

# استخراج اسانس بابونه به روش دی اکسید کربن فوق بحرانی و آنالیز آن توسط گاز کروماتوگرافی کوپل شده با اسپکتروسکوپی جرمی

• غلامرضا نبی، عضو هیات علمی دانشکده محیط زیست دانشگاه تهران

• کامکار جایمند، عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

• محمدباقر رضایی، عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

تاریخ دریافت: تیرماه ۱۳۷۸      تاریخ پذیرش: خردادماه ۱۳۷۹

صنعتی می باشد را می توان با استفاده از روش فوق بحرانی بهبود بخشید. در حقیقت روش های سنتی مثل روش تقطیر با بخار آب می تواند موجب تجزیه حرارتی محصولات گردد و یا روش استخراج با حلال موجب الودگی محصول، توسط حلal آلتی خواهد شد. محققین بسیاری براساس این روش کارکرداند، ولی تمام محصولات بدست آمده آنها حالت موئی شکل داشته و دارای ترکیبات نامطلوب و ضرر بوده است (۵ و ۶). اخیراً تشخیص داده اند که این ترکیبات ضرر را می توان از طریق جداسازی فوق بحرانی با استفاده از دو یا چند جدایکنده سری و شرایط مناسب حذف نمود (۷ و ۸) ضمناً با این روش اسیدهای چرب و مشتقات آنها را نیز شرایط مناسب و استفاده از حلالهایی با دانسته کم حذف نمود.

نظر به اینکه روش استخراج فوق بحرانی که توسط یکی از محققین (۱) در فشار و دماهای مختلف انجام شده است نشان می دهد که اسانس ویسکوز آری رنگی ایجاد و به راحتی در  $CO_2$  فوق بحرانی حل می گردد و در  $NO_2$  نیز حل شده و ترکیبات نامطلوب نیز در آن وجود داشته است. ضمناً برای جدایکردن ترینها، بیسابولول، ماتریسین و دی سیکلواترها از کروماتوگرافی لایه نازک اسپکتروسکوپی استفاده شده است.

دانشمندان سعی کرده تا اسانس بابونه را در فشار ۲۰۰ بار و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد جدا نمایند، ولی محصول فقط ۲۰ درصد از مواد فرار را دارا بوده است و ترکیباتی مثل  $\beta$ -فارنسین، اسیدهای بیسابولول A، B،  $\alpha$ ،  $\beta$ -بیسابولول و ماتریسین به صورت کامازولین را توسط GC-MC شناسایی نموده اند (۱۰). آنها با توجه به استفاده از یک گونه بابونه، که دارای مقدار زیادی ماتریسین بود فقط مقدار کمی ماتریسین (کامازولین) را جداسازی نمودند. ضمناً آنها نشان داده اند که ترکیبات فعلی به دست آمده از روش فوق بحرانی به مراتب بیشتر از روش سنتی است. لذا جداسازی اسانس براساس روش فوق بحرانی، طی یک مرحله و تحت یک شرایط امکان پذیر است.

## ✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 49 PP:

136-139

**Supercritical fluid extraction of essential oils from Matricaria chamomilla L. and analysis by GC/MS**  
By: G.R. Nabi; Member of scientific board of Tehran Univ. K. Jaimand; M.B. Rezaee. Members of scientific board of forests and rangelands research Institute.

Supercritical fluid extraction with carbon dioxide is used to extract the essential oils from the medicinal herb, *Matricaria chamomilla* L. Samples were extracted with supercritical carbon dioxide at 90 bar and 40°C in two separators at 90 bar 5°C and 30 bar and -5°C. The extracts are examined by GC/MS. Chamazulene is an artifact, formed during hydrodistillation from the guajane-type sesquiterpenelactone matricin. Major components are bisabolol oxide A and B (50.42% and 16.88%), Cis-dicycloether (0.64%), bisabolone oxide (7.76%).

**Key words:** Supercritical Fluid Extracts, Carbon dioxide, *Matricaria chamomilla* L., Bisabolol oxide A and B, Matricin.

از میان حلالهای ممکن در روش بحرانی به لحاظ ارزان و ساده تر بودن، دی اکسید کربن بیشتر مورد استفاده قرار می گیرد. ضمناً این حلال میل ترکیبی زیادی با ترکیبات چربی دوست که می باستی استخراج گرددند نشان می دهد. با وجود این تحقیقاتی در استفاده از سایر حلالها مثل: نیتروس اکسید (۲) و (۱) و حلالهایی به همراه  $CO_2$  (۴) و (۳) انجام شده است. تولید اسانس که از فرآیندهای استفاده شود.

## مقدمه

استخراج فوق بحرانی  $CO_2$  در زمینه شیمی گیاهی مورد توجه محققین زیادی می باشد. این روش همچنین به عنوان یک روش آنالیز جهت آماده سازی نمونه ها از ترکیبات طبیعی استفاده می شود، این روش همچنین می تواند به عنوان یک فرآیند صنعتی جهت بهبود پخشیدن کیفیت محصولات تولید شده از مواد گیاهی استفاده شود.

## چکیده

استخراج اسانس بابونه توسط  $CO_2$  فوق بحرانی، زمینه ای برای جداسازی اجزاء اسانس می باشد. این اجزاء توسط GC-MS شناسایی شدند که نه تنها نشان دهنده تمام جزئیات ترکیبات موجود در اسانس می باشد بلکه حضور ترکیبات نامطلوب را نیز نشان می دهد. مناسب ترین استخراج اسانس در فشار ۹۰ درجه سانتیگراد و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد بدست آمده است و محصول را در دو جدا کننده سری به ترتیب در فشار ۹۰ درجه سنتافر و دمای ۵ درجه سانتیگراد و فشار ۳۰ بار و دمای ۵-۶ درجه سانتیگراد جدا نمودیم به طوری که تمامی ترکیبات نامطلوب در اولین جدا کننده تهشیش گردیدند. از آنجانه که تبدیل ماتریسین به کامازولین انجام نشده، لذا اسانس تحت تاثیر تجزیه حرارتی قرار نگرفته است. ترکیباتی مثل اکسیدهای بیسابولول و اکسید بیسابولون بیش از ۷۵ درصد از ترکیبات موجود در اسانس بابونه و دی سیکلواترها نیز ۱۳ درصد از آن را تشکیل می دهند.

**کلمات کلیدی:** استخراج فوق بحرانی، دی اکسید کربن، بابونه، بیسابولول اکسید آ و ب، ماتریسین

ب DST آمده از این آزمایش وجود دارد، لذا هیچ یک از شرایط موجود نتوانستند اسانس خالص را جاید نمایند. این آزمایشات آشکارا نشان می‌دهد که پارافینها در سطح گیاه و ترکیبات اسانس در قسمت داخلی برگها وجود دارند.

بنابراین پارافینها توسط خیساندن گیاه استخراج شده، در حالیکه برای استخراج اسانسها می‌باشد بر انتقال جرم داخلی غلیبه نمود (۱).

سایر ترکیبات نامطلوب نیز در دانسیته‌های بالای CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> bar, T = ۲۰ °C) (P > ۱۲۰ bar) استخراج می‌گردد، تمام مواد فوق توسط GC-MS شناسایی شده‌اند و طیف جرمی آنها نشان می‌دهد که ساختار اصلی آنها دارای متیل استر اسیدهای چرب است که جزئیات بیشتر آنها در اینجا بحث نشده است. تمام آزمایشات نشان دهنده آن است که بابونه‌ای که در این مطالعه استفاده شده متعلق به گونه شمیایی اکسیدبیسابولول بوده و دارای مقدار کمی از ماتریسین و بیسابولول نیز می‌باشد.

در اولین جداکننده شرایط عمل به گونه‌ای است که

VARIAN مدل ۳۴۰۰ مجهز به آشکارساز یونی بسته است.

**طیف جرمی** توسط دستگاه کروماتوگراف HP-5890 جفت شده با آشکارساز جرمی HP-5970 بسته آمده است، نوع ستون استفاده شده نیز DB-5 می‌باشد.

**شرایط GC** برای جدا سازی اسانس به شرح زیر می‌باشد:

دمای کوره ۵۰ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه که تا ۲۵ درجه سانتیگراد با سرعت ۲ درجه سانتیگراد در هر دقیقه افزایش می‌باشد ستون مورد استفاده برای مشخص کردن پارافینها HP-1 بوده است.

شرایط GC برای جداسازی این پارافینها عبارت است از: دمای کوره ۱۲۰ درجه سانتیگراد برای مدت ۵ دقیقه که تا ۲۱۰ درجه سانتیگراد با سرعت  $\frac{5}{\text{min}}$  افزایش یافته است و در حالت دوم از دمای ۲۹۰ تا ۲۱۰ درجه سانتیگراد با سرعت  $\frac{3}{\text{min}}$  افزایش یافته و سپس در آن دما ثابت نگهداشته شده است. در صد ترکیبات موجود در اسانس و ترکیبات

هدف از این مطالعه، تهیه اسانس بابونه با کیفیت بالا و یافتن شرایطی مطلوب برای پارامترهای CO<sub>2</sub> فوق بحرانی می‌باشد.

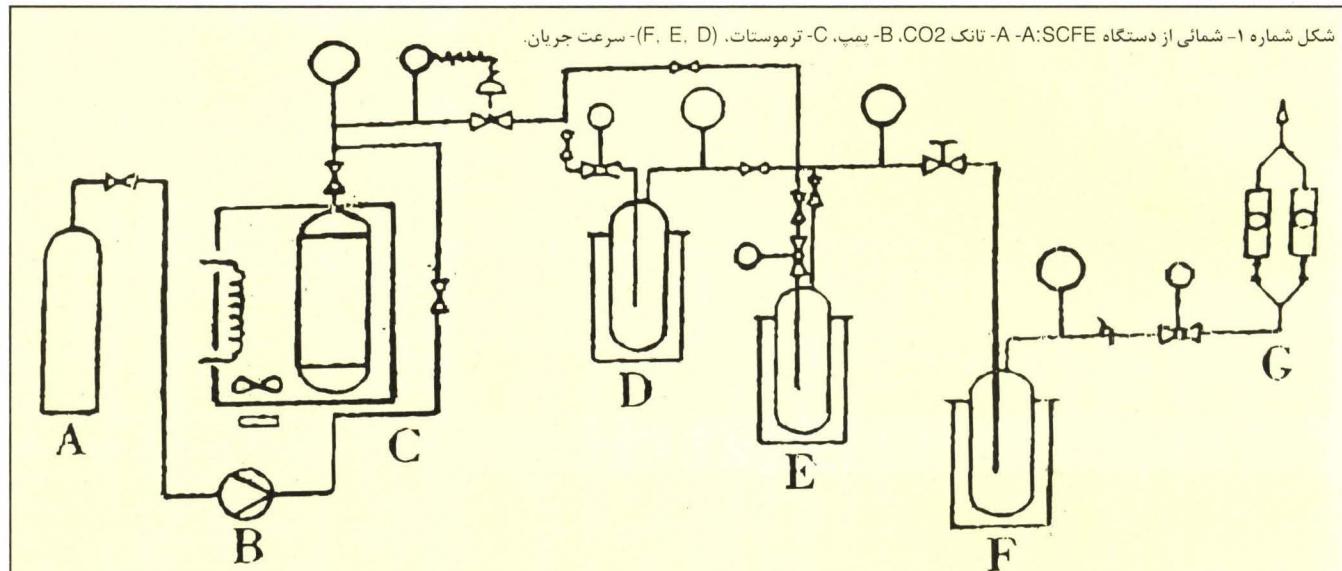
برای رسیدن به این هدف، جداسازی جزء به جزء محصولات مورد نظر بوده و کلیه مراحل جهت دستیابی به تولید صنعتی آن توسعه داده می‌شود. در این تحقیق تحت شرایط مناسب برای استخراج، ترکیبات موجود در اسانس بابونه و ترکیبات پارافینی شناسایی شده‌اند.

## مواد و روشها

### دستگاه جداکننده فوق بحرانی

دستگاهی که در این روش استفاده گردیده در شکل یک نشان داده است. این دستگاه شامل یک عدد پمپ فشار بالا (مدل میل رویل B)، ساخت فرانسه که فشاری تا ۵۰۰ bar را داراست)، طرف اسانس‌گیری (حجم داخلی ۴۰۰ سانتیمتر مکعب و P = ۷۰۰ bar و سه جداکننده که قابلیت کار در دمایهای ۱۰ تا ۶۰ درجه سانتیگراد و فشار ۳۰۰ bar را دارد، می‌باشد که به طور

شکل شماره ۱- شماتی از دستگاه A-SCFE, B-CO<sub>2</sub>, C-پمپ, D-ترموستات, E, F, G-سرعت جریان.



پارافینها به آهستگی جدا می‌شوند لذا فقط در حالت محلول فوق اشباع و رسوب، می‌توان آنها را جدا نمود. شرایط بهینه برای آزمایش، فشار ۹۰ بار و دمای ۵-۳۰ درجه می‌باشد. در حالیکه دمایهای بین ۵-۳۰ درجه سانتیگراد نیز مطالعه گردیده است. بهترین راندمان جداسازی برای اسانس بابونه و شرایط بهینه آن در جدول ۱ آورده شده است.

شرایط دوین جداکننده، فشار ۳۰ بار و دمای ۵-۳۰ درجه سانتیگراد بوده است که قابلیت اتحال ترکیبات اسانس در CO<sub>2</sub> گازی به حداقل می‌رسد و در نتیجه مقدار ناچیزی از ترکیبات فرار در بخار خروجی به هدر می‌رود. این موضوع در آنالیز GC-MS کاملاً مشخص گردیده است.

در صد نسبی متیل استر اسیدهای چرب اسانسها تولیدی در شرایط مختلف نیز با استفاده از محاسبه

پارافینی از پیکهای بسته آمده از GC تخمین زده شده است. شناسایی ترکیبات براساس مقایسه زمانهای بازداری (ماند)، طیف جرمی و با استفاده از استاندارد و داده‌های طیف جرمی موجود در کتابخانه‌ها انجام شده است.

### ب-کروماتوگرافی لایه نازک

اسانس بابونه استخراج شده در شرایط فوق بحرانی همچنین براساس روش Schutz و همکارش (۱) توسط کروماتوگرافی لایه نازک آنالیز گردیده است.

## نتایج و بحث

آزمایشات اولیه استخراج فوق بحرانی در فشارهای ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ بار و دمای ۳۵ تا ۵۰ درجه سانتیگراد انجام شده است. انجاکه پارافینها زیادی در محصول

سری جهت جداسازی اسانسها استفاده می‌شود و ضمیر  $\frac{\text{kg}}{\text{kg}}$  حداکثر شدت جریان CO<sub>2</sub> در حدود ۴ می‌باشد.

در این فرآیند از دو جداکننده استفاده گردیده که پارافینها مضر در اولین جداکننده و اسانس بابونه در دوین جداکننده رسوب می‌نمایند. سرچ کامل دستگاه و طرز کار آن در مقالات دیگر به چاپ رسیده است (۷). شرایط آنالیز که در این مطالعه در نظر گرفته شده است، عبارت است از: سرعت جریان CO<sub>2</sub>  $\frac{1}{8} \text{ kg}$  میزان بابونه ۱۱۰ گرم که در سایه خشک شده است و مدت استخراج ۱۵۰ دقیقه.

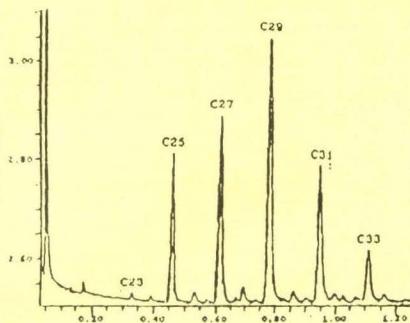
### روش کار آزمایشگاهی

#### الف-گاز کروماتوگرافی جفت شده

#### با اسپکتروسکوپی جرمی

داده‌های GC-MS توسط دستگاه گاز کروماتوگراف

شکل شماره ۳ - کروماتوگرام موم بابونه که در اولین جدالنده استخراج گردید.



[Rt 78.23 min,  $\frac{m}{200}$  (100), 199(25), 185 (18), 172 (12), 171 (21), 170 (26), 169 (19), 158 (16), 115 (54), 76 (35), 36 (11)].

علاوه بر پیکهای آنالیز شده، پیکهای دیگری نیز بدست آمد ولی مقادیر آنها کم بود، در زمان بازداری ۷۹/۹۲ و ۸۱/۱۸ پیک پایهای در ۲۱۶amv و ۷۹/۹۲ بدست آمد. با مقایسه طیف جرمی این ترکیبات با دیگر مراجع (۱۴) و (۱۵)، تصویر می‌گنیم که ترکیبات دیگری از دی‌سیکلو اترها می‌باشند که ساختمان آنها می‌تواند ترکیبات زیر باشد:

Cis-2[hexadiyn-(2,4)-ylidene] -1,6- di -oxaspiro [4,5] -(3) [Rt 79.92 min,  $\frac{m}{214}$  (100), 213 (19), 199 (19), 186 (17), ۱۸۵ (33), 169 (24), 159 (15), 156 (53), 115 (34), 76 (29), 63 (7), 57(21), 55 (42)]

ساختارهای ترانس آن:

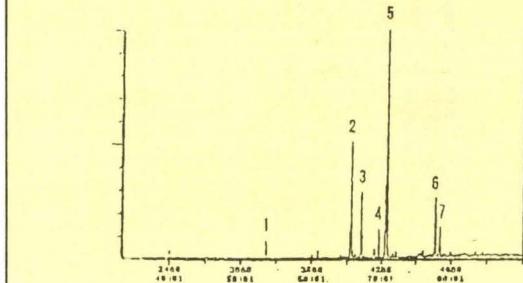
[Rt 81.18 min,  $\frac{m}{214}$  (100), 213 (20), 199(9), 186 (16), ۱۸۵ (۳۴), 169 (26), 159 (13), 156 (55), 115 (37), 76 (30), 63 (8), 57 (14), ۵۵ (41)] می‌باشد

Breinlich و همکارش (۱۵) اعلام نمودند که دی‌سیکلو اترهای استخراج شده از بابونه در خواص داروئی آن سهم به سزانی دارد.

#### منابع مورد استفاده

- 1- Stahl, E., Schutz, E., 1975. Extraction of german chamomile with supercritical gases (German). Arch. Pharm. 311, 9921001.
- 2- Brunner, G., 1984. Mass transfer from solid material in gas extraction. Ber. Bunsenges. Phys.Chem. 88, 887-891.
- 3- Videal J.P.; H., 1987. Black pepper oleoresin obtained by extraction with dense carbon dioxide or carbon dioxide ethanol mixtures (French). Sci. Aliments 7,481-498.
- 4- Randhuram Rao, G.V.; Sricivas, P.; Sastry, S.V.G.K.; Mukhopadhyay, M., 1992. Modeling solute-co-solvent interaction for supercritical fluid extraction of fragrances. J. Supercrit. Fluids, 5, 19-23.

شکل شماره ۲- کروماتوگرام اسانس بابونه در فشار و دمای مورد نظر ۱-  $\beta$  - Farnescne, 2- Bisabolol oxide, 3- Bisabolene oxide, 4- Matricin (Chamazulene), 5- Bisabolol oxide A, 6- cis - Dicycloether MW 200, 7- trans - Dicyclo ether MW 200.



سطح‌های پیک GC ارزیابی گردیده‌اند و با قاره دادن اسانس گیری در یک دانسیته مناسب (کمتر از  $\frac{9}{10}/5^{\circ}\text{C}$ ) می‌توان حداقل مقادیر آن را نیز محاسبه نمود.

تحقیق در مورد شرایط بهینه استخراج در فشارهای ۸۰ تا ۱۲۰ بار و دماز ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتیگراد نیز انجام شده است که این محدوده در مقایسه با تحقیق (Stahl) (۱) و همکارانش بسیار حساس‌تر است زیرا پر واضح است که  $\text{CO}_2$  فوق بحرانی در دانسیته‌های بالاتر (برای مثلث دمای ۴۰ و فشار بالاتر از ۲۰۰ بار) قدرت حلایت بالای رانشان می‌دهد ولی گزینش پذیری آن کاهش می‌باید (۵ و ۶)، در حقیقت این محققین گزارش نموده‌اند که دانسیته بالای حلال بازده استخراج را افزایش داده و این بازده به سبب وجود پارافینها و ترکیبات نامطلوب می‌باشد.

بعد از هر استخراج، محصولات توسط GC-MS مورد آنالیز قرار گرفته نامطلوب رانشان داده‌اند.

مناسب‌ترین شرایط جهت استخراج فشار ۹۰ بار و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد بوده که بازده خوبی از محصولات رانشان داد و به ترتیب در جدالنده اول ماده بی‌بو و سفید رنگی ایجاد شد که همان پارافینها بوده و مایع زرد رنگ با بوی قوی بابونه نیز در جدالنده دوم بدست آمد، بازده‌های ایجاد شده که نسبت مقدار اسانس به وزن ماده اولیه است برای اسانسها ۱/۱۸٪ و پارافینها ۰/۰۸٪ بوده است. ضمناً آب نیز (۰/۰۴٪) در دومین جدالنده به همراه اسانس ایجاد شد که توسط سانتریفیوز جدال گردید.

آنالیزهای GC-MS این محصولات در جدول ۱ و ۲ داده شده است. پیک GC اسانس در شکل ۲ نشان داده شده است. براساس دانشی که داریم اسانسها مخلوط از ترکیبات هیدروکربنی، ترکیبات اکسیژن دار و سزکوئی ترکیها می‌باشند، این ترکیبات تماماً در استخراج  $\text{CO}_2$  فوق بحرانی وجود داشته و لی مقدار دهنده نسبت به اسانس‌های آزمایش شده قبلی (۸ و ۷) متفاوت است.

نتایج بدست آمده از GC در جدول ۱ نشان می‌دهد که ترکیبات هیدروکربنی سهم خیلی کمی در ترکیبات اسانس بابونه دارند (۰/۰۲٪) و عده ترکیبات را سزکوئی ترکیها (۰/۱۶۶٪) و  $\beta$ -فارنسین (۰/۱۵۸٪) نشان می‌دهند. البته برخی، مقدار آنها را در اسانس بابونه تا ۱۷/۹٪ نیز گزارش نموده‌اند (۹).

جدول شماره ۱- ترکیبیهای اسانس باونه که در ۴۰ درجه سانتیگراد و فشار ۹۰ بار توسط دستگاه SCFE به دست آمده.<sup>a</sup> زمان مانده بر روی ستون ۵-DB کروماتوگراف گازی، b درصد سطح پیک کروماتوگراف گازی.

Area%	Rt(min)	Compound	
۰/۰۷	۲۰/۰۲	6 methyl 1-5-hepten-2-one	۱
۰/۱۱	۲۵/۲۳	Ocimene	۲
۰/۲۶	۲۸/۰۴	Linalool	۳
۰/۱۰	۳۲/۰۷	Isoborneol	۴
tr <sup>c</sup>	۳۲/۲۳	Menthol	۵
۰/۰۷	۳۴/۰۲	4-Terpineol	۶
۰/۰۹	۳۵/۰۰	a-Terpineol	۷
۰/۱۱	۳۸/۰۵	n.id. C10H16O	۸
۰/۲۵	۳۹/۰۸	Nerol	۹
۰/۲۴	۴۱/۰۷	Geraniol	۱۰
۰/۱۲	۴۵/۱۳	Methyl acetate	۱۱
۰/۱۲	۴۸/۱۰	n. id. C12 H22O2	۱۲
tr	۴۹/۰۷	B-Elemene	۱۳
۰/۱۳	۵۱/۰۱	B-Caryophyllene	۱۴
۱/۰۳	۵۲/۰۳	B- Farnesene	۱۵
۰/۱۴	۶۰/۰۷	trans- Nerolidol	۱۶
۰/۱۵	۶۰/۰۳	Spathulenol	۱۷
۰/۱۷	۶۲/۰۸	Caryophyllene oxide	۱۸
۰/۱۹	۶۴/۰۳	n.id C15 H20 O	۱۹
۰/۱۶	۶۴/۰۹	T-cadinol	۲۰
۱۶/۸۸	۶۵/۰۸	Bisabolol oxide B	۲۱
۰/۱۵	۶۶/۰۴	a- Bisabolol	۲۲
۷/۷۶	۶۷/۰۹	Bisabolone oxide	۲۳
۳/۰۲	۶۹/۰۶	Matricin (Chamazulene)	۲۴
۵۰/۱۴	۷۰/۰۳	Bisabolol oxide A	۲۵
۰/۱۴	۷۱/۰۳	n. id C15 H26 O	۲۶
۰/۰۶	۷۲/۰۹	n. id	۲۷
۰/۱۸	۷۴/۰۷	n. id C15 H26 O	۲۸
۹/۱۴	۷۷/۰۶	cis-Dicycloether MW 200	۲۹
۳/۲۳	۷۸/۰۲	trans-Dicycloether MW 200	۳۰
۰/۱۲	۷۹/۰۲	trans-Farnesol	۳۱
۰/۱۴	۷۹/۰۵	cis, trans- Farnesol	۳۲
tr	۷۹/۹۲	cis-Dicycloether MW 214	۳۳
tr	۸۱/۰۸	trans-Dicycloether MW 214	۳۴

جدول شماره ۲- مومهای بدست آمده در تقطیر جزء گل باونه.<sup>a</sup> زمان مانده بر روی ستون HP-1

Area%	Rt(min)	ترکیب	
۰/۴۴	۱۳/۱۲	Hexadecene	۱
۲/۱۲	۱۷/۴۳	Octadecene	۲
۰/۱۷	۲۶/۸۲	Docosene	۳
۱/۹۴	۲۹/۵۹	DTricosane	۴
۰/۲۱	۳۲/۰۹	Tetracosane	۵
۱۰/۰۰	۳۴/۶۵	Pentacosane	۶
۱/۰۲	۳۶/۹۸	Hexac Osane	۷
۰/۱۶	۳۸/۷۲	Methylhexacosane	۸
۱۷/۰۶	۳۹/۷۴	Heptacosane	۹
۲/۷۴	۴۱/۷۸	Octacosane	۱۰
۰/۱۵	۴۳/۰۷	Methylheptacosane	۱۱
۲۴/۱۲	۴۳/۹۴	Nonacosane	۱۲
۲/۱۶	۴۵/۰۴	Triacontane	۱۳
۱۹/۰۱	۴۷/۰۳	Entracontane	۱۴
۱/۰۶	۴۹/۰۴	Methyltriacontane	۱۵
۱/۰۴	۴۹/۸۰	Dotriacontane	۱۶
۱/۱۶	۵۱/۰۹	Methylpentriacontane	۱۷
۹/۴۶	۵۲/۰۷	Tritriacontane	۱۸
۱/۱۳	۵۴/۰۰	Methylidotriacontane	۱۹