده اولیه حذف شوند. مواد استخراجی گره‌ها شامل ترکیبات فنولی است که خواص ضد میکروبی دارد و منبعی غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است که ارزش اقتصادی بالایی دارد و از آن‌ها در صنایع غذایی، داروسازی، و تولید مواد آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود [۳، ۴]. اخیراً تولید فنول‌های زیست‌فعال^۱ از گیاهان مورد توجه قرار گرفته است که با توجه به غیرکاربردی بودن گره‌های چوبی در فرایند خمیر کاغذسازی و همچنین با توجه به وجود ترکیبات استخراجی فنولی در گره‌ها حذف گره‌ها از فرایند کاغذسازی و استخراج فنول‌های زیست‌فعال از گره‌ها و تولید ترکیبات زیست‌فعال^۲ و استفاده از آن‌ها در صنایع دارویی و غذایی و تولیدات آرایشی و بهداشتی ضرورت پیدا می‌کند تا ترکیبات فنولی به خصوص لیگنان‌ها در مقیاس صنعتی از گره‌ها استخراج شوند و زمینه‌ای برای افزایش نقش تجاری جنگل‌ها و تولیدات جنگلی فراهم شود. استخراج^۳ اولین مرحله جداسازی ترکیبات فنولی از مواد است.

این فرایند تحت تأثیر عواملی چون طبیعت شیمیایی ترکیبات، روش استخراجی به کاررفته، و نوع حلال‌ها قرار می‌گیرد. از آنجا که ترکیبات فنولی به دما و نور و سایر شرایط محیطی حساس است، تعیین شرایط بهینه استخراج این ترکیبات می‌تواند به توسعه فرایندهایی که باعث تهیه مواد زیستی با ارزش افزوده بالا می‌شود بینجامد و به تکمیل چرخه ایجاد زیست پالایشگاه با هدف تهیه سبدی از فرآورده‌های مختلف کمک کند. در زمینه تجزیه شیمیایی گونه‌های درختی مطالعات متعددی انجام شده است.

هارون و لابوسکی ترکیبات شیمیایی پنج گونه چوبی کاج سفید، کاج قرمز، گردوی آمریکایی، بلوط قرمز، و افرای قندی را با حلال اتانول-بنزن و روش سوکسله مطالعه کردند که در این تحقیق ترکیبات فنولی شناسایی نشد [۵]. بالابان تحقیقاتی در زمینه اجزای شیمیایی مواد استخراجی چوب و پوست بلوط محلی ترکیه با استفاده از حلال اتانول-بنزن و اتانول به روش سوکسله انجام داد و ترکیبات فنولی در مواد استخراجی به دست آمده از چوب و پوست این گونه مشاهده نشد [۶]. ژانک و همکاران لیگنان‌های موجود در دانه‌های کنجد را با استفاده از حلال اتانول-آب (۷/۷ v/v) و با روش غوطه‌وری استخراج کردند. همچنین به منظور حذف قندهای متصل به لیگنان‌ها (لیگنان‌های گلیکوزید)، پلی‌ساکاریدها، و پروتئین‌ها از عصاره‌های اتانولی یک مرحله هیدرولیز قلیایی با محلول ۱ مولار NaOH را انجام دادند [۷]. حسینی هاشمی ترکیبات شیمیایی موجود در مواد استخراجی چوب درون گردوی شمال ایران را بررسی کرد. استخراج مواد درون این گونه طبق استاندارد T204-OS-76، با استفاده از حلال اتانول-تولون و روش سوکسله، انجام شد و

1. Bioactive phenols
2. Bioactive compound

منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد و پس از آسیاب‌کردن، طبق استاندارد TAPPI شماره T257 CM-85، به صورت آرد چوب با اندازه ذرات ۴۰ و ۶۰ مش برای عصاره‌گیری به کار رفت.

عصاره‌گیری

ابتدا ترکیبات چربی دوست آرد گره چوبی با استفاده از حلال هگزان استخراج شد. سپس ترکیبات آب‌دوست گره چوبی با استفاده از دو روش جداسازی شد. بدین صورت که در یک روش آرد گره چوبی عاری از مواد چربی دوست با استفاده از استون و روش استاندارد T280 pm-99 به وسیله سوکسله به منظور جداسازی ترکیبات آب‌دوست عمل‌آوری شد. ترکیبات آب‌دوست استخراج شده، پس از تبخیر حلال، در شرایط خلأ خشک و در شرایط کنترل شده نگهداری شد. در روش دیگر، آرد گره چوبی پس از حذف ترکیبات چربی دوست با هگزان در حلال اتانول-آب (۱:۹ v/v) غوطه‌ور شد. عملیات خیس‌اندن به مدت ۲۴ ساعت درون یک انکوباتور در دمای محیط و تحت هم‌زدن ملایم انجام گرفت. در ادامه حلال در شرایط خلأ تبخیر و عصاره جدا شد. به منظور حذف ناخالصی‌های فنودی در روش غوطه‌وری، عصاره خام به دست آمده در یک مرحله به مدت ۱۲ ساعت تحت هیدرولیز قلیایی با محلول سود ۱ مولار قرار گرفت.

شناسایی ترکیبات عصاره با کروماتوگرافی

گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC/MS)

عصاره‌های جداسازی شده قبل از تزریق به ستون کروماتوگرافی مشتق‌سازی شد. عملیات سایلبل دارکردن عصاره‌ها با استفاده از واکنشگر

شناسایی ترکیبات با استفاده از آنالیز GC/MS صورت گرفت. در این تحقیق ترکیبات فنولی دی‌مری نیز شناسایی نشد [۸]. عبدالخانی و همکاران ترکیبات شیمیایی غیر قطبی، نیمه‌قطبی، و قطبی موجود در مواد استخراجی چوب گونه کُنار را با استفاده از سه حلال پترولیوم‌اتر، استون، و اتانول و به طریق سوکسله استخراج کردند و شناسایی ترکیبات با استفاده از آنالیز GC/MS انجام شد. در این تحقیق نیز ترکیبات فنولی در عصاره‌های مواد استخراجی این گونه شناسایی نشد [۹].

در همه مطالعات انجام شده مواد استخراجی طبق استاندارد T280 pm-99 و روش سوکسله استخراج شده است. در حالی که ترکیبات فنولی زیست‌فعال مواد شیمیایی بسیار حساسی هستند که در اثر استخراج تحت تأثیر عوامل و شرایط فرایند به سرعت اکسید و غیر فعال می‌شوند. در بیشتر موارد، جداسازی شده تحت تأثیر حرارت تغییر شکل ساختاری می‌دهند. بنابراین در این تحقیق از یک روش بسیار ملایم یعنی غوطه‌وری در دمای محیط و حلال آب‌دوست برای جداسازی ترکیبات فنولی زیست‌فعال گره چوب سرو سیمین^۱ استفاده شد. عصاره فنولی جداسازی شده با این روش با شیوه استاندارد متداول مقایسه و تأثیر روش استخراج بر نوع و میزان ترکیبات جداسازی شده بررسی شد.

مواد و روش‌ها

گونه چوبی

نمونه‌برداری از بافت گره زنده گونه سرو سیمین موجود در جنگل مصنوعی سرو سیمین دانشکده

نتایج و بحث

بازده جداسازی

جدول ۱ بازده استخراج عصاره‌های ترکیبات آب‌دوست مواد استخراجی گره‌های گونه سرو سیمین را نشان می‌دهد.

همان‌طور که در جدول ۱ مشخص است بازده استخراج در روش سوکسله بیشتر از روش غوطه‌وری است. استفاده از شرایط رفلکس و دمای بالا سبب افزایش بازده استخراج در روش سوکسله می‌شود.

شناسایی ترکیبات عصاره‌ها با کروماتوگرافی گازی (GC)

شکل‌های ۱ تا ۳ کروماتوگرام‌های گازی عصاره‌های آب‌دوست مواد استخراجی گره‌های گونه سرو سیمین را، که با حلال‌ها و روش‌های مختلف استخراج شده‌اند، نشان می‌دهند.

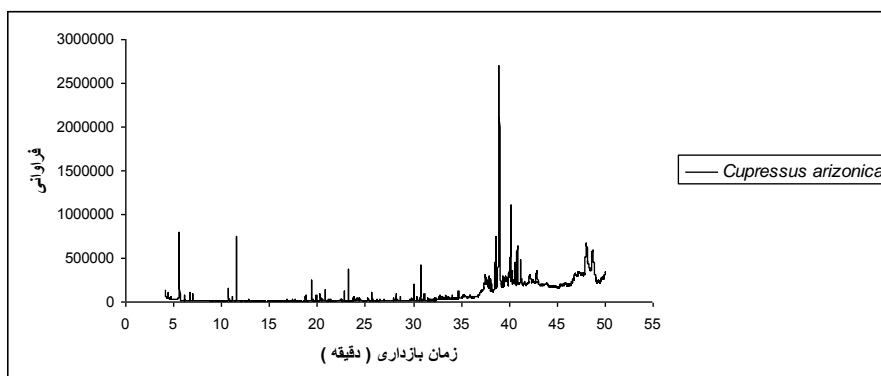
BSTFA همراه پیریدین انجام شد. به این منظور، حدود ۰٫۱ گرم از هر یک از عصاره‌های به‌دست‌آمده با روش‌های مختلف با ۰٫۳ میلی‌لیتر از واکنشگر BSTFA و ۰٫۳ میلی‌لیتر پیریدین مخلوط و به مدت سی دقیقه عمل‌آوری شدند. به دلیل پایداری اندک ترکیبات سایلبل دار شده، عمل سایلبل‌دار کردن ۲۴ ساعت قبل از آنالیز با GC/MS انجام شد. جداسازی و شناسایی اجزای مواد استخراجی نمونه‌های سایلبل‌دار شده به وسیله GC/MS تحت شرایط ذیل انجام شد:

ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰٫۲۵ میلی‌متر، گاز حامل هلیوم، سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه، با برنامه دمایی ۶۰ تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و شیب دمایی ۶ درجه بر دقیقه.

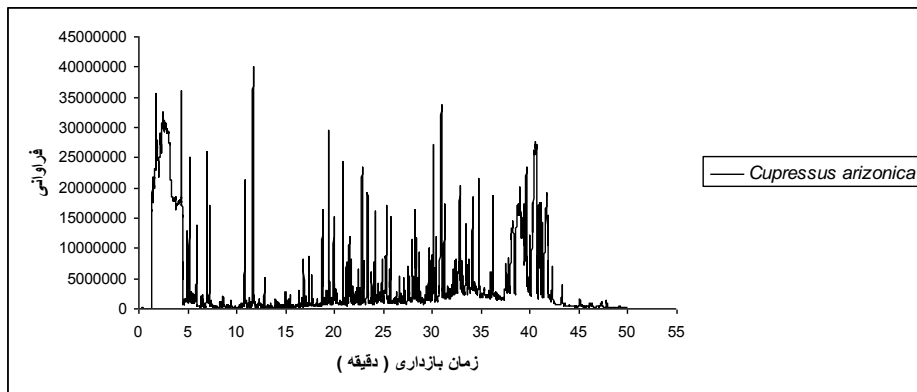
شناسایی طیف‌های جرمی از طریق مقایسه با طیف‌های پایه موجود در بانک اطلاعاتی رایانه دستگاه GC/MS و پایگاه‌های اطلاعاتی Wiely و NIST انجام شد.

جدول ۱. بازده استخراج عصاره‌های ترکیبات آب‌دوست مواد استخراجی گره‌های گونه سرو سیمین

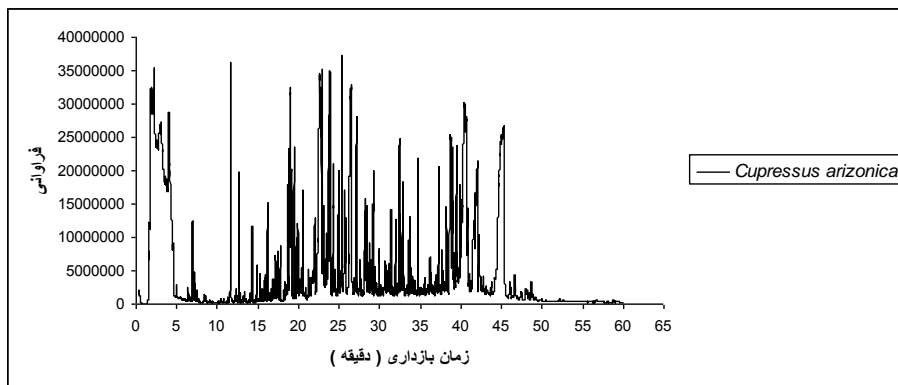
بازده استخراج (%)	نام حلال و روش استخراجی
۷٫۵۸	حلال استون و روش سوکسله
۱٫۰۶	حلال اتانول- آب (۱:۹v/v) و روش غوطه‌وری



شکل ۱. کروماتوگرام گازی (GC) عصاره استخراج شده با حلال استون و روش سوکسله



شکل ۲. کروماتوگرام گازی (GC) عصاره استخراج‌شده با حلال اتانول- آب (۹:۷/۷) و روش غوطه‌وری همراه هیدرولیز قلیایی



شکل ۳. کروماتوگرام گازی (GC) عصاره استخراج‌شده با حلال اتانول: آب (۹:۷/۷) و روش غوطه‌وری

جدول ۲. بازده (%) گروه‌های اصلی ترکیبات شناسایی‌شده در عصاره‌های آب‌دوست مواد استخراجی گره‌های گونه سرو سیمین

نام ترکیب	حلال استون و روش سوکسله	حلال اتانول- آب ۹۰ درصد، روش غوطه‌وری و هیدرولیز قلیایی	حلال اتانول- آب ۹۰ درصد، روش غوطه‌وری
قندها	۶۵/۲	۶/۳	۱۷/۹
اسیدهای رزینی	۱/۱	۲	۰/۲
مونومرهای آروماتیکی	۳/۲	۴/۱	۶/۲
ترکیبات آروماتیکی	۴/۳	۵/۳	۱۲/۴
* مونومرهای فنولی زیست‌فعال			
(a) اسیدهای فنولی			۳/۲۳
(b) سایر مونومرهای فنولی		۵/۷۳	۶
* ترکیبات فنولی زیست‌فعال			
(a) لیگنان‌ها			۱۱/۷
(۱-a) ماتایی رزینول (MR)			۱۱/۳
(۲-a) داینسترویل			۰/۴
(b) دی‌آریل هپتانوئید (کورکومین)			۰/۹

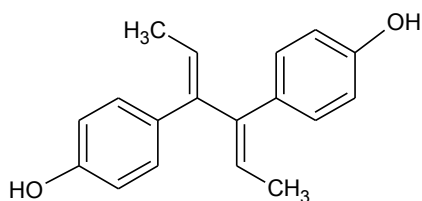
شناسایی آن‌ها در آنالیز GC/MS شد. همچنین نتایج نشان داد استفاده از حلال اتانول-آب (۱:۹ v/v) و روش استخراجی غوطه‌وری روشی مناسب برای استخراج ترکیبات فنولی زیست فعال است. همان‌طور که در جدول ۲ مشخص است، لیگنان‌های زیست‌فعال ماتایی رزینول (MR) و داینسترویل به ترتیب با مقادیر ۱۱/۳ و ۰/۴ درصد در عصاره اتانولی حاصل از روش استخراجی غوطه‌وری شناسایی شدند. همچنین یک ترکیب دی‌آریل هپتانوئیدی با نام کورکومین با مقدار ۰/۹ درصد در این عصاره نیز شناسایی شد.

شکل ۴ تعدادی از ترکیبات فنولی مهم شناسایی شده در عصاره اتانولی گره‌های گونه سرو سیمین را، که با روش غوطه‌وری، استخراج شده‌اند، نشان می‌دهد.

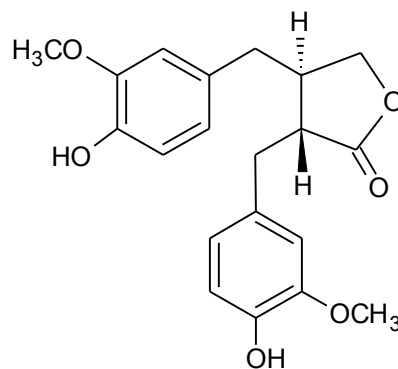
جدول ۳ زمان‌های بازداری ترکیبات فنولی مهم شناسایی شده در کروماتوگرام‌های گازی شکل ۳ را نشان می‌دهد.

جدول ۲ بازده گروه‌های اصلی ترکیبات شناسایی شده در عصاره‌های آب‌دوست مواد استخراجی گره‌های گونه سرو سیمین را، که با حلال‌ها و روش‌های مختلف استخراج شده‌اند، نشان می‌دهد.

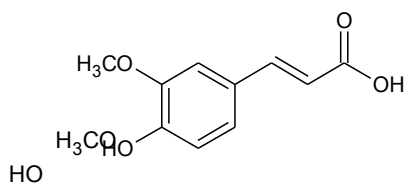
جدول ۲ نشان می‌دهد عمده ترکیبات آب‌دوست موجود در عصاره استخراجی، که با روش سوکسله استخراج شده‌اند، قندها هستند که ۶۵/۲ درصد عصاره را تشکیل می‌دهند. از آنجا که در روش سوکسله ترکیبات استخراج‌شده داخل بالن تحت حرارت مستقیم هیتز قرار می‌گیرند، این عامل موجب تخریب ترکیبات فنولی در این روش نیز می‌شود. همچنین ژانک و همکاران [۷] یک مرحله هیدرولیز قلیایی با محلول ۱ مولار NaOH را به منظور حذف قندهای متصل به لیگنان‌ها (لیگنان‌های گلیکوزید)، پلی‌ساکاریدها، و پروتئین‌ها از عصاره‌های اتانولی انجام دادند. در این تحقیق نه تنها قندها از بین نرفتند، بلکه این مرحله باعث تخریب ترکیبات فنولی و عدم



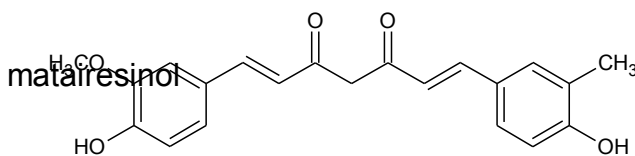
(۲)



(۱)



(۴)

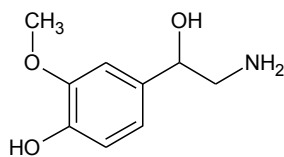


(۳)

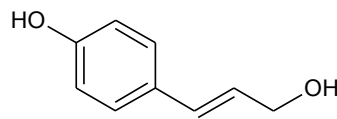


تأثیر روش استخراج بر ترکیبات فنولی زیست‌فعال موجود در بافت گره گونه سرو سیمین

188



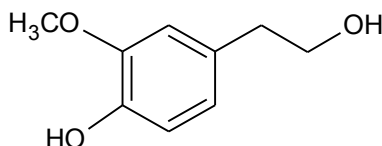
(۶)



(۵)

188

88



(۷)

شکل ۴. تعدادی از ترکیبات فنولی مهم شناسایی شده در عصاره اتانولی گره‌های گونه سرو سیمین؛ استخراج با روش غوطه‌وری

269

جدول ۳. زمان‌های بازدارنده ترکیبات فنولی مهم شناسایی شده در عصاره اتانولی گونه سرو سیمین، استخراج با روش غوطه‌وری

شماره ترکیب در شکل ۴	نام ترکیب	زمان بازدارنده (دقیقه)
۱	ماتایی رزینول	۴۰٫۳۸
۲	داینسترویل	۳۲٫۹۰
۳	کورکومین	۳۷٫۳۰
۴	فرولیک اسید	۳۱٫۰۱
۵	پاراکوماریل الکل	۲۱٫۷۴
۶	نورمتانفرین	۳۳٫۷۴
۷	هومووانیل الکل	۴۳٫۱۴

269

سوکسله معایی نیز دارد. در روش غوطه‌وری مصرف حلال بیشتر و بازده استخراج کمتر است. همچنین مرحله هیدرولیز قلیایی با محلول ۱ مولار NaOH، به منظور حذف قندهای متصل به لیگنان‌ها و پلی ساکاریدها از عصاره‌های اتانولی، باعث تخریب ترکیبات فنولی و عدم شناسایی آن‌ها در آنالیز GC/MS شد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد استخراج با حلال اتانول-آب (۱:۹ v/v) جهت استخراج ترکیبات فنولی زیست‌فعال نتایج مطلوب‌تر نسبت به استفاده از حلال استون دارد. همچنین روش استخراجی غوطه‌وری برای استخراج ترکیبات فنولی زیست‌فعال مناسب است. با این حال این روش نسبت به روش

References

- [1]. Neacus, M., Eklund, P. C., Sjöholm, R. E., Pietarinen, S. P., Ahotupa, M. O., Holmbom, B. R., and Willfor, S. M. (2007). Antioxidant flavonoids from knotwood of *Jack pine* and European aspen. *Holz Roh Werkst*, 65: 1-6.
- [2]. Pietarinen, S. P., Willfor, S. M., Ahotupa, M. O., Hemming, J. E., and Holmbom, B. R. (2006). Knotwood and bark extracts: strong antioxidant from waste materials. *Wood Science*, 52: 436-444.
- [3]. Holmbom, B., Echerman, C., Eklund, P., Hemming, J., Nisula, L., Reunanen, M., Sjöholm, R., Sundberg, A., Sundberg, K., and Willfor, S. (2003). Knots in trees-A new rich source of lignans. *Phytochemistry Reviews*, 2: 331-340.
- [4]. Holmbom, B., Willfor, S., Hemming, J., Pietarinen, S., Nisula, L., Eklund, P., and Sjöholm, R. (2007). Knot in trees: A rich source of bioactive polyphenols. In: *Materials, chemicals and energy from forest biomass*. Eds: Argypoulos, D., Oxford University press. pp. 350-362.
- [5]. Harun, J., and Labosky, P. (1985). Chemical constituents of five northeastern barks. *Wood and Fiber Science*, 17: 174-280.
- [6]. Balaban, M. and Uçar, G. (2005). Extractives and structural components in wood and bark of Endemic Oak *Quercus vulcanica* Boiss. *Holzforschung*, 55: 478-486.
- [7]. Zhang, Z. S., Li, D., Wang, L. J., Ozkan, N., Chen, X. D., Mao, Z. H., and Yang, H. Z. (2007). Optimization of ethanol- water extraction of lignans from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 57: 17-24.
- [8]. Hosseini Hashemi, Kh. (2007). Identification of chemical compounds within north of Iran's walnut heart wood extractives by GC/MS method. *Journal of Agricultural Science*, 4: 940-946.
- [9]. Abdulkhani, A., Mirkhandan, N., Sedaghat, A., and Mirshokrai, S. A. (1392). Chemical characterization of *ziziphus spina Christi* wood extractives using Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy technique. *Iranian Journal of Wood and Paper Industries*, 4(2): 75-84.