استخراج و تعیین مقدار کلروژنیک اسید با استفاده از روش نوین میکرواستخراج فاز جامد در گیاه دارویی سرخارگل *Echinacea purpurea* (L.) Moench.

مازیار احمدی گلسفیدی*[1]، زرین اسحاقی[2]، الهام تازیکه[3]

[1و3] استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان، ایران

[2] دانشیار گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور مرکز مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/٤/۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/٦/۱۷

چکیده

این تحقیق مبتنی بر توسعه و به‌کارگیری یکی از تکنیک‌های نوین استخراجی در نمونه عصاره گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.) جمع‌آوری شده از مزرعه تحقیقاتی شرکت داروسازی گیاه اسانس واقع در ضلع شرقی گرگان جهت تعیین مقدار ترکیبات فنولی آن صورت گرفته است. یک جاذب کامپوزیتی براساس میکرو استخراج فاز جامد و با استفاده از تکنیک سل-ژل تهیه شد. این کامپوزیت به صورت کاملاً یکنواخت به درون فیبر توخالی پلی پروپیلنی تزریق شد. سرانجام این وسیله برای استخراج انتخابی کلروژنیک اسید به‌عنوان ترکیب فنولی در عصاره گیاه سرخارگل به‌کار گرفته شد. سپس توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مقادیر ترکیبات نام برده در عصاره مورد نظر اندازه‌گیری شدند. عوامل اصلی و مؤثر بر سنتز این کامپوزیت و نیز عوامل مؤثر بر فرآیند میکرواستخراج مورد بررسی و بهینه‌سازی قرار گرفتند. حد تشخیص با این تکنیک به ۰/۰۸ نانوگرم بر میلی‌لیتر رسید. محدود خطی و انحراف استاندارد نسبی به‌ترتیب ۰/۲-۱۰۰۰ نانو گرم بر میلی لیتر و ۰/۳۸ (n=۳) درصد بودند. متوسط بازیافت نسبی پس از وارد کردن آنالیت به نمونه در چهار سطح غلظتی بین ۸٤/۸ الی ۹۷/۲ درصد بود. این روش به عنوان یک روش جدید برای اندازه گیری مقادیر انواع ترکیبات فنولی از جمله کلروژنیک اسید در گیاه مذکور و همچنین در سایر گیاهان پیشنهاد گردید.

واژگان کلیدی: سرخارگل، سل-ژل، کلروژنیک اسید، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، میکرو استخراج فاز جامد

*مسئول مکاتبه: ahmadi.golsefidi@iran.ir

مقدمه

یکی از گیاهانی که اثر آن به عنوان تعدیل کننده و تقویت کننده سیستم بدن به‌طور مسلم و قطعی به اثبات رسیده است گیاه دارویی اکیناسه (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.) است که بومی آمریکا بوده و در ایران با نام سرخارگل شناخته می‌شود.

اکیناسه گیاهی علفی و چند ساله متعلق به تیره کاسنی می باشد که ارتفاع آن حداکثر به ۱ تا ۱/۵ متر می‌رسد. برگ‌های پایین ساقه تخم مرغی تا نیزه ای شکل هستند که حداکثر ۳۰ سانتی متر طول و ۲۰ سانتی‌متر عرض دارند. ساقه از انشعابات فراوانی برخوردار بوده و دارای پرزهای زبر و خشن است. گلها معمولاً به رنگ ارغوانی، صورتی، قرمز ارغوانی، زرد و نارنجی دیده می‌شوند و دیسک مرکز آنها (گلهای لوله‌ای) سبز تیره، قهوه‌ای تیره و سیاهرنگ می‌باشد. این گیاه برای اولین بار در سال ۱۳۷۲ توسط دکتر رضا امیدبیگی به ایران آورده شد و توسط آقای دکتر سید محمد فخر طباطبایی به نام سرخارگل نامگذاری گردید (Lee et al., 2006). مستندات علمی متعددی مبنی بر اثر بخشی قسمت‌های مختلف این گیاه به‌عنوان ضد باکتری، ضد ویروس، ضد التهاب، تعدیل‌کننده و تقویت‌کننده سیستم ایمنی، ترمیم‌کننده زخم، ضدنئوپلاستیک و ضدعفونی‌کننده در دسترس است. ویژگی‌های مذکور عمدتاً به‌وجود آلکامیدها، گلیکو پروتئین‌ها، مشتقات کافئیک اسید (کلروژنیک اسید، چیکوریک اسید و...) و پلی‌ساکاریدها در گیاه مربوط می‌شوند (تقی‌زاده و همکاران، ۱۳۸۱).

ترکیبات فنیل پروپنوئید متعلق به گروه متفاوتی از ترکیبات آلی هستند که توسط گیاهانی مانند سرخارگل از اسید آمینه فنیل‌آلانین سنتز می‌شوند. نام آنها از گروه آروماتیکی شش کربنه (فنیل) و همچنین گروه سه کربنه دنباله سینامیک اسید (پروپن) مشتق شده است. کلروژنیک اسید یک هیدروکسی سینامیک اسید بوده و گروهی از ترکیبات آلی طبیعی می‌باشد که در واقع استر پلی‌فنولی کافئیک اسید و سیکلیتول-(-)-کوئینیک اسید هستند (Clifford et al., 2003). کلروژنیک اسید یک ماده حدواسط مهم جهت بیوسنتز (Boerjan et al., 2003) در برخی گیاهان مانند سرخارگل بوده و به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان و ترکیبی که موجب کاهش رهاسازی گلوکز در جریان خون بعد از غذا می‌شود نیز شناخته شده است (Kweon et al., 2001; Johnston et al., 2003).

همچنین گزارش‌های علمی حاکی از آن است که کلروژنیک اسید و کافئیک اسید آنتی‌اکسیدان‌هایی هستند که در تحقیقات آزمایشگاهی منجر به پیشگیری دیابت نوع دوم (Paynter et al., 2006) و بیماری‌های قلبی و عروقی (Morton et al., 2000) شده‌اند. از خواص جالب توجه دیگر این ترکیب خاصیت ضد ویروسی (Jassim and Naji, 2003)، ضد باکتری (Sotillo et al., 1998) و ضد قارچی (Bowels and Miller, 1994) با اثرات سمیت بسیار کم (Gould et al., 2000; Olthof et al., 2001) و بدون عوارض جانبی (Chunget al., 2004; Orban et al., 2000) می‌باشد که در عین حال به مقاومت ضد میکروبی نیز منجر نمی‌شود (Neradil et al., 2003).

میکرو استخراج فاز جامد یا SPME یک فن‌آوری بسیار ساده استخراج است که در مقیاس کوچک اجرا می‌شود. این روش به وسیله پالیشین معرفی شد (Zhang et al., 1994). در این روش از یک فیبر استخراج کننده جهت انتقال آنالیت به فاز مورد نظر استفاده می‌گردد. با توجه به مقیاس کوچک استخراج توسط این روش، مزایایی از جمله کاهش مصرف حلال آلی و افزایش حساسیت و صحت

اندازه‌گیری است. و از معایب این روش می‌توان به موارد زیر اشاره نمود: قیمت فیبرهای مورد استفاده در SPME بالا است، فیبرهای SPME شکننده و ظریف‌اند، تعداد پوشش‌های مورد استفاده در SPME محدود هستند، مولکول‌های با وزن مولکولی بالا ممکن است در سطح فیبر جذب شوند و اثرات آزمایش قبل بر روی آزمایشات بعدی وجود دارد (Jiang et al., 2005). لذا اخیرا در برخی موارد ترجیح داده می‌شود از روش اصلاحی آن با عنوان میکرو استخراج فاز جامد بر پایه فیبر توخالی که اولین بار توسط زرین اسحاقی و مازیار احمدی گلسفیدی (۲۰۱۰) معرفی گردید، استفاده شود. بهینه‌سازی فیبرهای بکار رفته جهت این نوع استخراج و کاربرد آن در اندازه‌گیری ترکیبات فنولی عصاره گیاه سرخارگل از اهداف اصلی این تحقیق می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تجهیزات و مواد شیمیایی

دستگاه مورد استفاده برای جداسازی و شناسایی ترکیب مورد بررسی، دستگاه HPLC مدل 2601 متعلق به شرکت آلمانی Knauer بود. سیستم این دستگاه تک پمپی و مدل K1001 بوده که هرکدام قادرند ترکیب درصد مشخصی از حلال را با حداکثر توان ۱۰ میلی‌لیتر بر دقیقه به ستون ارائه دهند. همچنین دستگاه مجهز به آشکارساز فرابنفش مدل K2600 می‌باشد. بخش تزریق شامل یک لوپ با گنجایش۲۰ میکرولیتر است. دستگاه مذکور، دارای سیستم گاز زدایی مدل K5000 از همان شرکت مذکور است که برای حذف گازهای حل شده در حلال‌های فاز متحرک می‌باشد. همچنین سیستم مجهز به کامپیوتر با برنامه نرم‌افزاری EZ chrom Elite با قابلیت انتگرال گیری می‌باشد.

از یک ستون فاز معکوس C18 (Perfectcil) با قطر داخلی ٤/٦ میلی‌متر و طول ۲۵۰ میلی‌متر (با احتساب پیش ستون) متعلق به شرکت Knauer برای فرآیند جداسازی استفاده گردیده است. فاز متحرک شامل ارتوفسفریک اسید ۰/۱٪: متانول با نسبت ۸۰ : ۲۰ به‌صورت شویش تک توانی و به‌مدت ۲۰ دقیقه بود. فاز متحرک قبل از استفاده توسط سیستم تصفیه میلی پور با فیلتر ۰/٤٥ میکرومتری از جنس نایلون صاف شده بود. سرعت جریان فاز متحرک روی ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم شد و طول موج آشکارسازی ۲۵۸ نانومتر برای مدت زمان شویش ۲۰ دقیقه انتخاب گردید.

واکنش‌گرها، حلال‌ها و مواد شیمیایی مورد نیاز عبارت بودند از: کلروژنیک اسید، ترا اتیل ارتوسیلیکات (TEOS)، استونیتریل (درجه خلوص HPLC)، متانول (درجه خلوصHPLC)، اتانول، آب بدون یون (درجه خلوص HPLC) و استون تهیه شده از شرکت مرک آلمان، سدیم کلرید، هیدروکلریدریک اسید، نیتریک اسید، سولفوریک اسید، سدیم هیپوکلریت، تریتون x-100 از شرکت سیگما-آلدریچ. همچنین محلول‌های لازم به‌صورت روزانه تهیه و استفاده می‌شد.

غشاء پلی پروپیلنی فیبر توخالی دارای مشخصه Q3/2 Accurel PP و با ضخامت جداره ۲۰۰ میکرومتر و قطر داخلی ۰/٦ میلی‌متر و حفرات با سایز متوسط ۰/۲ میکرومتر از شرکت ممبرانا آلمان خریداری شد.

مراحل تهیه غشاء HF-SPME، استخراج و واشویی

به‌منظور تهیه غشاء مذکور، از فرایند سل-ژل استفاده گردید. مقدار ۵/۳۵ میلی لیتر از TEOS به همان حجم اتانول خالص افزوده شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه توسط همزن مغناطیسی مخلوط گردید. سپس به مقدار

۱/۹٦ میلی‌لیتر HCl ۱۲٪ حجمی–حجمی به مخلوط فوق اضافه شد. پس از ۲۰ دقیقه همزدن ۰/٦ میلی‌لیتر از سورفاکتنت غیریونی تریتون x-100 به محلول بدست آمده افزوده شد.

فیبرهای توخالی پلی پروپیلنی به اندازه‌های ۲/۵ سانتی‌متری بریده شده و توسط استون شستشوداده و خشک گردیدند. از محلول سل بدست آمده فوق (قبل از تشکیل ژل) مقدار ۱۲ میکرولیتر توسط میکروسرنگ به آرامی درون هر یک از فیبرهای توخالی تزریق شدند و دو سر انتهایی آنها توسط بست‌های فلزی مسدود گشتند. فیبرهای حاصله جهت تشکیل شبکه‌های ژل به‌صورت درجا، در دمای آزمایشگاه و درون یک ظرف شیشه‌ای درب باز، به‌مدت ۲٤ ساعت قرار گرفتند. فیبرهای حاصله پس از مراحل تشکیل ژل در آنها و خشک شدن در دمای اتاق، به‌عنوان جاذب در میکرو استخراج مورد استفاده قرار گرفتند.

سپس فیبرهای حاصله در ویال مخصوص حاوی عصاره آبی گیاه سرخارگل قرار داده شدند و با سرعت ۸۰۰ دور بر دقیقه توسط همزن مغناطیسی به‌مدت ۲۵ دقیقه تحت میکرو استخراج قرار گرفتند تا کلروژنیک اسید استخراج شود. همین کار برای میکرواستخراج کلروژنیک از محلولهای استاندارد آن انجام گرفت.

پس از عمل میکرو استخراج، با یک پنس و به آرامی فیبر از محلول نمونه جدا شده و به منظور واشویی آنالیت، توسط ٤۰۰ میکرولیتر حلال متانول در یک ویال کوچک شویش گردید. مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول واجذب به درون دستگاه HPLC تزریق گردید. پس از اتمام مرحله کروماتوگرافی، کروماتوگرام‌های حاصله جهت شناسایی کیفی و کمی آنالیت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

به‌منظور افزایش بهره میکرو استخراج و بالا بردن فاکتور پیش تغلیظ برخی از عوامل مؤثر بر این کار در مراحل انجام استخراج مورد بررسی و بهینه‌سازی قرار گرفت. کلیه مراحل بهینه سازی در محلول‌های آبی ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از آنالیت انجام شد. برای بررسی نتایج نیز سطح زیر پیک مربوط به آنالیت که نماینده تعداد مول‌های استخراج شده از آن است، در قبل از میکرواستخراج و پس از آن محاسبه و مقایسه شدند.

بررسی اثر حجم فازدهنده بر استخراج کلروژنیک اسید

در اینجا مقادیر بازیافت برای آنالیت موردنظر با تغییر دادن حجم فاز دهنده، (با توجه به ثابت بودن حجم فاز گیرنده) را به‌صورت تجربی بدست آوردیم.

لذا با توجه به مقایسه نسبت سطح زیر پیک کروماتوگرام آنالیت‌ها پس از میکرو استخراج به سطح زیر پیک آنها قبل از میکرواستخراج، می‌توان فاکتور پیش تغلیظ (CF) را محاسبه نمود. بنابراین حجم فازدهنده بین ۲ تا ۲۰ میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفت و در این حالت حجم فاز گیرنده ثابت باقی ماند. همان‌گونه که در شکل (۱) نشان داده شده است ۱۰ میلی‌لیتر از فاز دهنده بهترین حجم برای ادامه کار در مورد متا-نیترو آنیلین بدست آمد.

بررسی اثر زمان بر استخراج کلروژنیک اسید

با تغییر زمان استخراج از ۳۵-۲ دقیقه برای کلروژنیک اسید به‌عنوان آنالیت، زمان استخراج بررسی شد. بهره استخراج تا ۲۵ دقیقه افزایش می‌یابد و در زمان‌های بالاتر تغییر قابل توجهی در سطح زیر پیک مشاهده نمی‌شود. به همین دلیل در سایر آزمایشات نیز زمان ۲۵ دقیقه به‌عنوان زمان بهینه استخراج انتخاب شد.

بررسی اثر سرعت هم زدن بر استخراج کلروژنیک اسید

در شکل (۲) اثر سرعت همزن مشاهده می‌شود. کارایی استخراج با افزایش سرعت همزن تا ۸۰۰rpm افزایش و بعد از آن به‌دلیل ناپایداری فیبر در اثر برخورد با جداره‌های ویال و همچنین تشکیل حباب‌های هوا در اطراف فیبر که مانع انتقال جرم آنالیت‌ها به فاز گیرنده می‌گردد، سطح زیر پیک کاهش می‌یابد. در ادامه کارهای بعدی از دور ۸۰۰rpm جهت انجام میکرو استخراج استفاده شد.

اثر pH فازدهنده بر استخراج کلروژنیک اسید

این حقیقت که pH فاز دهنده باید طوری تنظیم گردد تا آنالیت‌ها به‌صورت مولکولی بتوانند تحت عملیات میکرواستخراج قرار گیرند مورد تأئید محافل علمی می‌باشد. به این معنی که برای کلروژنیک اسید ٤/٢ (شکل ۳) به‌عنوان بهترین pH بدست آمد.

اثر حضور سورفکتنت بر استخراج کلروژنیک اسید

در این پروژه از **سورفکتنت** XTriton-۱۰۰ که یک سورفکتنت غیریونی است، استفاده گردید و با توجه به غلظت بحرانی مایسلی، از محلول‌هایی با غلظت ثابت نسبت به **سورفکتنت** و کمتر از غلظت بحرانی مایسلی (C.M.C) آن جهت استخراج استفاده گردید و نتایج با آزمایشاتی که در آن‌ها از **سورفکتنت** استفاده نشده بود، مقایسه گردید. در خلال این آزمون‌ها سایر فاکتورهای مؤثر بر استخراج ثابت بوده‌اند. در حضور سورفکتنت میزان استخراج کاهش یافته و راندمان استخراج دستخوش کاهش می‌گردد.

اثر افزایش نمک (قدرت یونی) بر فرآیند میکرواستخراج

در این تحقیق از نمک سدیم کلرید برای بررسی اثر نمک و یا در واقع تغییر قدرت یونی محیط در غلظت‌های (W/V) ۰ تا ۵ درصد استفاده شد.

حضور نمک تا غلظت ۱ درصد در این استخراج باعث کاهش جزیی راندمان استخراج شده است (Salting-in). اما افزایش بیشتر نمک در غلظت‌های ۲ درصد و بالاتر با اندکی افزایش مقدار ثابتی باقی مانده است.

طبق نتایج، برای انالیت مورد نظر در این تحقیق افزایش نمک تأثیر چندانی بر راندمان استخراج نداشته است لذا در ادامه آزمایشات از نمک استفاده نگردید.

بحث

بر اساس تحقیقات انجام شده در کار میکرواستخراج با فیبر توخالی (Sarafraz Yazdi and Eshaghi, 2005)، مناسب‌ترین طول انتخاب شده فیبر توخالی جهت انجام کار میکرواستخراج ۲/۵ سانتی‌متر بوده است. لذا طول استاندارد برای انجام این بخش از تحقیقات نیز همانند گذشته انتخاب شد و بنابراین حجم فاز گیرنده در کلیه بهینه‌سازی‌ها ثابت در نظر گرفته شد زیرا آنچه که اهمیت دارد این است که نسبت حجم فازدهنده به گیرنده باید بهینه گردد. لذا در این تحقیق بهینه‌سازی حجم فازدهنده آبی مورد استفاده را بررسی کردیم با توجه به این مطلب که حجم فاز گیرنده موجود در غشاء فیبر (یا به عبارتی طول فیبر) ثابت است. با افزایش حجم فازدهنده، فاکتور تغلیظ و بهره استخراج تا حد معینی افزایش می‌یابد. اما در حجم ۱۰ میلی‌لیتر بیشترین بهره استخراج حاصل شد. علت کاهش بهره استخراج در حجم‌های کمتر از ۱۰ میلی‌لیتر بدین گونه ارزیابی می‌شود که به‌دلیل کم بدون غلظت آنالیت در این حجم حساسیت روش کاهش یافته و لذا عدم صحت و تکرارپذیری نتایج حاصل شده است.

در حجم‌های زیادتر فازدهنده انتقال آنالیت به داخل فاز گیرنده کند می‌شود زیرا همزدن نمونه تاثیر کمتری از خود نشان می‌دهد در نتیجه ضخامت لایه نرنستی اطراف فیبر افزایش یافته و سینتیک انتقال جرم کند می‌شود. لذا ۱۰ میلی‌لیتر به‌عنوان حجم بهینه فاز آبی اولیه در نظر گرفته شد و در مورد استخراج سایر نمونه‌های استاندارد و حقیقی نیز از همین حجم فاز دهنده استفاده گردید.

میکرواستخراج فاز جامد یک روش تعادلی است و رابطه مستقیم بین مقدار آنالیت استخراج شده با زمان استخراج دارد. در این روش‌ها، انتقال جرم بین فاز دهنده و پذیرنده به زمان وابسته است. برای داشتن یک استخراج دقیق زمان کافی جزو ضروریات است .گرچه بدیهی است که حداکثر حساسیت در شرایطی بدست می آید که به یک تعادل کامل دست یافته باشیم، ولی از طرف دیگر برای یک آنالیز دقیق و صحیح رسیدن به تعادل تنها شرط لازم نیست به خصوص که زمان استخراج باید با دستگاه مورد استفاده برای آنالیز نتایج همخوانی داشته باشد.

در انواع روش‌های میکرواستخراج از جمله میکرواستخراج فاز جامد همزدن محلول راندمان را افزایش می‌دهد و سرعت همزدن تأثیری مستقیم بر روی انتقال جرم دارد. همزدن محلول منجر به افزایش کارایی استخراج و کاهش زمان تعادل ترمودینامیکی سیستم می‌گردد و در نهایت منجر به افزایش نفوذ آنالیت از فاز دهنده به‌داخل لایه حد فاصل بین و فازدهنده- فیبرپلی پروپیلن حامل فاز گیرنده و در پی آن به‌داخل فاز گیرنده شده و راندمان استخراج بالا می‌رود.

pHهای متفاوتی از فاز دهنده تهیه شد و محلول‌ها مورد بررسی از نظر کارایی استخراج قرار گرفتند. نتایج بررسی‌ها نشان دادند که بهترین شرایط استخراجی از نظر pH فازدهنده برای آنالیت مورد نظر با مقادیر pKa آن مطابقت دارد

در خصوص اثر سورفکتنت در واقع انتظار می‌رفت که افزایش آن به محلول فاز دهنده، به‌دلیل

کاهش کشش سطحی در حد فاصل بین دو فاز، انتقال ملکول‌های آنالیت به فاز اکتانول – نانولوله کربنی را بهبود بخشد و فقط با افزایش غلظت **سورفکتنت** در فاز دهنده به مقادیر بیش از غلظت بحرانی مایسلی آن و تشکیل مایسل، بخشی از ملکول‌های آنالیت درون حفره مایسلی نفود کرده و بر هم کنش قوی‌تری بین مایسل و آنالیت به‌وقوع بپیوندد که باعث ماندگاری ملکول در فازدهنده و عدم انتقال آن به فاز آلی گردد. ولی مشاهده گردید که از همان ابتدای افزایش سورفاکتنت بهره استخراج به آهستگی روند کاهشی نشان داد. احتمال می‌رود علت این کاهش ، افزایش نسبی ویکسوزیته فاز دهنده است که از استخراج آنالیت جلوگیری می‌نماید. لذا در مراحل بعدی از سورفاکتانت برای استخراج این آنالیت استفاده نگردید.

به‌طور معمول اثر مثبت افزایش نمک که منجر به افزایش راندمان استخراج می‌شود، در این گونه فرآیندها مشاهده می‌گردد، به این صورت که با افزایش نمک‌هایی مثل NaCl و یا KCl به محیط، یون‌های نمک مولکول‌های آب را درگیر کرده و متعاقباً یون‌های آنالیت که کاملاً آبپوشی شده‌اند تا حدی آزاد شده و به راحتی به درون فاز آلی منتقل می‌شوند. به‌عبارت دیگر نمک باعث کاهش حلالیت آنالیت در فاز آبی می‌شود.

علاوه بر اثر ذکر شده، نمک می‌تواند به گونه‌ای دیگر نیز در استخراج تأثیر داشته باشد که به اثر کاهشی نمک معروف است. این اثر برخلاف اثر اول، باعث کاهش راندمان استخراج در حضور نمک می‌گردد. در واقع ضریب فعالیت گونه‌های یونی در آب با افزایش قدرت یونی نمونه کاهش می‌یابد. از این‌رو تبدیل آنالیت‌ها به شکل خنثی مهم می‌باشد. علت، مربوط به تغییر خواص لایه نفوذی نرنست است که این امر سبب کاهش سرعت نفوذ آنالیت به داخل فاز آلی می‌شود و راندمان استخراج را کاهش می‌دهد. به این صورت که یون‌های نمک در مرز بین فاز آبی و آلی به شکل سدی قرار می‌گیرند که مانع از عبور آنالیت از فاز آبی به آلی می‌شوند.

این اثر کاهشی نمک بر روی استخراج را می‌توان به‌صورت‌های دیگر نیز توجیه کرد؛ یکی این که بخش قطبی آنالیت می‌تواند در اندرکنش الکترواستاتیک با یون‌های نمک موجود در محلول شرکت کنند و این امر باعث کاهش انتقال آن‌ها به فاز آلی استخراج کننده می‌شود و دیگر اینکه با افزایش غلظت نمک ویسکوزیته توده محلول افزایش می‌یابد و باعث کاهش سرعت نفوذ آنالیت‌ها از توده محلول به فاز آلی خواهد شد. به‌طورکلی جدول (۱) شرایط عمل را برای میکرو استخراج و استخراج معکوس با این روش جدید نشان می‌دهد.

ملاحظات کمی و کاربردهای تجزیه‌ای روش نوین HF-SMPE

جدول (۲) ارقام شایستگی روش و کمیت‌های اندازه‌گیری شده برای آنالیت کلروژنیک اسید، جهت ارزش گذاری روش جدید میکرواستخراجی را نشان می‌دهد. دامنه خطی وسیع غلظتی، حد تشخیص پایین، انحراف استاندارد نسبی کم و فاکتور پیش تغلیظ بالا از ویژگی‌های این تکنیک جدید است. کلیه مقادیر بدست آمده از مقایسه سطوح زیر پیک کروماتوگرام‌های HPLC حاصل شده است. منحنی کالیبراسیون و معادله خط حاصله از کاربرد روش مذکور برای استخراج و اندازه‌گیری کلروژنیک اسید به‌صورت زیر بدست آمد.

$$y = 0.0678x - 0.028 \quad R^2 = 0.9975$$

کاربرد روش برای گیاه دارویی اکیناسه

همانطور که در ضرورت طرح مسئله در مقدمه این تحقیق گفته شده است، نمونه حقیقی مورد استفاده برای اندازه‌گیری کلروژنیک اسید یک عصاره

هیدروالکلی از گیاه دارویی اکیناسه پوررپوراً می‌باشد. اهمیت دارویی این گیاه به تفصیل در فصل اول توضیح داده شده است و اینکه کلروژنیک اسید از جمله ترکیبات آنتی‌اکسیدان و ضدسرطان بوده و تعیین مقادیر ناچیز آن در انواع عصاره‌ها و سایر فرآورده‌های دارویی حاصل از این گیاه از دغدغه‌های صنایع دارویی می‌باشد. داروی مورد استفاده برای اندازه‌گیری میزان کلروژنیک اسید در آن به نام ایمونوساپورت محصول تولیدی شرکت داروسازی گیاه اسانس بوده است. مقدار این ماده طبق محاسبات غلظت بر اساس منحنی کالیبراسیون ۰/۵۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر عصاره بدست آمد. با توجه به نحوه تولید عصاره دارویی و میزان گیاه خشک بکار رفته در این محصول، مقدار کلروژنیک اسید در گیاه خشک ۰/۰۳۰٤ درصد وزنی-وزنی بدست آمد.

همانگونه که در کروماتوگرام‌های مربوطه مشخص است، میزان سطح زیر پیک پس از استخراج به روش مذکور به مقدار قابل توجهی افزایش یافته است و این دال بر کاربرد رضایت بخش این تکنیک برای اندازه‌گیری کلروژنیک در نمونه‌های دارای مقادیر بسیار ناچیز می‌تواند باشد. عدم تاثیر ماتریکس نمونه بر روش با افزایش مقادیر مشخصی از استاندارد آنالیت به نمونه حقیقی و تعیین فاکتور بازیابی نسبی تأیید شد (جدول ۳). همچنین نشان داده شد که مقادیر بدست آمده از کلروژنیک اسید در نمونه داروی گیاهی اکیناسه در محدوده غلظتی بدست آمده از سایر تحقیقات (Pellati et al., 2005; Percival, 2000) قرار دارد.

نتیجه‌گیری نهایی

از مهمترین دلایل گسترش کاربرد روش استخراج فاز جامد بر پایه فیبر توخالی در سال‌های اخیر گزینش پذیری بالای آنها نسبت به آنالیت و نیز پایداری مکانیکی و حرارتی و مقاومت در برابر تغییرات pH می‌باشد. با توجه به اینکه در این تحقیق فیبر میکرواستخراجی مربوط به کلروژنیک اسید برای اولین بار تهیه شده است لذا انتظار می‌رود به‌کارگیری آن در ساخت غشاء جاذب بر پایه فیبر توخالی فاکتورهای استخراجی روش را به میزان قابل توجهی افزایش دهد که نتیاج مثبت آن در بخش قبلی ارائه گردید. مزایای عمده این تکنیک را می‌توان به‌صورت زیر خلاصه نمود:

۱- برخورداری از زمان کوتاه انجام آزمایش، کاربرد گسترده برای انواع آنالیت‌های آلی و معدنی و بهره تغلیظ بالا.

۲- روشی است ساده جهت آماده‌سازی نمونه.

۳- در مقایسه با سایر روش‌های میکرواستخراج بهترین روش جداسازی برای خالص سازی نمونه‌های آلوده می‌باشد.

٤- روشی بسیار سریع، که نیاز به ابزارهایی ساده دارد و مقرون به صرفه است.

۵- به لحاظ آسیب‌های زیست‌محیطی به‌علت حجم مواد مصرفی بسیار اندک جزو روش‌های زیست سازگار محسوب می‌شود.

٦- هر غشاء پلی پروپیلنی شامل سل-ژل را یک بار مورد استفاده قرار می‌دهیم که در نتیجه احتمال انتقال آلودگی آزمایشات قبلی و اثرات حافظه ای به صفر می‌رسد؛ به خصوص در مورد نمونه‌های حقیقی که از بافت آلوده‌ای برخوردارند بهترین شیوه استخراج است که گویای ارجحیت این روش به سایر روش‌های میکرواستخراج می‌باشد.

۷- گستردگی محدوده خطی در غلظت‌های کم آنالیت.

۸- تکرارپذیری خوب روش که سبب کاهش انحراف استاندارد روش می‌شود.

۹- برخلاف روش‌های استخراج سنتی، روش فوق روشی مبتنی بر عدم استفاده از حلال‌های آلی گران قیمت و سمی است.

تشکر و سپاس

نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند از همکاری مسئولین و پرسنل آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی گرگان بابت انجام این طرح تحقیقاتی مراتب تشکر را داشته باشند. همچنین از شرکت داروسازی گیاه اسانس به‌دلیل در اختیار قرار دادن مواد اولیه و تجهیزات دستگاهی جهت بهبود انجام این تحقیق کمال قدردانی و سپاس را دارند.

منابع

۱. تقی‌زاده، م.، جاروندی، ص. و یاسا، ن. ۱۳۸۱. مروری بر گیاه اکیناسه. فصلنامه گیاهان دارویی. جلد ۱. شماره ٤. صفحات ۲۵- ۱۳.

2. Boerjan, W., Ralph, J. and Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. Annual Review of Plant Biology, 54:519-546.

3. Bowels, B.L., and Miller, A.J., 1994. Caffeic Acid Activity Against *Clostridium botulinum* Spores. Journal of Food Science, 59(4):905-908.

4. Chung, T.W., Moon, S.K., Chang, Y.C., Ko, J.H., Lee, Y.C., Cho, G., Kim, S.H., Kim, J.G., and Kim, C.H., 2004. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. The faseb journal, 18(14):1670-1781.

5. Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S. and Kuhnert, N., 2003. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 51(10):2900-2911.

6. Gould, K.S., Markham, K.R., Smith, R.H., and Goris, J.J. 2000. Functional role of anthocyanins in the leaves of *Quintinia serrata* A. Cunn. Journal of Experimental Botany , 51(347):1107-1115.

7. Jassim, S.A. and Naji, M.A. 2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. Journal of Applied Microbiology, 95(3):412-427.

8. Jiang, X., Basheer, C., Zhang, J., and Lee, H.K., 2005. Dynamic hollow fiber-supported headspace liquid-phase microextraction. Journal of Chromatography A, 1087(1-2):289-294.

9. Johnston, K.L., Clifford, M.N. and Morgan, L.M., 2003. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. American Journal of Clinical Nutrition, 78(4):728-733.

10. Kweon, M.H., Hwang, H.J. and Sung, H.C., 2001. Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49(10):4646-4655.

11. Lee, W.J., and Zhu, B.T., 2006. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. Carcinogenesis, 27(2):269-277.

12. Morton, L.W., Abu-Amsha Caccetta, R., Puddey, I.B. and Croft, K.D., 2000. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 27(3):152-159.

13. Neradil, J., Veselská, R., and Slanina, J., 2003. UVC-protective effect of caffeic acid on normal and transformed human skin cells in vitro. Folia Biologica (Praha), 49(5):197-202.

14. Olthof, M.R., Hollman, P.C., and Katan, M.B., 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid areabsorbed in humans. Journal of Nutrition, 131(1):66-71.

15. Orban, Z., Mitsiades, N., Burke, T.R. Jr, Tsokos, M., and Chrousos, G.P., 2000. Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation. Neuroimmunomodulation, 7(2):99-105.

16. Paynter, N.P., Yeh, H.C., Voutilainen, S., Schmidt, M.I., Heiss, G., Folsom, A.R., Brancati, F.L. and Kao, W.H., 2006. Coffee and sweetened beverage consumption and the risk of type 2 diabetes mellitus: the atherosclerosis risk in communities study. American Journal of Epidemiology, 164(11):1075-1084.

17. Pellati, F., Benvenuti, S., Melegari, M., and Lasseigne, T., 2005. Variability in the composition of anti-oxidant compounds in *Echinacea* species by HPLC. Phytochemical Analysis, 16(2):77-85.

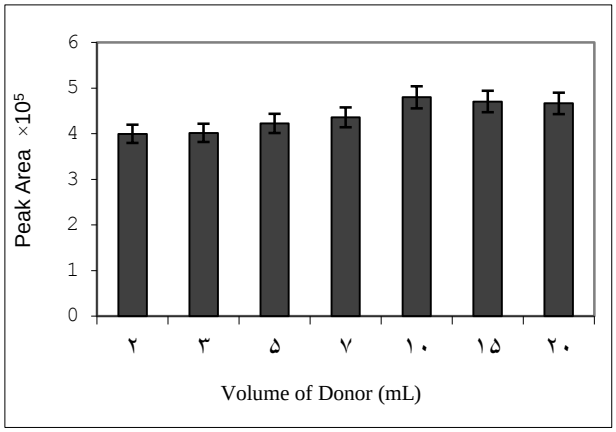
18. Percival, SS., 2000. Use of *Echinacea* in medicine. Biochemical Pharmacology, 60(2):155-158.

19. Sarafraz, Yazdi, A., and Es'haghi, Z., 2005. Two-step hollow fiber-based, liquid-phase micro extraction combined with high-performance liquid chromatography: a new approach to determination of aromatic amines in water. Journal of Chromatography A, 1082(2):136-142.

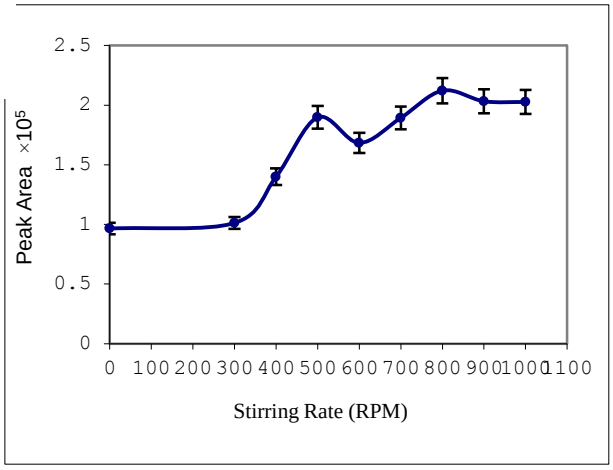
20. Sarafraz Yazdi, A., and Es'haghi, Z., 2005. Surfactant enhanced liquid-phase micro extraction of basic drugs of abuse in hair combined with high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1094(1-2):1-8.

21. Sotillo, D.R., Hadley, M., and Wolf-Hall, C., 1998. Potato Peel Extract a Non mutagenic Antioxidant with Potential Antimicrobial Activity. Journal of Food Science, 63(5): 907-910.

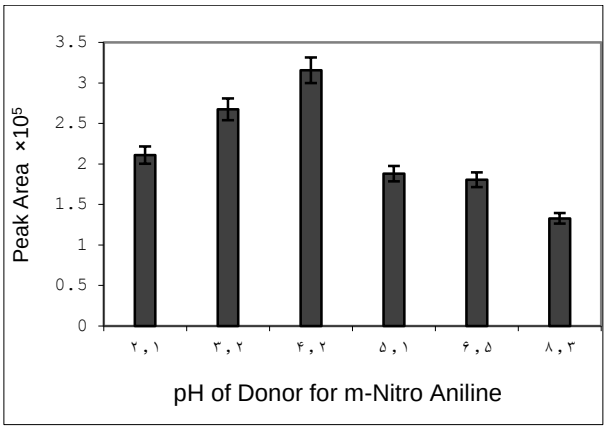
22. Zhang, Z., Yang, M.J., and Pawliszyn, J., 1994. Solid-Phase Microextraction, A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation. Analytical chemistry, 66 (17):844-853.



شکل ۱: اثر حجم فازدهنده بر کارایی استخراج در روش HF-SPME بر پایه سل- ژل برای کلروژنیک اسید



شکل ۲: اثر سرعت هم زدن بر کارایی استخراج در روش HF-SPME بر پایه سل- ژل



شکل ۳: اثر pH فازدهنده بر کارایی استخراج در روش HF-SPME بر پایه سل-ژل

جدول ۱: شرایط اعمال شده برای میکرواستخراج و استخراج معکوس توسط روش HF-SPME

شرایط میکرو استخراج با فیبر ساخته شده	
سرعت هم زن	۸۰۰ rpm
زمان استخراج	۲۵ دقیقه
حجم سل-ژل	۱۲ µL
حجم دهنده	۱۰ mL
pH نمونه	٤/۲
دمای نمونه	۲۰ ^{o}C

جدول ۲: ارقام شایستگی تکنیک جدید HF-SPME برای استخراج کلروژنیک اسید

ارقام شایستگی	مقدار
محدوده خطی (ng/mL)	۰/۲-۱۰۰۰
حد تشخیص (ng/mL) (n=۷)	۰/۰۸
حد تعیین کمی (ng/mL) (n=۷)	۰/۱۵
ضریب انحراف از خطی بودن (r)	۰/۹۹۷
درصد انحراف استاندارد نسبی (n=۳)	۰/۳۸
فاکتور پیش تغلیظ	٤١٤٥

جدول ۳: ارزیابی درصد بازیافت نسبی، تکرارپذیری و تجدیدپذیری در نمونه داروی شامل عصاره هیدروالکلی گیاه اکیناسه توسط افزایش کلروژنیک اسید در چهار سطح غلظتی

سطح غلظت کلروژنیک اسید (ng/mL)	درصد بازیافت نسبی (صحت)	RSD% تکرارپذیری (n=3)	RSD% تکثیرپذیری (n=9)
۱۰	۹۲/٦	۰/۳۲	۰/۹۵
۵۰	۸٤/۸	۱/۷۳	۲/۰۵
۱۰۰	۸۹/۹	۰/۳۸	۱/۲۱
۵۰۰	۹۷/۲	۲/٦۱	٦/۸۲

Eco-phytochemical Journal of Medical Plants, 1th Year. Number 2. Summer 2013

Extraction and determination of chlorogenic acid in *Echinacea purpurea* using a novel solid phase micro extraction method

Ahmadi Golsefidi, M[*1]., Eshaghi, Z[2]., Tazikeh, E[3].

[1,3] Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of sciences, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan, Iran

[2] Associate Professor, Department of Chemistry, Faculty of sciences, Payam-e-Noor University, Mashhad, Iran

Abstract

The study has conducted based on the development and application of a novel extraction technique to determine the phenolic compounds in *Echinacea purpurea* herbal extract. A composite adsorbent based on solid-phase micro-extraction techniques using sol-gel was prepared. The composite was homogeneously injected into a polypropylene hollow fiber. Finally, the device was used as a selective sorbent to extract the chlorogenic acid as a phenolic compound in *E. purpurea*. Thereafter, the chlorogenic acid amounts in the extract was measured by high performance liquid chromatography (HPLC). Main factors affecting the synthesis of the composite and factors affecting the microextraction process were studied and optimized. The detection limit of the technique was 0.08 ng. mL^{-1}. Linear range and relative standard deviation were 0.2 -1000 ng. ml^{-1} and 0.38% (n=3), respectively. The average relative recovery of the analyte added to the sample at four concentration levels were between 84.4 to 97.2 percent. This method was proposed as a new method to determine chlorogenic acid and other phenolic compounds in *E. purpurea* and other plants.

Keywords: Chlorogenic acid, Solid Phase microextraction, Sol-gel, *Echinacea purpurea*, High performance liquid chromatography

[*]Corresponding Author; ahmadi.golsefidi@iran.ir