جنگل و فرآورده‌های چوب، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴
ص ۱۶۱-۱۶۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۱۷

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

❖ **علی عبدالخانی*؛** دانشیار گروه مهندسی علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
❖ **اکرم صداقت؛** کارشناس‌ارشد صنایع چوب و کاغذ، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
فرامرز خداییان چگینی؛ دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، تهران
محمد هادی قاسمی؛

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 به‌ترتیب 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 عصارهٔ 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 به‌ترتیب با مقادیر ۱۱٫۲ و ۰٫۴ درصد و یک دی آریل هپتانوئید با نام کورکومین با مقدار ۰٫۹ درصد در عصارهٔ 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.

* نویسندهٔ مسئول تلفن/ فاکس: ۰۲۶۳۲۲۴۹۳۱۱
Email: abdolkhani@ut.ac.ir

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]. به‌علاوه به‌دلیل اینکه گره‌های چوبی سخت‌تر از چوب نرمال‌اند، تهیهٔ چیپس 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 مادهٔ 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[1] از گیاهان مورد توجه قرار گرفته است که با توجه به غیرکاربردی‌بودن 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[2] و استفاده از آن‌ها در صنایع دارویی و غذایی و تولیدات آرایشی و بهداشتی ضرورت پیدا می‌کند تا ترکیبات فنولی به‌خصوص لیگنان‌ها در مقیاس صنعتی از گره‌ها استخراج شوند و زمینه‌ای برای افزایش نقش تجاری جنگل‌ها و تولیدات جنگلی فراهم شود. استخراجْ اولین مرحلهٔ جداسازی ترکیبات فنولی از مواد است. این فرایند تحت تأثیر عواملی چون طبیعت شیمیایی ترکیبات، روش استخراجی به‌کاررفته، و نوع حلال‌ها قرار می‌گیرد. از آنجا که ترکیبات فنولی به دما و نور و سایر شرایط محیطی حساس است، تعیین شرایط بهینهٔ استخراج این ترکیبات می‌تواند به توسعهٔ فرایندهایی که باعث تهیهٔ مواد زیستی با ارزش افزودهٔ بالا می‌شود بینجامد و به تکمیل چرخهٔ ایجاد زیست پالایشگاه با هدف تهیهٔ سبدی از فراورده‌های مختلف کمک کند. در زمینهٔ تجزیهٔ شیمیایی گونه‌های درختی مطالعات متعددی انجام شده است.

هارون و لابوسکی ترکیبات شیمیایی پنج گونهٔ 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 زمینهٔ 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 به‌دست‌آمده از چوب و پوست این گونه مشاهده نشد [۶]. ژانک و همکاران لیگنان‌های موجود در دانه‌های کنجد را با استفاده از حلال اتانول- آب (۳:۷ v/v) و با روش غوطه‌وری استخراج کردند. همچنین به‌منظور 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- تولوئن و روش سوکسله، انجام شد و

1. Bioactive phenols
2. Bioactive compound

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 گونهٔ 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 همهٔ مطالعات انجام‌شده مواد استخراجی طبق استاندارد T280 pm-99 و روش سوکسله استخراج شده است. درحالی‌که ترکیبات فنولی زیست‌فعال مواد شیمیایی بسیار حساسی هستند که در اثر استخراج تحت تأثیر عوامل و شرایط فرایند به‌سرعت اکسید و غیر فعال می‌شوند. در بیشتر موارد، مواد جداسازی‌شده 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[1] استفاده شد. عصارهٔ فنولی جداسازی‌شده با این روش با شیوهٔ استاندارد متداول مقایسه و تأثیر روش استخراج بر نوع و میزان ترکیبات جداسازی‌شده بررسی شد.

مواد و روش‌ها

گونهٔ چوبی

نمونه‌برداری از بافت گره زندهٔ گونهٔ سرو سیمین موجود در جنگل مصنوعی سرو سیمین دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد و پس از آسیاب‌کردن، طبق استاندارد TAPPI شمارهٔ T257 CM-85، به صورت آرد چوب با اندازهٔ ذرات ۴۰ و ۶۰ مش برای عصاره‌گیری به‌کار رفت.

عصاره‌گیری

ابتدا ترکیبات چربی‌دوست 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 چربی‌دوست با استفاده از استون و روش استاندارد T280 pm-99 به‌وسیلهٔ سوکسله به‌منظور جداسازی ترکیبات آب‌دوست عمل‌آوری شد. ترکیبات آب‌دوست استخراج‌شده، پس از تبخیر حلال، در شرایط خلأ خشک و در شرایط کنترل‌شده نگهداری شد. در روش دیگر، آرد گره چوبی پس از حذف ترکیبات چربی‌دوست 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. به‌منظور حذف ناخالصی‌های قندی در روش غوطه‌وری، عصارهٔ خام به‌دست‌آمده 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 جداسازی‌شده قبل از تزریق به ستون کروماتوگرافی مشتق‌سازی شد. عملیات سایلیل‌دارکردن عصاره‌ها با استفاده از واکنشگر

1. Cupressus arizonica

BSTFA[1] 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. به‌دلیل پایداری اندک ترکیبات سایلیل‌دارشده، عمل سایلیل‌دارکردن ۲۴ ساعت قبل از آنالیز با GC/MS انجام شد. جداسازی و شناسایی اجزای مواد استخراجی نمونه‌های سایلیل‌دارشده به‌وسیلهٔ 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 برنامهٔ دمایی ۶۰ تا ۳۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد و شیب دمایی ۶ درجه بر دقیقه.

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

نتایج و بحث

بازده جداسازی

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

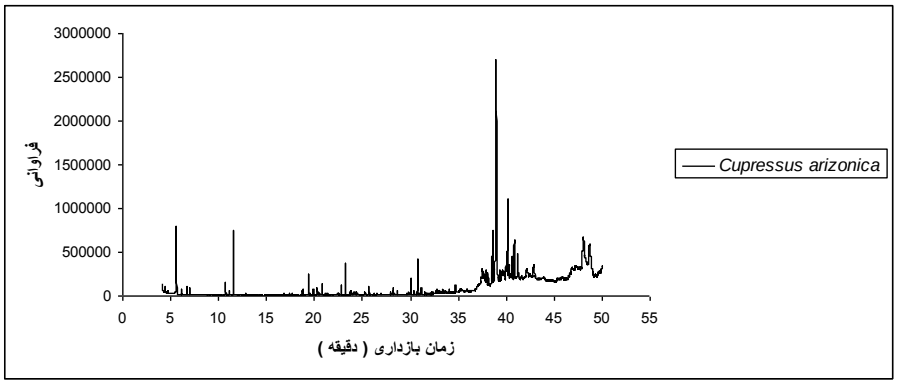
همان‌طورکه در جدول ۱ مشخص است بازده استخراج در روش سوکسله بیشتر از روش غوطه‌وری است. استفاده از شرایط رفلاکس و دمای بالا سبب افزایش بازده استخراج در روش سوکسله می‌شود.

شناسایی ترکیبات عصاره‌ها با کروماتوگرافی گازی (GC)

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

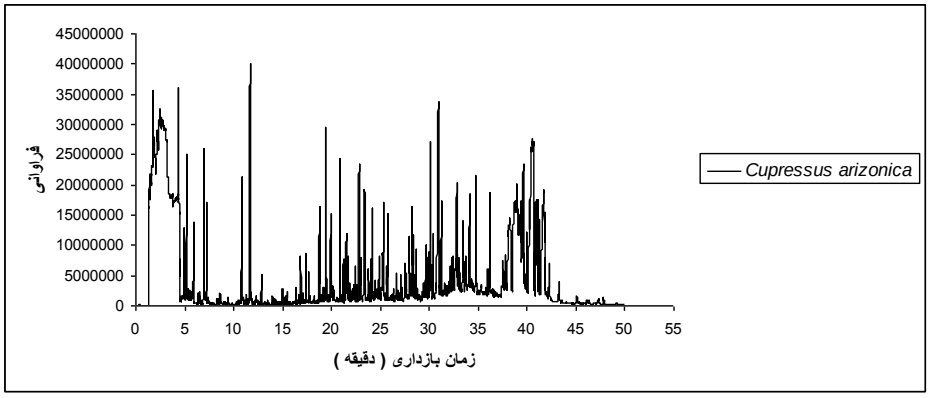
جدول ۱. بازده استخراج عصاره‌های ترکیبات آب‌دوست مواد استخراجی گره‌های گونهٔ سرو سیمین

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

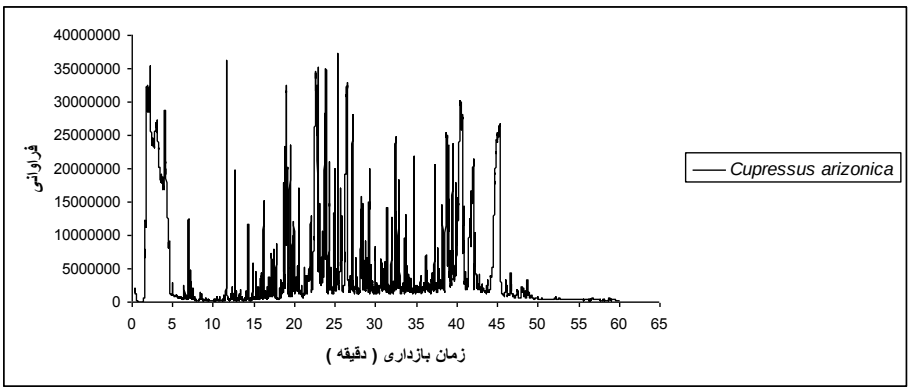


شکل ۱. کروماتوگرام گازی (GC) عصارهٔ استخراج‌شده با حلال استون و روش سوکسله

1. N, O-Bis (trimethylsily) trifluoro acetamide



شکل ۲. کروماتوگرام گازی (GC) عصارهٔ استخراج‌شده با حلال اتانول- آب (۱:۹v/v) و روش غوطه‌وری همراه هیدرولیز قلیایی



شکل ۳. کروماتوگرام گازی (GC) عصارهٔ استخراج‌شده با حلال اتانول: آب (۱:۹v/v) و روش غوطه‌وری

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

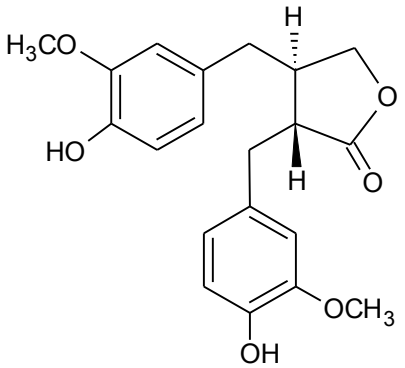
نام ترکیب	حلال استون و روش سوکسله	حلال اتانول- آب ۹۰ درصد، روش غوطه‌وری و هیدرولیز قلیایی	حلال اتانول- آب ۹۰ درصد، روش غوطه‌وری
قندها	۶۵/۲	۶/۳	۱۷/۹
اسیدهای رزینی	۱/۱	۲	۰/۲
مونومرهای آروماتیکی	۳/۲	۴/۱	۶/۲
ترکیبات آروماتیکی	۴/۳	۵/۳	۱۲/۴
❊ مونومرهای فنولی زیست‌فعال			
a) اسیدهای فنولی			۳/۲۳
b) سایر مونومرهای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

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

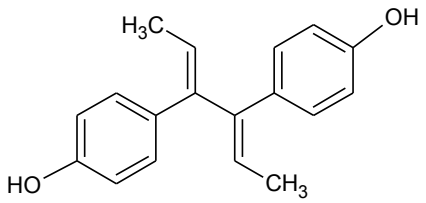
جدول ۲ نشان می‌دهد عمدهٔ ترکیبات آب‌دوست موجود در عصارهٔ استخراجی، که با روش سوکسله استخراج شده‌اند، قندها هستند که ۶۵٫۲ درصد عصاره را تشکیل می‌دهند. از آنجا که در روش سوکسله ترکیبات استخراج‌شدهٔ داخل بالن تحت حرارت مستقیم هیتر قرار می‌گیرند، این عامل موجب تخریب ترکیبات فنولی در این روش نیز می‌شود. همچنین ژانک و همکاران [۷] یک مرحله هیدرولیز قلیایی با محلول ۱ مولار NaOH را به منظور حذف قندهای متصل به لیگنان‌ها (لگینان‌های گلیکوزید)، پلی‌ساکاریدها، و پروتئین‌ها از عصاره‌های اتانولی انجام دادند. در این تحقیق نه‌تنها قندها از بین نرفتند، بلکه این مرحله باعث تخریب ترکیبات فنولی و عدم شناسایی آن‌ها در آنالیز GC/MS شد. همچنین نتایج نشان داد استفاده از حلال اتانول- آب (v/v ۱:۹) 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 داینسترول به‌ترتیب با مقادیر ۱۱٫۳ و ۰٫۴ درصد در عصارهٔ 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 شناسایی‌شده در عصارهٔ اتانولی گره‌های گونهٔ سرو سیمین را، که با روش غوطه‌وری، استخراج شده‌اند، نشان می‌دهد.

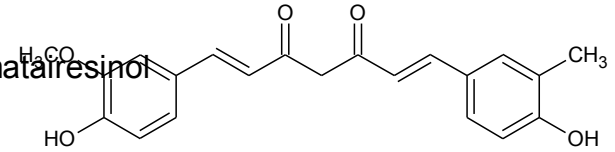
جدول ۳ زمان‌های بازداری ترکیبات فنولی مهم شناسایی‌شده در کروماتوگرام‌های گازی شکل ۳ را نشان می‌دهد.



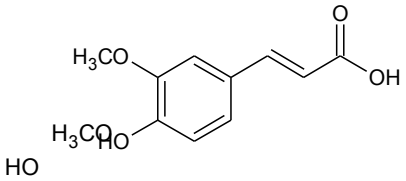
(۱)



(۲)

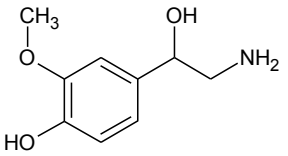


(۳)

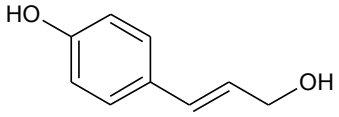


(۴)

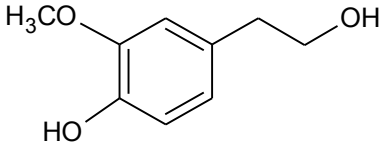
88
180
matairesinol
164



(۶)



(۵)



(۷)

شکل ۴. تعدادی از ترکیبات فنولی مهم شناسایی‌شده در عصارهٔ اتانولی گره‌های گونهٔ سرو سیمین؛ استخراج با روش غوطه‌وری

جدول ۳. زمان‌های بازداری ترکیبات فنولی مهم شناسایی‌شده در عصارهٔ اتانولی گونهٔ سرو سیمین، استخراج با روش غوطه‌وری

شمارهٔ ترکیب در شکل ۴	نام ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)
لیگنان‌ها		
۱	ماتایی‌رزینول	۴۰٫۳۸
۲	داینسترول	۳۲٫۹۰
دی‌آریل هپتانوئید		
۳	کورکومین	۳۷٫۳۰
مونومرهای فنولی		
۴	فرولیک‌اسید	۳۱٫۰۱
۵	پاراکوماریل‌الکل	۲۱٫۷۴
۶	نورمتانفرین	۳۳٫۷۴
۷	هوموانیلیل الکل	۴۳٫۱۴

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد استخراج با حلال اتانول-آب (۱:۹ v/v) جهت استخراج ترکیبات فنولی زیست‌فعال نتایجی 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 سوکسله معایبی نیز دارد. در روش غوطه‌وری مصرف حلال بیشتر و بازده استخراج کمتر است. همچنین مرحلهٔ هیدرولیز قلیایی با محلول ۱ مولار NaOH، به منظور حذف قندهای متصل به لیگنان‌ها و پلی‌ساکاریدها از عصاره‌های اتانولی، باعث تخریب ترکیبات فنولی و عدم شناسایی آن‌ها در آنالیز GC/MS شد.

References

[1]. Neacus, M., Eklund, P. C., Sjoholm, 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., Sjoholm, R., Sundberg, A., Sundberg, K., and Willfor, S. (2003). Knots in trees-Anew rich source of lignans. Phytochemistry Reviews, 2: 331-340.

[4]. Holmbom, B., Willfor, S., Hemming, J., pietarinen, S., Nisula, L., Eklund, P., and Sjoholm, R. (2007). Knot in trees: A rich source of bioactive polyphenols. In: Materials, chemicals and energy from forest biomass. Eds: Argyropoulos, 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.