شناسایی و استخراج ترپنوییدهای گیاه بهمن (Stipacapensis)

فهیمه داودی، حسین حمادی*، ناهید پوررضا

گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۲/۰۷ تاریخ تصحیح:۹۸/۰۳/۰۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۱۱

چکیده

گیاه بهمن (Stipa capensis) از جمله گیاهان جنس Stipaاست که به خانواده گندمیان تعلق دارد و تاکنون در مورد آن هیچ گونه بررسی فیتوشیمیایی صورت نگرفته است. این تحقیق با هدف جداسازی، خالص سازی و تعیین ساختمان ترکیبات موجود در عصاره ی گیاه بهمن انجام گرفته است. تست های فیتوشیمیایی، جهت شناسایی اولیه ی انواع مواد مؤثره‌ی گیاهی انجام شد. وجود ترپنوئیدها به وسیله‌ی تست‌های شناسایی تأیید شد. پس از عصاره گیری و استخراج، عصاره ی تهیه شده به وسیله‌ی ستون کروماتوگرافی جداسازی گردید. جهت تعیین میزان رنگدانه ها از اسپکتروفتومتر استفاده گردید و عصاره های اتانولی و متانولی با یکدیگر مقایسه گردید. جهت خالص سازی اجزاء مختلف عصاره خام، پس از آزمون پایداری ترکیبات بر روی سیلیکاژل، کروماتوگرافی ستونی سیلیکاژل مورد استفاده قرار گرفت و برای شناسایی ترکیبات موجود در جزءها، از روش‌های LC-MS و GC- MS استفاده گردید. بر پایه ی بررسی‌های طیفی، چندین ترکیب ترپنوئیدی از گیاه بهمن جداسازی و شناسایی شد. این تحقیق، اولین تحقیق صورت گرفته جهت بررسی ترکیبات این گیاه بوده است. ترکیبات ترپنی یافت شده در گیاه شامل استروئیدها، کاردیاک گلیکوزیدها، کاروتنوئیدها و پرنیل کینون‌ها (پرنول لیپیدها) می باشند.

کلمات کلیدی: بهمن، ترپنویید، عصاره گیری، آنتی اکسیدان، استروئیدها

۱-مقدمه

گیاهان به عنوان ذخایر تجدید پذیر، علاوه بر نقش حفاظتی خاک، حفاظت و بقای اکوسیستم و محیط زیست، نفوذ آب به درون خاک و تغذیه سفره های آب زیر زمینی، تأمین علوفه دامی، بخش عمده و اصلی احتیاجات غذایی و دارویی را تأمین می‌نمایند[۱]. از زمان باستان، گیاهان جهت پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری ها مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند. امروزه یک چهارم داروهای مصرفی دارای منشأ گیاهی بوده و۷۰ الی ۸۰ درصد مردم جهان عمدتاً از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند و این نشان دهنده ی افزایش تقاضا برای گیاهان دارویی است [۲].

*.**نویسنده مسئول:** استادیار شیمی آلی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز h.hammadi@scu.ac.ir

ایران از معدود کشورهایی است که به علت تنوع آب و هوایی بالا، گونه های گیاهی بسیاری را در خود جای داده است. فلات پهناور ایران زمین، با تنوع بالای گونه های گیاهی یکی از مراکز طبیعی رشد درختان و گیاهان محسوب می‌شود. از ۱۳ اقلیم شناسایی شده در دنیا، ایران دارای ۱۱ اقلیم می باشد. در جلگه‌های حاصلخیز خوزستان و دشتهای فارس، کرمان، هرمزگان، بلوچستان و بوشهر از عهد باستان انواع درختان و گیاهان گرمسیری و نیمه گرمسیری روئیده است، ناحیه‌ی شمال غرب ایران یعنی کوهستانهای زاگرس و البرز انواع گیاهان سردسیری و نیمه سردسیری را در خود جای داده است [۳-۴]. مواد مؤثره‌ی موجود در گیاهان را میتوان به دوگروه اصلی اسانس‌ها (روغن‌های فرار) و عصاره‌ها تقسیم کرد. عصاره‌ها شامل آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، ترکیبات فنولی(شامل فلاونوئیدها، فنولهای ساده و پلی‌فنولهایی همچون تانن‌ها) و ترپنوئیدها (شامل ترپن‌ها، استروئیدها و ساپونین ها) می‌باشند. اسانس‌ها معمولاً متعلق به ترپنها، سزکویی ترپن‌ها، الکل‌ها، استرها، آلدهیدها، فنل‌ها، اترها و یا پراکسیدها می‌باشند [۵]. به علت تبخیر در دمای اتاق و در مجاورت هوا، به آنها روغنهای فرار، روغنهای اتری یا اسانس های روغنی اطلاق میگردد و به ۸ گروه عمده تقسیم می‌شوند: اسیدها و الکل‌ها مانند (ژرانیول و لینالول)، آلدهیدها (مانند اسانس بادام تلخ و ستیرال)، کتون‌ها (مانند کاروون)، استرها (مانند استات بورنیل و لینالیل)، ترپن‌ها یا هیدروکربنها (مانند تیمن)، فنولها (مانند اوژنول، تیمول وکارواکرول) و سزکوئی ترپنها[۶]. ترپنوئیدها اکثراً بی رنگ بوده و جهت شناسایی بر روی کاغذ TLC نیاز به ظاهر کننده‌های شیمیایی دارند[۷-۹]. طبق پژوهش‌های صورت گرفته عوامل بسیار زیادی ازجمله آب و هوا، خاک و ارتفاع، و روشهای استخراج در میزان متابولیتهای ثانویه گیاهی از جمله فنل و خواص آنتی اکسیدانی دخالت دارند[۱۰]. بنابراین جداسازی ترکیبات و استفاده از مواد خالص به جای گیاه خام، مزیتهایی از جمله بررسی بهتر اثرات درمانی، تعیین دوز مصرفی، تعیین سمیت و سهولت جذب در بدن انسان را دارد[۱۱]. گیاه بهمن (چمن سوزنی) با نام علمی *Stipa capensis* می‌باشد. چند فاکتور مؤثر در انتخاب این گونه‌ی گیاهی موثر مد نظر قرار گرفته است از جمله: بر روی گیاه بهمن هیچ گونه بررسی فیتوشیمیایی صورت نگرفته است. گیاه نامبرده به صورت سنتی‌کاربرد دارویی داشته‌است و جهت درمان مشکلات معده و بیماری‌های عصبی استفاده می‌گردیده است[۱۲]. در انتخاب گیاه، فاکتور فراوانی گیاه، امکان دسترسی به گیاه و امکان برداشت در فصل مورد نظر اهمیت داشته است. این گیاه از نظر درصد فراوانی از جمله گیاهان بسیار فراوان در منطقه‌ی جنوب و جنوب غربی کشور بوده و در استان‌های خوزستان، فارس و استان‌های غربی کشور به وفور دیده می‌شود [۱۳]. نمونه‌ی تهیه شده به شماره هرباریومی ۱۵۶۰۹ در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان موجود می-باشد. گیاه بهمن از شاخه *Angiosperms*، رده *Monocots*، خانواده *Poaceae* و گونه *Stipa cappensis* می‌باشد.

۲-بخش تجربی

۲-۱-مواد شیمیایی و معرف‌های مورد استفاده

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک، خریداری شدند. آب مورد استفاده در کل تحقیق، آب یک بار تقطیر می باشد. فسفریک اسید، استیک اسید، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات و پتاسیم هیدروکسید استفاده شده در تهیه بافرها، همگی از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. همه مواد شیمیایی دیگر با خلوص"معرف تجزیه‌ای" از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. محلول‌های بافر فسفات با افزودن محلول‌های رقیق H_3PO_4 یا KOH به محلول ۰/۱ مولار نمک KH_2PO_4 (بافر فسفاتی) و محلول‌های بافر استات با افزودن محلول رقیق KOH به محلول ۰/۱ مولار استیک اسید (بافر استاتی) و تنظیم pH محلول حاصل با استفاده از دستگاه pH متر تهیه شدند. سیلیکاژل ستون کروماتوگرافی با مش ۷۰-۲۳ از شرکت مرک تهیه گردید.

۲-۴-تهیه نمونه

گیاه مورد نظر از استان خوزستان، شهرستان مسجدسلیمان در فصل زمستان و بهار جمع‌آوری شد. گیاه ابتدا تمیز شده و زواید اضافی، خاک بدنه، برگ‌ها و قسمت‌های آسیب دیده، خشک شده و آفت زده جدا شدند. نمونه‌ی گیاهی ابتدا با آب لوله کشی شسته شد و سپس با آب مقطر، آب کشی گردید. گیاه به مدت ۵ روز در سایه و در مجاورت هوا در دمای ۱۸-۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک گردید. گیاه به وسیله آسیاب خانگی کاملاً پودر شد [۱۱]. گیاه پودر شده برای جلوگیری از نفوذ نور و رطوبت ابتدا در کیسه‌ی کاغذی ریخته شد و سپس در چند کیسه پلاستیکی پیچیده شد و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری گردید.

۲-۵-عصاره گیری به روش خیساندن

۲۵ گرم از پودر گیاه در یک ارلن ریخته شده و۲۵۰ میلی لیتر متانول به آن افزوده‌گردید. مگنت با اندازه‌ی مناسب در ظرف قرار داده شد و درب ارلن‌کاملاً پوشانده شد. جهت جلوگیری از تأثیر نور، ارلن به وسیله‌ی فویل آلومینیومی کاملاً پوشیده شد. بدین ترتیب به مدت هفت روز به روش خیساندن، و تحت همزدن روی همزن مغناطیسی، عصاره‌گیری صورت گرفت. عصاره اتانولی نیز به روش مشابه تهیه گردید.

۲-۶-عصاره گیری به روش سوکسله

۲۵ گرم از پودر گیاه درکارتوش سوکسله ریخته شد و۲۵۰ میلی لیترحلال متانولی مورد استفاده قرار گرفت و عصاره‌گیری صورت‌گرفت. پس از سه بار سیفون کشیدن عصاره‌گیری پایان‌گرفت. پس از آن به علت بی‌رنگ شدن تقریبی حلال موجود در مخزن سوکسله، نیازی به عصاره‌گیری و افزایش تعداد مراحل سیفونیک دیده نشد.

۲-۷- تغلیظ و نگهداری عصاره

عصاره ی حاصل از خیساندن به وسیله کاغذ صافی، صاف شد. ۲۵۰ سی‌سی عصاره‌ی حاصل از هر سه روش مذکور به وسیله دستگاه تبخیر کننده چرخان در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد تا به حجم نهایی تقریبی ۵۰ میلی لیتر رسید. عصاره-های تغلیظ شده در فالکن ریخته شد و در فریزر نگهداری گردید.

۲-۸-تعیین محتوای کلروفیل

میزان کلروفیلA،کلروفیل B و کاروتنوئیدها طبق روش لیچن تالتر محاسبه گردید که در آن جذب به وسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر به روش چند طول موجی، در طول موجهای ۶۶۵، ۶۵۲ و ۴۷۰ نانومتر نسبت به حلال اندازه‌گیری شد. مقادیر جذبی در جدول ۱ ذکر گردیده است. طبق فرمول‌های ذکر شده در جدول ۲ مقدار رنگدانه‌ها برای عصاره متانولی محاسبه-گردید. برای عصاره اتانولی نیز جذب در طول موجهای ۶۶۴ ، ۶۴۹ و۴۷ نانومتر نسبت به حلال اندازه‌گیری گردید. و مقدار هر یک از رنگ‌دانه‌ها محاسبه شد (جدول ۳).

جدول ۱. میزان جذب رنگدانه ها

عصاره اتانولی	عصاره متانولی
$A_{۴۷۰}$=۰/۷۴۴	$A_{۴۷۰}$=۰/۷۶۴
$A_{۶۴۸}$=۰/۳۸۳	$A_{۶۵۲}$=۰/۴۹۵
$A_{۶۶۴}$=۰/۸۱۳	$A_{۶۶۵}$=۰/۹۸۹

جدول ۲. میزان رنگدانه‌ها در عصاره متانولی

نوع رنگدانه	فرمول محاسبه [۱۹]	رنگدانه (µg/mL)
کارتنوئید (C)	$C = \frac{(1000A_{470} - 1.63ChA - 104.96chB)}{221}$	۱/۹۵
کلروفیل B (Ch B)	$ChB = 34.09A_{652} - 15.28A_{665}$	۵/۲
کلروفیل A (Ch A)	$ChA = 16.72A_{665} - 9.16A_{652}$	۸/۲۴

۲-۹- آزمون شناسایی اختصاصی ترپنوییدها در عصاره استخراجی

با استفاده از لوله مویین بر روی یک قطعه کاغذ TLC، لکه گذاری عصاره متانولی و عصاره استخراجی با n-هگزان انجام شـده و معرف لیبرمن-بوچارد، تهیه شده توسط افزودن ۵ میلی لیتر استیک انیدرید به همراه ۵ میلی لیترسولفوریک اسید غلیظ به ۵۰ میلی لیتر اتانول سرد، بر روی کاغذ TLC اسپری گردید. سپس در آون ۱۰۰ درجه به مدت ۱۰دقیقه قرار داده شد.

۲-۱۰- کروماتوگرافی

برای انتخاب ستون کروماتوگرافی، از سیستم های تک حلالی متانول، اتانول، اتیل استات، استون، کلروفرم، دی‌کلرومتان، n-هگزان و دی متیل سولفوکسید استفاده گردید. سپس تا حصول نتیجه بهتر بر روی کروماتوگرافی لایه نازک، از سیستم‌های دوحلالی با درصدهای مختلف استفاده‌گردید. جهت بهینه کردن مقدار نمونه‌ی تزریقی و سرعت جریان نیاز به تکرار چند باره‌ی ستون بود.

۳-بحث و نتیجه‌گیری

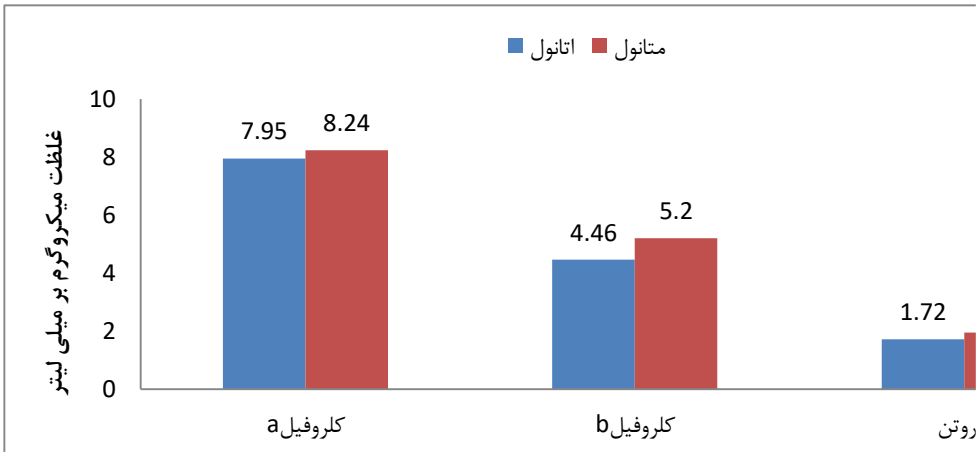
از مقایسه‌ی بازده برای عصاره‌ها نتیجه‌گیری شد که به ترتیب خیساندن با متانول (۱۱/۰۴٪) نسبت به اتانول (۹/۴۸٪) کارایی بیشتری دارد و همچنین روش سوکسله (۱۳/۹۲٪) نسبت به روش خیساندن، قابلیت استخراج میزان بیشتری از ترکیبات را دارد. اگرچه سوکسله از نظر کمی روش بهتری است اما کیفیت ترکیبات را، به علت وجود حرارت، تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین استفاده از این روش در این پروژه امکان پذیر نیست. سوکسله برای استخراج ترکیبات غیرفرار و حساس به دما روش مناسبی نیست [۱۱]. کارتنوئیدها (تتراترپن نمونه‌ای از ترکیبات ناپایدارگرمایی‌اند که به علت استخراج در دمای جوش حلال، تحت تأثیر حرارت وارده، می‌شکنند و از تجزیه حرارتی آنان، محصولات مصنوعی شکل می‌گیرد. بنابراین استفاده از روش‌های استخراج سرد همچون خیساندن، هنگامی‌که‌ترکیبات حساس به دما باشند مورد توجه قرار گرفته است [۱۵-۱۸]. بدین ترتیب روش خیساندن برای عصاره‌گیری انتخاب شد که در ادامه با تعویض حلال، بازده استخراج به حد روش سوکسله افزایش یافت. بدین ترتیب بازده عصاره‌ی متانولی، به روش خیساندن با تعویض حلال ۱۳/۱۶٪ است که در مقایسه با بازده عصاره‌ی متانولی به روش خیساندن بدون تعویض حلال که ۱۱/۰۴٪ بود افزایش نشان داد و با بازده۱۳/۹۲ درصدیِ مربوط به عصاره‌ی متانولی به روش سوکسله،تقریباً برابر است. پس می‌توان نتیجه گرفت بازده روش خیساندن را می‌توان با تعویض حلال در مدت زمان کوتاهتری افزایش داد. در این روش چون حلال از ترکیبات گیاهی اشباع شده است، تعویض حلال باعث بهبود استخراج و افزایش حلالیت ترکیبات باقی مانده در گیاه می‌شود.

براساس‌تستهای شناسایی اولیه بر روی گیاه مورد نظر مشاهده شد، گیاه فوق دارای ترکیبات ترپنوئیدی (از جمله استروئید و تری‌ترپنوئید)، گلیکوزید، آلکالوئید و ترکیبات فنولی می‌باشد. محاسبه میزان رنگدانه‌ها نشان می‌دهد که متانول نسبت به اتانول توانایی بهتری در استخراج رنگدانه داشته است زیرا میزان رنگدانه‌ها طبق نمودار شکل۱در حلال متانولی بیشتر از اتانولی است و البته متانول اگر چه هر سه رنگدانه را بهتر از اتانول استخراج نموده است اما بهبود استخراج برای کلروفیل B به مراتب بهتر از دو رنگدانه دیگر است. به علت اهمیت خاص ترکیبات ترپنی جداسازی و تعیین ساختار این ترکیبات، به عنوان هدف اصلی این

تحقیق انتخاب شد. جهت بررسی دقیق‌تر، عصاره با استفاده از ستون کروماتوگرافی، تفکیک شده و اجزای جداسازی شده جهت خالص‌سازی و شناسایی دقیقتر با روشهای طیف سنجی مورد بررسی قرارگرفت.

جدول ۳. میزان رنگدانه ها در عصاره اتانولی

نوع رنگدانه	فرمول محاسبه [۱۹]	رنگدانه (میکروگرم بر میلی لیتر)
کارتنوئید (C)	$C = \frac{(1000A_{470} - 213ChA - 97.63chB)}{209}$	۱/۷۲
کلروفیل B (Ch B)	$ChB = 27.43A_{648} - 8.12A_{664}$	۴/۴۶
کلروفیل A (Ch A)	$ChA = 13.36A_{664} - 5.19A_{649}$	۷/۹۵



شکل ۱. نمودارمقایسه میزان رنگدانه ها در عصاره متانول و اتانولی

در آزمون شناسایی اختصاصی ترپنوئیدها، عصاره‌ی متانولی به رنگ قهوه‌ای سوخته و عصاره n-هگزانی به رنگ قرمز آجری در آمد. این تغییر رنگ علاوه بر تأیید وجود تری‌ترپن‌ها در عصاره متانولی و مناسب بودن حلال استخراج نشان می‌دهد که n-هگزان به خوبی قابلیت استخراج این ترکیبات لیپیدی (ترپن‌ها) از متانول را داشته است زیرا به این تست به خوبی پاسخ داده است.

تست پایداری ترکیبات گیاهی روی سیلیکاژل: سیلیکاژل جاذب مناسبی برای ترکیبات ترپنی بوده[۲۰-۲۱] و بنابراین برای ستون کروماتوگرافی قابل استفاده می باشد. ابتدا توسط TLC دوبعدی، آزمون پایداری عصاره بر سیلیکاژل بررسی گردید [۲۲] و نتایج نشان داد که سیلیکاژل می‌تواند بعنوان فاز ساکن ستون کروماتوگرافی بدون تخریب یا تجزیه عصاره بکار گرفته شود.

جدول۴. بهینه سازی حلال مناسب برای شویش ستون کروماتوگرافی

ترکیب درصد حلال	تعداد لکه	فاکتور بازدارندگی هر لکه	وضعیت
کلروفرم متانول ۱:۱۰	۳	۰/۴۳و۰/۸و۰/۹۵	نامناسب
کلروفرم اتیل استات۱: ۴۰	۳	۰/۱۱و۰/۸۰و۰/۹۶	نامناسب
دی اتیل اتر و n- هگزان ۳۰ : ۷	۵	۰/۹۸و۰/۶۳و۰/۵۶و۰/۴۸و۰/۳۹	اختلاف فاکتور بازدارندگی کم
کلروفرم دی اتیل اتر ۱ :۱۰	۴	۰/۹۷و۰/۷۶و۰/۶۸و۰/۵۸	اختلاف فاکتور بازدارندگی کم
دی اتیل اتر	۵	۰/۹۷و۰/۸۲و۰/۷۴و۰/۷۱و۰/۶۵	اختلاف فاکتور بازدارندگی کم
n- هگزان : اتیل استات ۳ : ۲	۴	۰/۹۸و۰/۷۳و۰/۵۳و۰/۲۰	مناسب ترین

حلال مناسب برای شویش ستون کروماتوگرافی ابتدا با استفاده از کاغذ TLC انتخاب شد. در این تحقیق چندین سیستم حلال آزموده شد و ترکیب درصد تغییر داده شد تا بیشترین تعداد لکه و بهترین اختلاف فاکتور بازدارندگی به دست آید. در نهایت اطلاعات مربوط به انواع سیستم‌های حلال مقایسه شد و بهترین سیستم انتخاب گردید. تعدادی از سیستم‌ها با بهترین ترکیب درصد به دست آمده شامل موارد زیر می‌باشند (جدول ۴). بدین ترتیب حلال n-هگزان: اتیل استات به نسبت ۳:۲ انتخاب-گردید. پلاریته‌حلال به روش روجر زیر به مقدار ۱/۱۷۲ محاسبه شد. جهت جداسازی دقیق‌تر، جذب هر ۱۲۹جزء خروجی از ستون کروماتوگرافی در طول موج ۴۵۰ نانومتر به وسیله‌ی یک سل شیشه‌ای با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. نمونه‌ی شاهد همان حلال ستون بود. نمودار تغییرات جذب بر حسب شماره‌ی جزء، رسم گردید. بنابراین طبق مقادیر جذبی، جزءهای خروجی از ستون کروماتوگرافی ادغام شدند و ۴ جزء نهایی در ۴ بالن مجزا به دست آمد. هر ۴ جزء به وسیله-ی دستگاه تبخیر کننده‌ی چرخان در دمای ۴۵ درجه تغلیظ شده تا به حجم نهایی تقریبی ۵-۶ سی‌سی برسد. اجزا به دست آمده در ظرف شیشه‌ای ریخته شده و دور از نور در یخچال نگهداری شد.

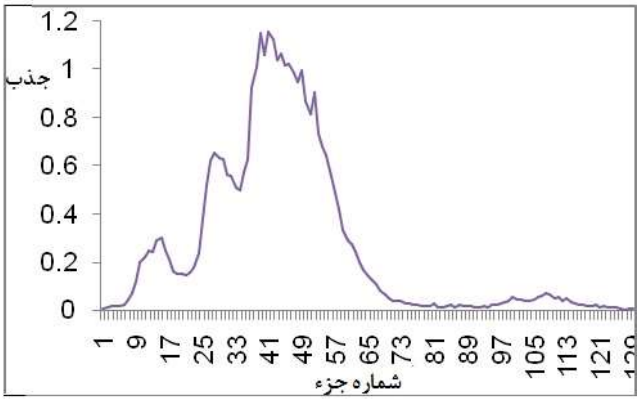
تست تشخیص احتمال وجود ترپن در هر جزء به روش اسپکتروفتومتر و اسپری معرف

با اسپری معرف لیبرمن-بورچاد تازه تهیه شده بر روی اجزاء خارج شده از ستون احتمال وجود ترکیبات مورد نظر در هرجزء سنجیده شد. بر اساس مشاهدات در جزء های ۱، ۲ و۴ با فاکتور بازدارندگی بترتیب ۰/۹۸، ۰/۷۳ و ۰/۲۰ به احتمال وجود ترپنوییدها وجود دارد. جز دوم و سوم برای جداسازی و شناسایی بیشتر، به دستگاه GC-MS تزریق شد. روش GC-MS به علت جست و جو در داده های کتابخانه ای روش مناسبی برای تشخیص ساختمان مولکول می باشد. در جز اول و جز چهارم طبق بررسی‌های اولیه، احتمال وجود تتراترپن (کارتنوئیدها) تشخیص داده شد و از آنجا که روش GC-MS برای ترکیبات فرار و پایدار حرارتی با نقطه‌ی جوش پایین کاربرد دارد، بنابراین قادر به تشخیص وجود کارتنوئیدها در این دو جزء نمی‌باشد.

جدول۵. ستون کروماتوگرافی مورد استفاده [1]

مقدار سیلیکاژل	حجم جمع آوری جزء ها	میزان بارگذاری ستون	فاز متحرک	میزان جریان
۵۰ گرم	۵ سی‌سی	۲ سی‌سی عصاره	n-هگزان: اتیل استات (۲:۳)	۴۸ قطره در دقیقه

[1] طول ۵۰ و قطر ۲ سانتی متر با حجم ۱۳۰ سی سی



شکل ۲. نمودار جذب جزء های خروجی از ستون کروماتوگرافی

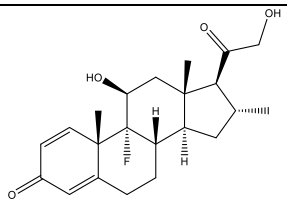
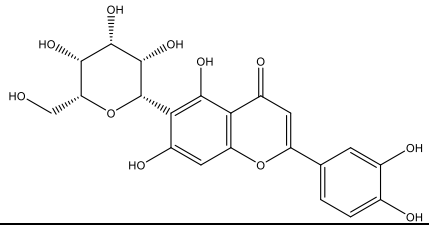
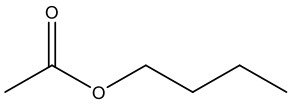
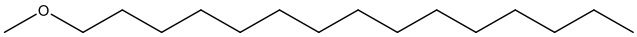
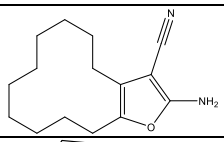
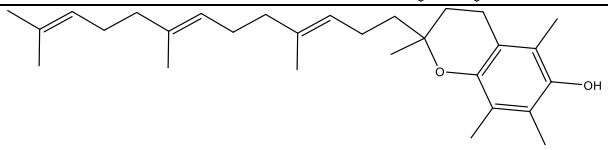
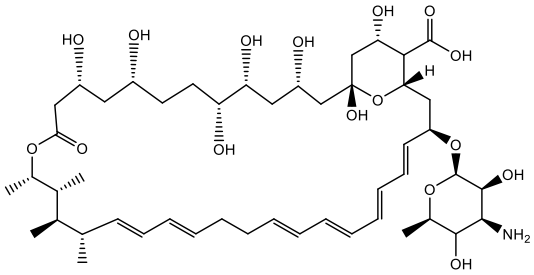
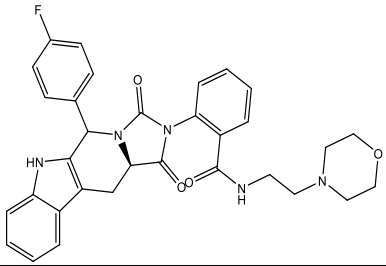
بنابراین از روش LC-MS استفاده شد. روش LC-MS فاقد جست وجوی کتابخانه‌ای است ولی برای شناسایی ترکیبات سنگین، حساس به دما و با نقطه‌ی جوش بالا روش مناسبی است. نتایج حاصل از تفسیر کروماتوگرام‌های LC-MS در جزءهای اول و چهارم در جدول ۶ آورده شده‌اند. جزء اول و جزء چهارم از بین چهار جزء جداسازی شده از ستون، حاوی ترکیبات ترپنی بوده و دو جزء دیگر(جزء دوم و سوم) فاقد این ترکیبات و عمدتاً حاوی ترکیبات اسانسی و سبک، ارزیابی شدند.

۴-نتیجه‌گیری

در این پژوهش عصاره خام به وسیله‌ی متانول بدست آمد. ترپن‌ها بدلیل اینکه ترکیبات چربی دوست با قطبیت پائین می باشند با حلال n-هگزان استخراج شدند. با انجام کروماتوگرافی ستونی با جاذب سیلیکاژل و حلال n-هگزان و اتیل استات به نسبت ۶:۴ جداسازی انجام شد و ۴ جزء به دست آمد. جاذب سیلیکاژل به علت بهای مناسب، واکنش پذیری کمتر با ترکیبات و از جمله بهترین جاذب برای جداسازی ترکیبات ترپنی می‌باشد. تست پایداری بر روی سیلیکاژل توسط TLC- 2D به روش پایداری عصاره بر سیلیکاژل بررسی گردید. از بین ۴ جزء جداسازی شده جزء اول و چهارم به علت جذب در ناحیه‌ی ۴۰۰–۴۵۰، رنگ زرد و فاکتور بازدارندگی ۰/۲-۰/۹۸ با وجود کارتنوئیدهای هیدروکربنی و گزانتوفیل‌ها مطابقت داشته و جهت شناسایی به LC-MS منتقل گردید. جز اول و دوم به GC-MS منتقل گردید. بدین ترتیب با انجام کروماتوگرافی ستونی و پس از آن خالص‌سازی و شناسایی با روش هایLC-MS و GC-MS، چندین ترکیب ترپنی شناسایی شدند. از جمله استروئیدها و کاردیاک گلیکوزیدها که ترکیباتی از دسته‌ی تری‌ترپن‌ها هستند و کاروتنوئیدها که تتراترپن‌هایی با خاصیت آنتی اکسیدانی‌اند و به عنوان رنگدانه‌های زرد رنگ، در بسیاری از گیاهان دیده می شوند و در نهایت پرنیل‌کینون‌ها که با نامپرنول لیپیدها هم شناخته می شوند، شامل لیپیدهایی با هسته‌ی کینونیا هیدروکینون و دم ایزوپرونئیدی هستند. زنجیره‌ی جانبی در ویتامین-هایE شناسایی شده در این تحقیق، دی‌ترپنوئیدهایی با ساختار C_{20} می‌باشد. جزء اول و جزء چهارم از بین چهار جزء

جداسازی شده از ستون، حاوی ترکیبات ترپنی بوده و دو جزء دیگر(جزء دوم و سوم) فاقد این ترکیبات و عمدتاً حاوی ترکیبات اسانسی و سبک، ارزیابی شدند. عمده ترکیبات موجود و شناسایی شده در این ۴ جزء در جدول ۶ آورده شده اند.

جدول ۶. ترکیبات شناسایی شده از گیاه بهمن

شماره جزء ستون	فروانترین ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)
اول		۲۷/۱۶
		۶/۸۵
دوم		۶/۱۱
دوم		۵/۷۸
سوم		۵۴/۴۴
چهارم		۳۶/۲۸
		۶/۴
		۴/۸

۵- تشکر و قدردانی

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز جهت تامین هزینه های این پژوهش تشکر و قدردانی می نمایند.

۶- مراجع

[1] A. A. Salim, Y.W. Chin, A.D. Kinghorn, *Bioactive Molecules and Medicinal Plants* Springer (2008).

[2] A. Gurib-Fakim, *Molecular Aspects of Medicine*, **27** (2006)1.

[3] Kh. Jafarpour, M. Karshenas, Climate-radiation Classification for Iran, *2th climate changes conference, Climatology Center* (2000).

[4] M. Karami pour, M. Abedi, *Food Novel Technology*, **3** (2015) 65.

[5] A. Pengelly, The Constituents of Medicinal Plants. 2th ed, *Allen & Unwin* (2004).

[6] J. B. Harborne, Phytochemical Methods. 2th ed, *chapman and hall* (1984).

[7] R. Bekhradi, M. Khayat, *Therapeutic Applications of Essential Oils*, Morsel *press* (2006).

[8] W. Ch. Evans, Pharmacognosy, 15th Ed, *W.B. Saunders* (2002).

[9] S.M. Colegate, R.J. Molyneux, Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination. *CRC press* (2007).

[10] G. Cao, R. L. Prior, *Clinical Chemistry*. **44** (1998) 1309.

[11] D. Satyajit, Z. Latif, I. Alexander, Natural Products Isolation. 2th ed. *Humana Press Inc* (2006).

[12] P. Ghasemi, *Afr. J. Tradit Complement Altern Med*. **10** (2013) 368.

[13] R. W. Howarth, "Persian Gulf Desert and Semi-desert." Biomes & Ecosystems, **3** *Ipswich,MA: Salem Press*, 1000

[14] A.J. Duncan, *Animal Behavior*. **71** (2006) 93.

[15] C. Harold, *American Society for Nutritional Sciences*. (2004) 281.

[16] T. John, Carotenoids: Physical, Chemical, and Biological Functions and Properties. *Taylor and Francis Group* (2010).

[17] C. John, H. Byron, *Journal of Biological Chemistry* (1939) 267.

[18] E. Roger, Modern Methods of Pharmaceutical Analysis. *CRC Press*, **2**, (1982).

[19] H. K. Lichtenthaler, C. Buschmann, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (2001) 1.

[20] M. Bowman, *Micro Chemical Journal*. **56** (1997)10.

[21] S.V. Bhat, B.A. Nagasampagi, M. Sivakumar, Chemistry of Natural Products. *Narosa Publishing House, India* (2005).

[22] Y. Tanaka, *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries*. **47** (1981) 799.