

تجزیه شیمیایی اسانسهای لاواند ایران (اسطوخودوس) و لاواند فرانسه به کمک روش کاپیلاری گاز کروماتوگرافی (C.G.C)

محمد مهدی برازنده^(۱)

چکیده

در این بررسی دو گونه گیاه لاواند از میان گونه‌های معطر که به علت دارا بودن خواص متعدد درمانی و مصارف بهداشتی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند، از نظر ترکیبهای شیمیایی روغنهای اسانسی با یکدیگر مقایسه شده‌اند.

گونه اول، لاواند فرانسه *Lavandula vera* است که اسانس آن از شهرت و اعتبار جهانی برخوردار می‌باشد. گونه دیگر، لاواند ایران یا اسطوخودوس *Lavandula spica* است که حدود بیست سال پیش از اروپا وارد و در محوطه مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کاشته شده است.

در نتیجه این کار تحقیقاتی، علت اعتبار جهانی لاواند فرانسه (پائین بودن کامفر) در مرحله نخست و ارزش و جایگاه ویژه‌ای که سیستم کاپیلاری گاز کروماتوگرافی (CGC) در تجزیه شیمیایی (کمی و کیفی) ترکیبهای فرار به ویژه روغنهای اسانسی می‌تواند ایفا کند، در مرحله دوم مشخص می‌گردد.

۱- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع - بخش تحقیقات گیاهان دارویی و محصولات فرعی

مقدمه

گاز کروماتوگرافی، روشی بسیار مطمئن و دقیق برای جداسازی کمی (Quantitative analysis) ترکیبهای فرار و تعیین غلظت اجزاء جدا شده به شمار می‌رود. از طرفی این روش در موارد متعددی برای شناسایی کیفی (Qualitative analysis) نیز به کار رفته است. با این وجود در صورتی که روش مذکور با روشهای طیف‌سنجی نظیر UV, NMR و GC/MS همراه گردد، عمل شناسایی و تعیین ساختمان شیمیایی اجزاء جدا شده به مراتب سهل‌تر خواهد بود. در هر حال روش گاز کروماتوگرافی، علاوه بر کاربرد وسیع در تجزیه‌های کمی، همچنان از اعتبار و ارزش ویژه‌ای در شناسایی‌های کیفی برخوردار است.

در گاز کروماتوگرافی، اجزاء یک نمونه تبخیر شده، در نتیجه توزیع بین یک فاز گازی متحرک (Mobile Phase) و یک فاز ثابت (Stationary Phase) که داخل ستونی (Column) وجود دارد، از یکدیگر جدا می‌شوند. فاز ثابت یا به صورت جامد بوده (کروماتوگرافی گاز - جامد، G.S.C) و یا به صورت فیلم بسیار نازکی از مایعی با نقطه جوش بالا (مانند دی‌متیل سیلوکسان) در سطح خارجی ذرات جامد و یا دیواره داخلی ستون توزیع می‌گردد. (کروماتوگرافی گاز - مایع، G.L.C)

نمونه به حالت مایع با حجمی معادل چند دهم میکرولیتر، به شکل یک جریان تویی (Plug Flow) و توسط سرنگ‌های میکرولیتری ابتدا به قسمت تزریق وارد و پس از تبخیر در این قسمت با فشار اعمال شده از طرف گاز حامل (هلیوم، ازت یا هیدروژن) داخل قسمت جداسازی (ستون) می‌گردد. با عبور نمونه از داخل ستون، اجزاء موجود در آن که هر کدام حلالیت معینی در فاز ثابت دارند، براساس قانون تعادل بین این فاز و فاز گازی، توزیع می‌شوند.

از جنبه نظری، هر قدر تعداد تعادلهای انجام شده بین دو فاز بیشتر باشد، بازده یک ستون کروماتوگرافی بیشتر بوده و جداسازی (Resolution) بهتر و مطلوبتری به دست خواهد آمد. بازده یک ستون کروماتوگرافی به پارامترهای مختلفی بستگی دارد که از میان آنها طول و قطر داخلی ستون و همچنین ضخامت فیلم فاز ثابت (GLC) یا قطر ذرات جامد و نحوه توزیع آنها داخل ستون (GSC) و ترکیب شیمیایی این فاز از بیشترین اهمیت برخوردار می باشند.

ستون هایی که در ابتدا مورد استفاده قرار می گرفتند و امروزه نیز در موارد خاصی به کار می روند، به ستون های پر شده (Packed Columns) معروف هستند. این ستون ها دارای طول ۲۰-۲ متر و قطر داخلی ۸-۱ میلیمتر می باشند. تعداد تعادلهای انجام شده در بهترین نوع این ستونها حداکثر به ۲۰۰۰۰ یا کمی بیشتر ($N > 20000$) می رسد، در حالی که ستونهای جدید که به ستونهای موینه (Capillary Columns) معروف بوده و اعتبار و ارزش بالای گاز کروماتوگرافی به مقدار قابل توجهی مرسوم پیشرفت در تکنولوژی ساخت چنین ستون هایی می باشد، واجد قطر داخلی ۰/۵-۰/۲۵ میلیمتر و طولی برابر یکصد متر یا بیشتر می باشند و فاز ثابت نیز به صورت لایه بسیار نازکی به ضخامت ۰/۲۵ میکرون (و گاهی کمتر) در سطح داخلی آنها توزیع شده است. در این نوع ستون ها تعداد تعادلهای انجام شده که به تعداد سینی های نظری نیز معروف است، گاهی از ۱۰۰۰۰۰ نیز تجاوز می کند که نشانگر بازده بالای این ستونها نسبت به ستونهای پر شده می باشد.

اجزاء خارج شده از ستون، یکی پس از دیگری وارد آشکار ساز شده و در آنجا توسط مکانیسمی که به نوع آشکار ساز مورد استفاده بستگی دارد، علائمی به ازای هر جزء نشان داده می شود که پیک (Peak) نام دارد.

هر پیک واجد دو مشخصه بوده که اولی، زمان ظهور آن و دومی سطح زیرمنحنی متناظر با آن به شمار می‌رود. مشخصه اول برای شناسایی کیفی (تعیین نام جزء) و مشخصه دوم برای شناسایی کمی (تعیین غلظت مربوط به آن جزء) به کار می‌روند.

سیستم مورد استفاده

سیستم مورد استفاده، گاز کروماتوگراف شیمادزو سری ۹A ساخت کشور ژاپن و یکی از پیشرفته‌ترین انواع گاز کروماتوگرافهای موجود در جهان است که مجهز به دتکتور (Flame Ionization Detector) FID و داده‌پرداز Chromatopac-C-R3A می‌باشد.

این سیستم، علاوه بر دارا بودن کنترل‌کننده‌های مجزای درجه حرارت برای قسمت‌های تزریق، ستون و آشکارسازی، قابلیت برنامه‌ریزی درجه حرارت در پنج مرحله خطی را نیز داراست. همچنین امکان تنظیم پارامترهای عملیاتی نظیر انتخاب نوع آشکارساز، انتخاب پلاریته مربوط به سیگنال دتکتور و نیز تنظیم حساسیت و محدوده عملکرد آن در این سیستم وجود دارد.

در این سیستم، از ده فایل جداگانه برای ذخیره‌سازی برنامه‌های مورد نظر (شامل ID file, time program, Basic program, analysis parameters) می‌توان استفاده کرد. به علاوه، ثبت کروماتوگرام‌ها و برنامه‌های اشاره شده بر روی دو دیسکت ۵/۲۵ اینچی امکان‌پذیر است.

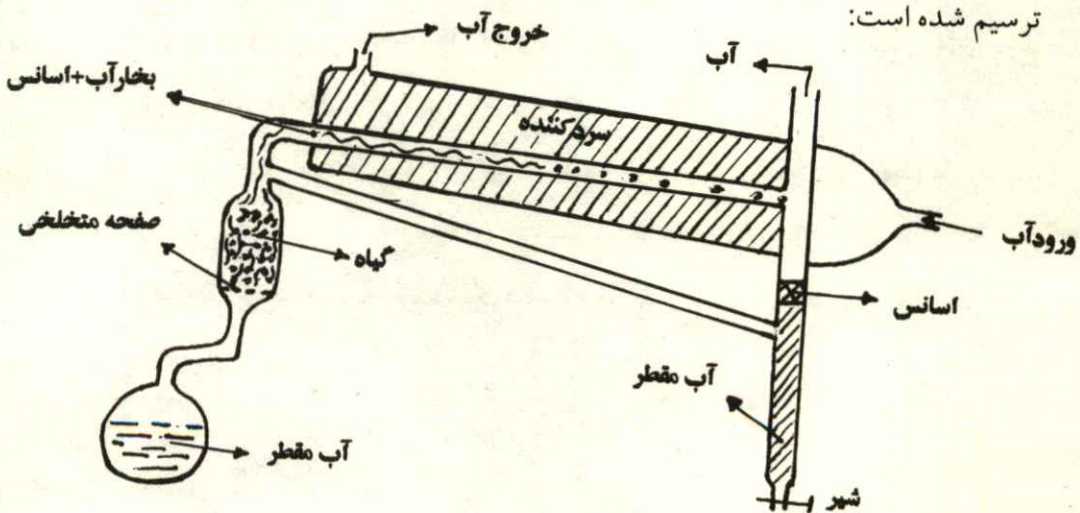
به کمک داده‌پرداز موجود، امکان وارد کردن تمام دستورها و شرایط مورد نظر به GC و نیز برنامه‌نویسی به زبان بیسیک که عمومی‌ترین و کاربردی‌ترین زبان برنامه‌نویسی کامپیوتر است و نیز کنترل کامل GC توسط این برنامه وجود دارد. در این سیستم داده‌پردازی که پیشرفته‌ترین نوع برای همه انواع و شکلهای کروماتوگرافی به

حساب می‌آید می‌توان تعداد ۴۰۰۰ پیک را مورد پردازش خودکار قرار داده و محاسبه‌های کمی (به ۸ طریق) و شناسایی‌های کیفی (به دو روش، Time window, Time band) مربوط به آنها را انجام داد.

تعریف

اسانسها ترکیبهای معطری هستند که در اندامهای مختلف گیاهان یافت می‌شوند. به علت تبخیر این ترکیبها در اثر مجاورت با هوا و در درجه حرارت عادی، آنها را روغن‌های فرار (Volatile oils)، روغنهای اتری (Ethereal oils) و یا روغنهای اسانسی (Essential oils) نیز می‌نامند. این ترکیبها توسط فرآیندهای فیزیکی از یک گونه گیاهی معطر جدا می‌شوند که مهم‌ترین و متداول‌ترین آنها روش تقطیر با بخار آب (Steam Distillation) می‌باشد.

فرآیند تهیه اسانس از یک گونه گیاه معطر به طور شماتیک در شکل شماره (۱)



شکل شماره (۱) فرآیند تهیه اسانس از یک گونه گیاه معطر
(دستگاه اسانس‌گیری Kaiser & W.lang)

روغنهای اسانسی را باید از روغنهای دیگر نظیر روغنهای غیر فرار یا روغنهای ثابت (Fixed oils) که شامل روغنهای چرب، روغن ذرت یا روغن دانه کنجد بوده و عموماً شناخته شده تر می باشند، متمایز دانست چراکه روغنهای ثابت، اساساً از گلیسیریدها (استرهای اسید چرب گلیسرول) تشکیل شده و از نظر ترکیب شیمیایی با روغنهای اسانسی متفاوت هستند.

روغنهای اسانسی از انواع مختلف مواد آلی طبیعی و مواد شیمیایی که دارای ساختمانهای مولکولی و گروههای عاملی بسیار (هیدروکربورها، آلدهیدها، کتونها، فنولها، اترهای فنولی، اکسیدها و استرها) هستند، تشکیل شده و محدوده وزنهای مولکولی این مواد به علت آن که اغلب فرار هستند، تا اندازه ای محدود می باشد.

موارد استفاده

روغنهای اسانسی در صنایع عطرسازی (Perfumes)، مواد غذایی (Foods)، دارویی و بهداشتی (Pharmacy)، کاربرد داشته، به علاوه به عنوان چاشنی و مواد معطر در هر جای ممکن دیگر استفاده می شوند.

ترکیب این روغنها با مواد دیگر، سبب افزایش قابل ملاحظه ای در حجم کلی فروش این مواد گردیده است. روغنهای اسانسی در هر فرآورده معطر دیگر نظیر خوشبو کننده ها، کاغذ، مرکب چاپ، رنگها، شمعها، صابونها، براق کننده ها و غیره نیز به کار می روند.

هدف

علی رغم تنوع وسیع گیاهان معطر و اسانس دار در کشور، اطلاعات علمی به ویژه در

زمینه ترکیبهای شیمیایی این گیاهان بسیار اندک است.

به منظور گردآوری و ترویج این اطلاعات و بهره‌برداری صنایع غذایی و بهداشتی از نتایج آنها، به کاری گسترده و جدی نیاز است. از میان گونه‌های معطر و بومی ایران گونه لاواند (اسطوخودوس)، از اهمیت خاصی برخوردار است، چراکه اسانس آن علاوه بر این که از دوران قدیم به منظور نظافت و معطر ساختن یا در آرایش استفاده می‌گردیده، امروزه به تجربه ثابت شده که برای درمان بیش از ۳۰ نوع بیماری نیز مؤثر می‌باشد که از میان آنها می‌توان به مقوی معده، مدر، معرق، نیرودهنده، ضد تشنج و ضد کرم بودن آن و همچنین درمان کمی اشتها، زردی، اختلالات کبدی و طحال، اغماء و آسم اشاره کرد. خواص نسبتاً متعدد این گیاه و مصارف درمانی آن انگیزه‌ای برای انتخاب و تجزیه شیمیایی اسانس آن بوده و به علاوه معرفی توانایی و قابلیت دستگاه کاپیلاری گاز کروماتوگرافی (CGC) و اهمیت آن در تجزیه شیمیایی اسانسهای گیاهی هدف دیگری بود که با انجام این کار تحقیقاتی به آن نایل گردیدیم.

مواد و روش

چون اسانس لاواند فرانسه از شهرت جهانی برخوردار است و به لاواند حقیقی موسوم گردیده، آن را به عنوان اسانس استاندارد در نظر گرفته‌ایم و پس از تجزیه کمی و کیفی با اسانس لاواند ایران مقایسه کرده‌ایم (لازم به ذکر است گونه ایرانی به نام *Lavandula spica* حدود بیست سال پیش از اروپا وارد و در محوطه مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کاشته شده و اسانس گونه فرانسه نیز توسط نماینده فائو به ایران آورده شده است).

دستگاه مورد استفاده گاز کروماتوگراف شیمادزو سری ۹A مجهز به دکتور FID

(یونیزاسیون حاصل از شعله هیدروژن) است. با توجه به لزوم استفاده از ستونهای کاپیلاری با قطبیت های مختلف برای رسیدن به حداکثر جداسازی ترکیبهایی که در منابع مختلف بر آن تأکید شده اسانسها به دو ستون DB-1 (Dimethyl polysiloxane) که ستونی کاملاً غیرقطبی است و Polyethylene Glycol DB-Wax که ستونی کاملاً قطبی می باشد، تزریق شدند. مشخصات این ستونها در جدول شماره (۱) آمده اند.

جدول شماره (۱) مشخصات ستونهای مورد استفاده

ترکیب شیمیایی فاز ثابت	ضخامت فیلم فاز ثابت، میکرون	قطر داخلی میلیمتر	طول متر	ستون
Dimethylsiloxane 100% Methyl	۰/۲۵	۰/۲۵	۶۰	دی بی وان
Polyethyleneglycol PEG	۰/۲۵	۰/۲۵	۶۰	دی بی واکس

متد گاز کروماتوگرافی با برنامه ریزی خطی درجه حرارت (LTPGC) به کار گرفته شده که به تفکیک ستونها در جدول شماره (۲) نشان داده شده است.

جدول شماره (۲) برنامه ریزی دمایی ستون، آشکارساز و محفظه تزریق

برنامه ریزی دمایی	برنامه ریزی دمایی ستون، آشکارساز و محفظه تزریق	برنامه ریزی دمایی ستون، آشکارساز و محفظه تزریق
۵۵-۱۸۰°C/min ۲/۰°C/min	۵۵-۱۰۰°C/min ۱/۵°C/min ۱۰۰-۱۸۰°C/min ۲/۰°C/min	۲۵.۰°C
۲۵.۰°C	۲۵.۰°C	درجه حرارت آشکارساز
۲۲.۰°C	۲۲.۰°C	درجه حرارت محفظه تزریق

گاز حامل، هلیوم و فشار آن در ابتدای ستون، برابر ۲/۲۵ کیلوگرم بر سانتیمتر مربع است. Split ratio در کلیه تزریقات ثابت و برابر ۱:۱۰۰ تنظیم شده است.

حجم نمونه تزریقی در کلیه تزریقها برابر یک دهم میکرولیتر می باشد که با سرنگ ده میکرولیتری هامیلتون انجام شده است.

شناسایی پیکها به کمک اعداد کواتز آنها و مقایسه این اعداد با مقادیر مربوط به ترکیبهای استاندارد که در قبل با تزریق استانداردها و مخلوط هیدروکربورهای C۶-C۱۵ روی ستون دی بی وان و C۹-C۲۰ روی ستون دی بی واکس و استفاده از برنامه های کامپیوتری محاسبه شده، انجام گرفته است. لازم به ذکر است که برای ترکیبهای استانداردهای آنها در آزمایشگاه موجود نبودند از مقادیری که در منابع مختلف منتشر گردیده، استفاده شده است.

غلظتهای (درصد) ترکیبهای موجود در هر اسانس به کمک روش نرمال کردن سطح (Area Normalization Method) و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ (Response Factors) با استفاده از داده پرداز Chromatopac-C-R3A محاسبه شده اند.

مشاهدات و نتایج

۱- کروماتوگرامهای حاصل از تزریق دو اسانس روی ستون DBWAX در شکلهای شماره های (۲) و (۳) و اسامی ترکیبهای شناسایی شده همراه درصد و نیز اعداد کواتز آنها در جدول شماره (۳) مشاهده می شوند. به منظور تأیید شناسایی های انجام شده روی این ستون، هر دو اسانس به ستون DB-1 نیز تزریق شدند که کروماتوگرامهای مربوط به آنها در شکلهای شماره (۴ و ۵) و نیز ترکیبهای شناسایی شده همراه اعداد

کواتر آنها در جدول شماره (۴) نشان داده شده‌اند.

مقایسه دو جدول نشان می‌دهد که تمام ترکیبهای شناسایی شده به کمک ستون DBWAX توسط ستون DB-1 نیز تأیید شده‌اند.

۲- همان‌طور که در جدول شماره (۳) دیده می‌شود، ترکیب لینالول در هر دو اسانس، ترکیب اصلی بوده و میزان آن در اسانس لاواند ایران برابر ۳۸/۹ و در لاواند فرانسه برابر ۳۹/۵ درصد می‌باشد.

۳- آنچه سبب مرغوبیت اسانس فرانسه شده به طوری که به آن اعتبار و شهرت جهانی بخشیده است، پایین بودن میزان کامفر (camphor) در آن بوده که به آن بوی مطبوع می‌بخشد. همان‌طور که در جدول شماره (۳) دیده می‌شود، میزان این ترکیب در لاواند ایران برابر ۴/۲ درصد بوده در حالی که این میزان در لاواند فرانسه به ۰/۲ درصد می‌رسد.

۴- همان‌طور که در کروماتوگرامهای مربوط به دو اسانس دیده می‌شود، میزان جداسازی ترکیبها روی دو ستون DB-1, DBWAX با یکدیگر متفاوت بوده، به طوری که ترکیبهای قطبی روی ستون قطبی (DBWAX) و ترکیبهای غیرقطبی روی ستون غیرقطبی (DB-1) از درجه تفکیک بالاتری نسبت به ستون دیگر برخوردارند. بنابراین در تجزیه‌های کمی و کیفی به کمک دستگاه CGC استفاده از ستون قطبی (مانند DB-WAX) برای جداسازی ترکیبهای قطبی و ستون غیرقطبی (مانند DB-1) برای جداسازی ترکیبهای غیرقطبی، امری اجتناب‌ناپذیر است.

جدول شماره (۳) ترکیبهای شناسایی شده در اسانسهای لاواند ایران و لاواند فرانسه

ستون مورد استفاده: DB-WAX (PEG, Polyethyleneglycol)

عدد کواتر		درصد		نام ترکیب	شماره پیک
محاسبه شده	تجربی	لاواند فرانسه	لاواند ایران		
۱۰۳۶	۱۰۳۵	۰/۲۸	۰/۶۹	α -pinene	۱
۱۰۳۶	۱۰۳۸	۰/۱۴	۰/۰۶	α -thujen	۲
۱۰۸۱	۱۰۸۰	۰/۱۷	۰/۲۷	camphene	۳
۱۱۲۶	۱۱۲۱	۰/۱۴	۱/۱۴	β -pinene	۴
۱۱۷۵	۱۱۷۳	۰/۴۸	۰/۵۸	myrcene	۵
۱۲۰۶	۱۲۰۷	۰/۳۵	۱/۰۸	limonene	۶
۱۲۳۲	۱۲۲۸	۰/۳۴	۱۴/۶	1,8-cineole	۷
۱۲۴۰	۱۲۴۳	۲/۶۲	۱/۷۴	(Z)- β -ocimene	۸
۱۲۵۸	۱۲۶۰	۱/۰۴	۰/۷۴	(E)- β -ocimene	۹
۱۲۸۶	۱۲۸۶	۰/۳۸	۰/۲۸	p-cymene	۱۰
۱۵۴۲	۱۵۴۰	۰/۲	۴/۲	camphor	۱۱
۱۵۷۴	۱۵۷۱	۳۹/۵	۳۶/۹	linalool	۱۲
۱۵۵۷	۱۵۷۵	۳۲/۴	۳/۷	linalyl acetate	۱۳
۱۶۱۷	۱۶۰۶	۳/۰۲	۰/۴۷	β -caryophyllene	۱۴
۱۶۲۸	۱۶۲۶	۷/۳	۴/۱۹	terpinene-4-ol	۱۵
۱۶۸۴	۱۶۷۶	۰/۱	۳/۱	α -humulene	۱۶
۱۷۱۸	۱۷۱۹	۰/۸۴	۰/۲۷	α -terpineole	۱۷
۱۷۲۸	۱۷۲۷	۰/۶۴	۱۱/۵	(-)-borneole	۱۸
۱۸۸۳	۱۸۷۷	۰/۴۸	۰/۱۱	geraniol	۱۹

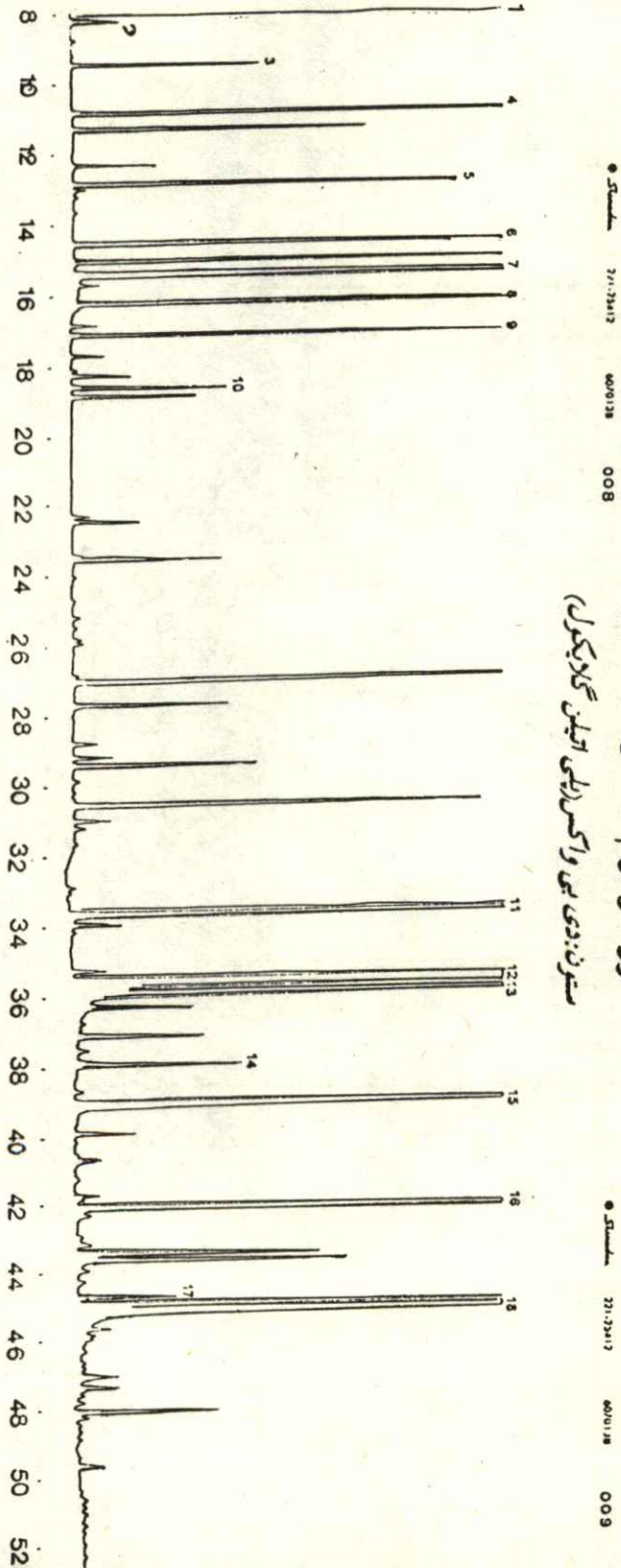
جدول شماره (۴) ترکیبهای شناسایی شده در اسانسهای لاواند ایران و لاواند فرانسه

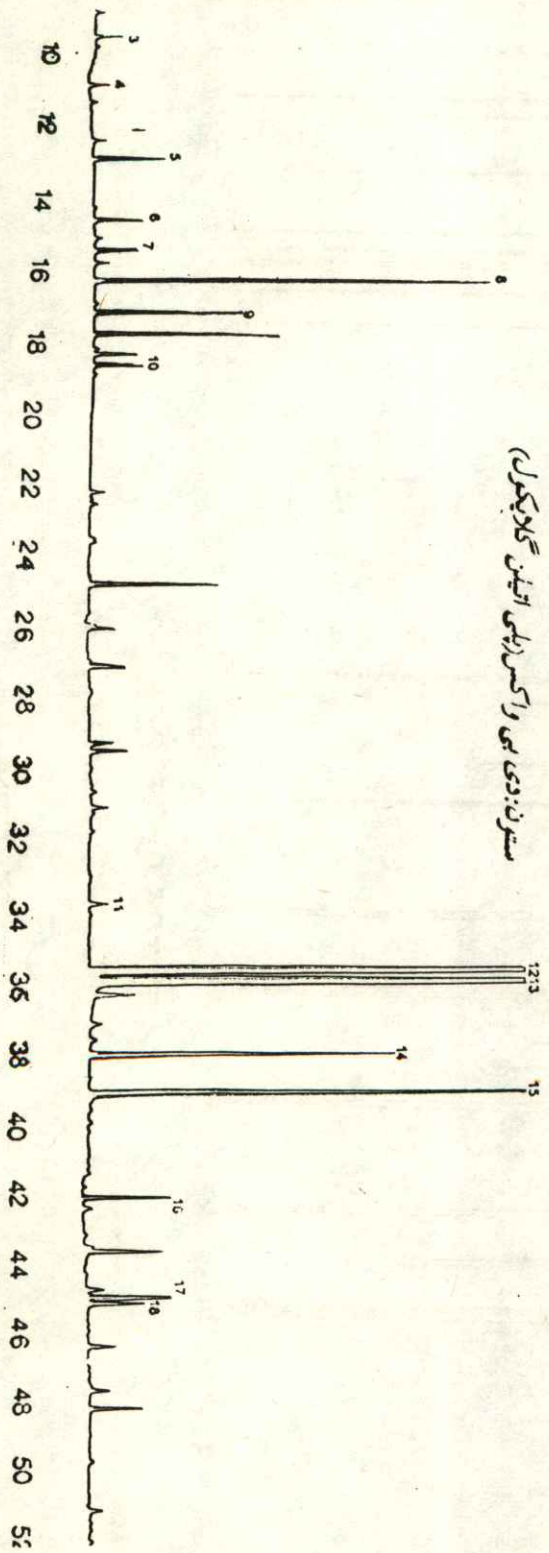
ستون مورد استفاده DB-1 (Dimethylsiloxane, 100% Methyl)

عدد کواتر		نام ترکیب	شماره پیک
محاسبه شده	تجربی		
۹۳۰	۹۲۸	α -thujene	۱
۹۴۳	۹۳۶	α -pinene	۲
۹۵۲	۹۵۰	camphene	۳
۹۷۹	۹۸۱	β -pinene	۴
۹۸۷	۹۸۴	myrcene	۵
۱۰۱۸	۱۰۱۴	p-cymene	۶
۱۰۲۸	۱۰۲۵	1,8-cineole	۷
۱۰۳۰	۱۰۲۹	limonene	۸
۱۰۳۰	۱۰۳۹	cis- β -ocimene	۹
۱۰۴۴	۱۰۵۲	(E)- β -ocimene	۱۰
۱۰۹۲	۱۰۸۹	linalool	۱۱
۱۱۲۶	۱۱۲۳	camphor	۱۲
۱۱۵۵	۱۱۵۴	(-)-borneole	۱۳
۱۱۶۲	۱۱۶۴	terpinene-4-ol	۱۴
۱۱۷۳	۱۱۷۳	α -terpineole	۱۵
۱۲۳۷	۱۲۳۸	geraniol	۱۶
۱۲۴۶	۱۲۴۵	Linalyl acetate	۱۷
۱۴۱۴	۱۴۱۴	β -caryophyllene	۱۸
۱۴۵۰	۱۴۴۸	α -Humulene	۱۹

شکل شماره (۲)

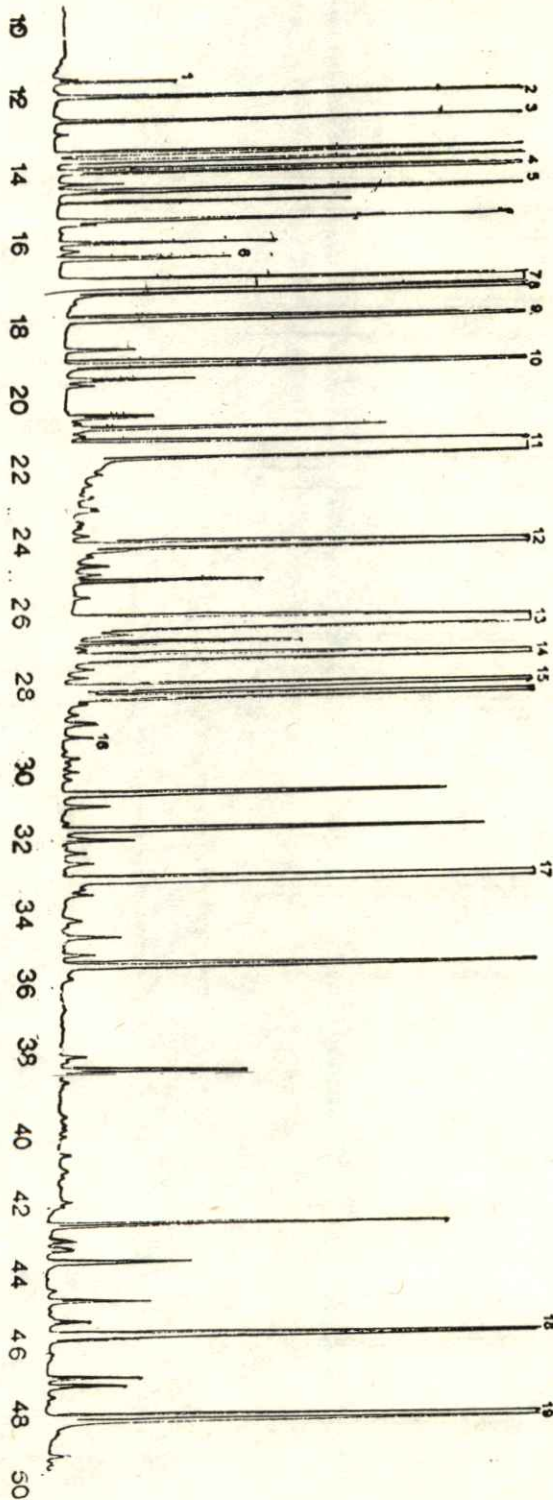
کروماتوگرام اسانس لاوراند ایران
سترن: دی بی واکس (بلی اتیل گلابیکول)





شکل شماره ۳
 کروماتوگرام اسانس لاواند فرانسه
 ستون: دی بی واکس (بلی اتیلن گلاکول)

711.74x13 4000138 0.06



● تستک

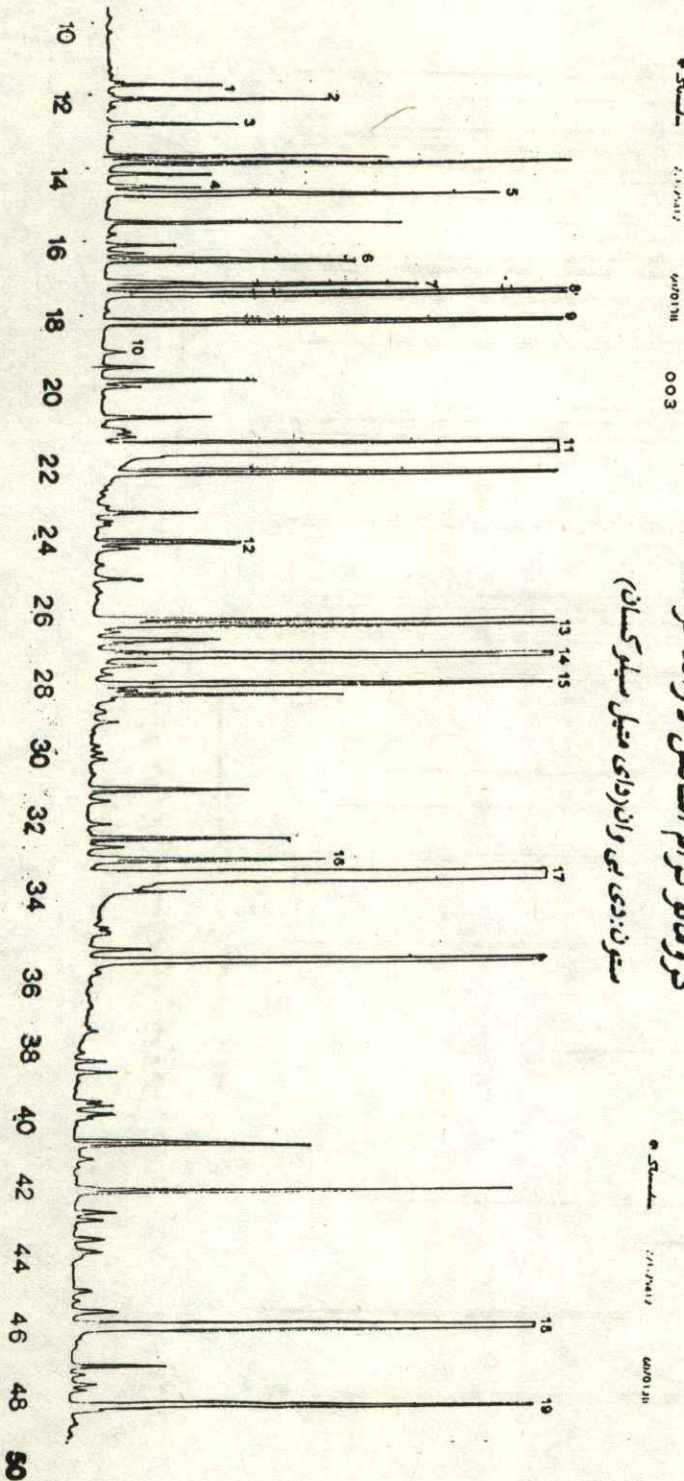
371.05417

6000138

001

● تستک

قطعه سفید رنگ (۲۴)
کروماتوگرام اسانس لاونده ایران
سنون: دی بی وانرای متیل سیلوکسان



شکل شماره ۵ (ه)

کروماتوگرام اسانس لاواند فرانسه
سنگسنگ: دی بی وان (دای بیل سلوکسان)

Essential oil composition of two *lavandula* species from Iran
and France by Capillary Gas Chromatography method

Mohammad mehdi Barazandeh

*Faculty member of Research Institute of Forests & Rangelands,
Medicinal Plants Department*

Abstract

Essential oil composition of two species of *lavandula* which are very important from the point of therapeutic view were compared.

The first one is *lavandula vera* L. from France and the second one is *lavandula spica* L. which had been brought from Europe and cultured in the National Botanical Garden of Iran about 20 years ago.

This work showed us the reason of worldwide fame of French species and also the specific role of CGC (Capillary Gas Chromatography) as a powerful method in essential oil analysis.