دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۳، صفحه ۴۷۰-۴۵۹ (۱۳۹۵)

استخراج تبائین از کپسول خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum* Lindl.) با استفاده از سیال فوق بحرانی دی‌اکسید کربن

مریم اشرف خراسانی[۱] و فرهاد رئوفی[۲*]

۱- دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیک: f_raofie@sbu.ac.ir

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۳ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۳

چکیده

گیاه *Papaver bracteatum* Lindl. جزء گیاهان بومی ایران می‌باشد. این گیاه دارای گلهای قرمز و برگهای عمیق می‌باشد که انتهای برگها نزدیک کاسبرگ به رنگ سیاه می‌باشد. گیاه دارای طول ۲۰ تا ۱۲۰ سانتی‌متر است. این گونه به‌صورت خودرو در طبیعت می‌روید. کپسول‌های این گیاه دارای تبائین می‌باشند. تبائین طی یک فرایند ساده به انواع مسکن‌ها تبدیل می‌شود. در این پروژه برای اولین بار با استفاده از سیال فوق بحرانی تبائین از *Papaver bracteatum* با بازدهی بالا استخراج شد. شرایط استخراج با استفاده از برنامه آماری CCD بهینه شد و تبائین استخراج شده با استفاده از کروماتوکرافی مایع با دتکتور ماورای بنفش (HPLC-UV) جداسازی و شناسایی شد. برای بهینه‌سازی شرایط استخراج از طراحی مرکب مرکزی پس از یک مرحله غربال‌گری استفاده شد. بر اساس مدل استفاده شده، شرایط استخراج، فشار ۳۵۰ اتمسفر و دما ۳۵ درجه سلیسیوس، زمان استخراج استاتیک و دینامیک به‌ترتیب ۱۰ و ۴۰ دقیقه و حجم اصلاحگر اتانول ۱۰۰ میکرولیتر و در شرایط بهینه بازدهی استخراج ۲/۹۶٪ پیش‌بینی می‌شود.

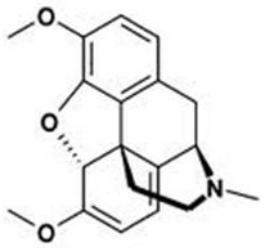
واژه‌های کلیدی: خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum* Lindl.)، تبائین، سیال فوق بحرانی، استخراج.

مقدمه

گیاه خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum*) جزء گیاهان بومی ایران می‌باشد که دارای گلهای قرمز و برگهای عمیق بوده و انتهای برگها نزدیک کاسبرگ به رنگ سیاه می‌باشد. گیاه دارای طول ۲۰ تا ۱۲۰ سانتی‌متر است و به‌صورت خودرو در طبیعت می‌روید. کپسول‌های این گیاه دارای تبائین و به مقدار ناچیز کدئین می‌باشند (شکل ۱) (Kuppers *et al*., 1976). تبائین از نظر درمانی به‌طور مستقیم کاربردی ندارد ولی طی یک فرایند ساده تبدیل به انواع مسکن‌ها مثل کدئین می‌شود (Barber & Rapoport, 1976).

به‌طور کلی، از آنجا که غلظت ترکیب‌های موجود در گیاهانی که از نظر داروشناسی فعال هستند بسیار پایین می‌باشد، بنابراین برای استخراج این ترکیب‌ها از مواد اولیه، نیاز به یک روش استخراج مؤثر و کارآمد می‌باشد. از طرفی نیز فشار زیادی روی کارخانه‌ها برای عدم استفاده از حلال‌های آلی مضر برای محیط زیست وجود دارد (Shan *et al*., 2012). عصاره‌گیری با بنزن و کلروفرم روشهایی هستند که تاکنون برای استخراج تبائین از کپسول خشخاش ایرانی بکار رفته‌اند (Lalezari *et al*., 1974؛ Maghssodi & Fawzi, 1978). استخراج با استفاده از سیال فوق بحرانی

دارای عامل‌های زیاد قابل کنترل برای افزایش گزینش‌پذیری استخراج می‌باشد، از این‌رو یکی از بهترین روش‌های استخراج ترکیب‌های موجود در گیاهان محسوب می‌شود (Ara *et al*., 2014). در مقایسه با سایر روش‌های استخراجی، این روش به مقدار کمتری از نمونه نیاز دارد و در زمان کوتاه‌تری استخراج انجام می‌شود و نیاز به حلال کمتری دارد (Daneshvand *et al*., 2012؛ Ghasemi *et al*., 2011) و همچنین به راحتی صنعتی می‌شود (Ramandi *et al*., 2011). این روش برای اولین بار برای استخراج تبائین موجود در کپسول خشخاش ایرانی بکار برده شد. برای بهینه‌سازی شرایط استخراج از طراحی مرکب مرکزی پس از یک مرحله غربال‌گری استفاده شد.



شکل ۱- ساختار شیمیایی تبائین

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

کربن دی‌اکسید با خلوص ۹۹/۹۹٪ از شرکت سبلان (تهران) تهیه شد. اتانول با درجه خلوص موردنیاز برای HPLC به‌عنوان اصلاح‌گر از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد. تبائین استاندارد از شرکت پرند دارو (تهران) تهیه شد.

مواد خام و آماده‌سازی نمونه

کپسول گیاه پاپاور براکتئاتوم از مراتع شمال ایران تهیه شد. ابتدا به مدت سه روز در سایه به خوبی خشک شد. بعد از خشک شدن کامل، توسط آسیاب خانگی به قطر تقریبی ۰/۵mm آسیاب گردید. سپس نمونه آسیاب شده، برای حذف رطوبت احتمالی موجود در کپسول‌ها به مدت ۲ ساعت در آون با دمای ۳۰ درجه قرار داده شد.

دستگاهوری

استخراج با استفاده از سیال فوق بحرانی توسط دستگاه سیال فوق بحرانی مدل سوپرکس MPS/225 از شرکت سوپرکس (پیتسبورگ ویرجینیا آمریکا) مجهز به پمپ سرنگی انجام شد. سل استخراج از جنس فولاد ضدزنگ به حجم ۳mL بود که در ابتدا و انتهای آن دو فیلتر با قطر منافذ ۵µm قرار داشت. برای تنظیم سرعت جریان از فشارشکن جریان متغیر ساخت شرکت سوپرکس استفاده شد. به‌منظور جلوگیری از یخ‌زدگی مسیر، فشارشکن توسط گرمکن برقی تا دمای ۷۵°C حرارت داده شد.

شناسایی تبائین استخراج شده، توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع ساخت شرکت اجیلنت (سانتا کلارا کالیفرنیا آمریکا) دارای دتکتور ماوراء بنفش و ستون C18 به‌طول ۲۵cm انجام شد.

فرایند استخراج

با توجه به حجم سل، ۰/۵g از نمونه کپسول آسیاب شده گیاه پاپاور براکتئاتوم با دانه‌های شیشه‌ای به‌قطر ۱mm مخلوط و درون سل استخراج ریخته شد. دانه‌های شیشه باعث پخش شدن ترکیب آنالیت در سطح و تمام فضای بین شیشه‌ها می‌شود. در نتیجه سطح تماس ترکیب با سیال فوق بحرانی زیاد شده و از پدیده تونل‌زنی جلوگیری می‌شود، بنابراین زمان به تعادل رسیدن گونه با سیال فوق بحرانی کمتر می‌شود. در استخراج‌هایی که نیاز به استفاده از اصلاح‌گر بود، در زمان پر کردن سل، حجم مورد نظر از اتانول به‌طور مستقیم درون سل استخراج ریخته شد. برای شروع فرایند استخراج ابتدا برنامه شرایط مورد نظر شامل فشار، دما، زمان استخراج استاتیک و دینامیک به دستگاه داده شد. سپس شیر ورودی سیال به پمپ باز و پس از پرشدن پمپ بسته شد. پس از رسیدن سیال به فشار مورد نظر، شیر خروجی از پمپ باز و استخراج آغاز گردید. سیستم دارای دو موقعیت بارگیری (Load) و تزریق

(Inject) است. در زمان استاتیک سیستم در موقعیت بارگیری و در زمان دینامیک سیستم در موقعیت تزریق می‌باشد. سرعت جریان سیال خروجی با استفاده از پیچ قابل تنظیم فشارشکن در حدود ۰/۳±۰/۰۵mL/min تنظیم شد و مواد استخراج شده درون ۱ mL اتانول در یک فلاسک با حجم ۲/۰mL جمع شدند. به‌منظور کاهش تبخیر مواد استخراج شده و افزایش کارایی جمع‌آوری، ظرف جمع‌کننده در طول زمان استخراج دینامیک درون حمام یخ قرار گرفت. پس از تبخیر اتانول در دمای محیط، بازده استخراج از توزین مواد باقی‌مانده بدست آمد.

آنالیز HPLC تبائین استخراج شده

در شرایط بهینه ۲۵ µL از نمونه استخراج شده در حجم معینی از اتانول به دستگاه HPLC تزریق شد و با شرایط ۳۰٪ بافر فسفات با pH برابر ۳/۸ و ۷۰٪ متانول به‌عنوان فاز متحرک تبائین استخراج شده در طول موج ۲۸۵nm شناسایی شد.

بهینه‌سازی شرایط استخراج با طراحی آزمایش

طراحی آزمایش

در این آزمایش عامل‌های مختلفی برای بهینه‌سازی شرایط استخراج مورد بررسی قرار گرفتند. اگر عامل‌های متعددی در سطوح مختلف در آزمایش مؤثر باشند، طراحی آزمایش به‌منظور رسیدن به نتایج بهینه به دو شیوه امکان‌پذیر می‌باشد:

روش اول که طراحی یک متغیر در یک زمان (One Variable At a Time) نام دارد، به‌این صورت است که در هر آزمایش فقط یکی از عامل‌های مؤثر در نتایج تغییر می‌یابد و اثر آن بر روی نتایج بررسی می‌شود و با تکرار این مرحله، سرانجام شرایط بهینه آزمایش تعیین می‌گردد. ایراد روش یک متغیر در یک زمان این است که این روش برهم‌کنش بین متغیرها را مشخص نمی‌کند.

روش دوم یک طراحی آماری می‌باشد. در طراحی فاکتوریال، آزمایش چندین بار در یک سطح انجام می‌شود و قادر به تعیین همزمان تأثیر عامل‌های مختلف بر روی پاسخ‌ها می‌باشد. در این روش اطلاعات کمّی زیادی در زمینه اهمیت اثرات عامل‌های مختلف و برهم‌کنش بین آنها ارائه می‌گردد. برای طراحی فاکتوریال کامل تعداد m^n آزمایش ضروری است که m تعداد سطوح و n تعداد عامل‌ها را نشان می‌دهد. بنابراین وقتی تعداد آزمایش‌های لازم با افزایش تعداد متغیرها به‌سرعت افزایش می‌یابد، انجام تمامی آزمایش‌ها از لحاظ عملی غیرممکن می‌شود. بنابراین می‌توان تعداد آزمایش‌ها را با استفاده از طراحی فاکتوریال جزئی (Fractional Factorial Design) و طراحی مختلط مرکزی (Central Composite Design (CCD)) به حداقل رساند.

با توجه به هزینه بالا و وقت‌گیر بودن هر آزمایش، ضرورت استفاده از روش‌های آماری در طراحی آزمایش انکارناپذیر است.

در این آزمایش پنج فاکتور در دو سطح برای تعیین عامل‌های مؤثر بر میزان بازدهی استخراج مورد بررسی قرار گرفتند. عامل‌ها و سطوح بررسی، فشار (۳۵۰atm و ۱۰۰)، دما (۶۵°C و ۳۵)، زمان استاتیک (۴۰min و ۱۰)، زمان دینامیک (۴۰min و ۱۰) و حجم اصلاح‌گر (۱۰۰µL و ۰) می‌باشند که به‌عنوان عامل‌های مورد بررسی انتخاب شدند. با توجه به تعداد عامل‌ها (۵) و تعداد سطوح (۲) و با استفاده از غربال‌گری (Screening) عامل‌ها و طراحی فاکتوریال 2^5 آزمایش یا به عبارتی ۳۲ آزمایش باید انجام می‌شد. اما همان‌طور که گفته شد با استفاده از طراحی فاکتوریال جزئی می‌توان تعداد آزمایش‌های مورد نیاز را برای به‌دست آوردن نتیجه مطلوب به حداقل رساند. بنابراین از طراحی فاکتوریال جزئی نیمه (Half Fractional Factorial Design) برای انتخاب عامل‌های اصلی استفاده شد. در این طرح $2^{n-1}=16$ آزمایش مورد نظر است که با احتساب ۲ آزمایش به‌عنوان نقاط مرکزی (Center Points) در مجموع ۱۸ آزمایش انجام شد.

جدول ۱ سطوح مختلف هر فاکتور و همچنین نتایج آزمایش ها SFE را براساس بازدهی استخراج برای کپسول خشخاش ایرانی نشان می دهد. بازدهی استخراج

بدین گونه محاسبه شد که پس از تبخیر حلال از تبائین استخراجی، وزن تبائین باقی‌مانده اندازه گیری و بعد با توجه به مقدار اولیه گیاه قبل از استخراج (۰/۵ گرم) بازده استخراج محاسبه شد.

طراحی مرکب مرکزی (CCD)

در مرحله بعدی طراحی آزمایش با بدست آوردن عامل‌های مؤثر بر میزان بازدهی استخراج، با استفاده از طراحی مختلط مرکزی تأثیر عامل‌های مورد نظر بر بازدهی استخراج و همچنین برهم‌کنش آنها با یکدیگر بررسی شد، و شرایط بهینه برای بیشترین استخراج براساس وزن تبائین تعیین شد.

جدول ۱- طراحی فاکتوریال جزئی نیمه و بازدهی بدست‌آمده از استخراج کپسول خشخاش ایرانی توسط SFE

No	P (atm)	t_s (min)	t_d (min)	T (°C)	V_m (μL)	R(%W/W)
۱	۳۵۰	۴۰	۱۰	۶۵	۰	۱/۵۵
۲	۱۰۰	۴۰	۱۰	۶۵	۱۰۰	۱/۰۹
۳	۳۵۰	۴۰	۴۰	۳۵	۰	۲/۰۰
۴	۲۲۵	۲۵	۲۵	۵۰	۵۰	۱/۳۶
۵	۳۵۰	۱۰	۴۰	۶۵	۰	۲/۵۴
۶	۱۰۰	۴۰	۴۰	۳۵	۱۰۰	۱/۶۶
۷	۳۵۰	۱۰	۴۰	۳۵	۱۰۰	۲/۷۶
۸	۱۰۰	۱۰	۱۰	۳۵	۱۰۰	۰/۲۰
۹	۲۲۵	۲۵	۲۵	۵۰	۵۰	۱/۴۰
۱۰	۱۰۰	۴۰	۴۰	۶۵	۰	۱/۶۰
۱۱	۳۵۰	۱۰	۱۰	۶۵	۱۰۰	۱/۳۶
۱۲	۱۰۰	۴۰	۱۰	۳۵	۰	۱/۰۰
۱۳	۳۵۰	۴۰	۱۰	۳۵	۱۰۰	۱/۶۴
۱۴	۱۰۰	۱۰	۱۰	۶۵	۰	۰/۱۶
۱۵	۳۵۰	۱۰	۱۰	۳۵	۰	۱/۴۲
۱۶	۱۰۰	۱۰	۴۰	۳۵	۰	۱/۲۹
۱۷	۱۰۰	۱۰	۴۰	۶۵	۱۰۰	۱/۵۴
۱۸	۳۵۰	۴۰	۴۰	۶۵	۱۰۰	۱/۹۰

در این طراحی با توجه به فرمول $m^n+m\times n+c$ (m: تعداد سطوح هر عامل، n: تعداد عامل‌های اصلی و c: تعداد نقاط مرکزی می‌باشد) در مجموع ۱۶ آزمایش انجام شد.

m=۲

n=۳

c=۲

$$۲^۳+(۲\times۳)+۲ =۱۶$$

عامل‌های اصلی شامل فشار، زمان استاتیک و زمان دینامیک می‌باشند. سطوح عامل فشار ۱۰۰ و ۳۵۰atm می‌باشد و با قرار دادن نقطه مرکزی، میانگین این دو فشار، یعنی ۲۲۵atm هم مورد بررسی قرار گرفت. عامل‌های زمان استاتیک و دینامیک در دو سطح ۱۰ و ۴۰min و همچنین

زمان ۲۵min به‌عنوان نقطه مرکزی توسط طراحی آماری مشخص شدند.

جدول ۲- طراحی مختلط مرکزی و بازدهی بدست آمده از استخراج تبائین توسط SFE

No	P (atm)	t_s (min)	t_d (min)	R (%W/W)
۱	۲۲۵	۲۵	۲۵	۱/۱۹
۲	۲۲۵	۲۵	۴۰	۱/۰۳
۳	۱۰۰	۱۰	۱۰	۰/۳۰
۴	۱۰۰	۴۰	۴۰	۱/۰۴
۵	۳۵۰	۱۰	۴۰	۲/۹۶
۶	۱۰۰	۴۰	۱۰	۱/۱۰
۷	۳۵۰	۴۰	۴۰	۲/۰۰
۸	۲۲۵	۲۵	۱۰	۱/۰۲
۹	۱۰۰	۱۰	۴۰	۱/۱۰
۱۰	۱۰۰	۲۵	۲۵	۱/۳۲
۱۱	۲۲۵	۱۰	۲۵	۱/۰۴
۱۲	۳۵۰	۴۰	۱۰	۱/۵۰
۱۳	۳۵۰	۲۵	۲۵	۱/۴۴
۱۴	۲۲۵	۴۰	۲۵	۱/۲۰
۱۵	۳۵۰	۱۰	۱۰	۱/۲۲
۱۶	۲۲۵	۲۵	۲۵	۱/۱۲

جدول ۲ سطوح مختلف هر فاکتور به همراه بازدهی استخراج تبائین به‌وسیله SFE را نشان می‌دهد.

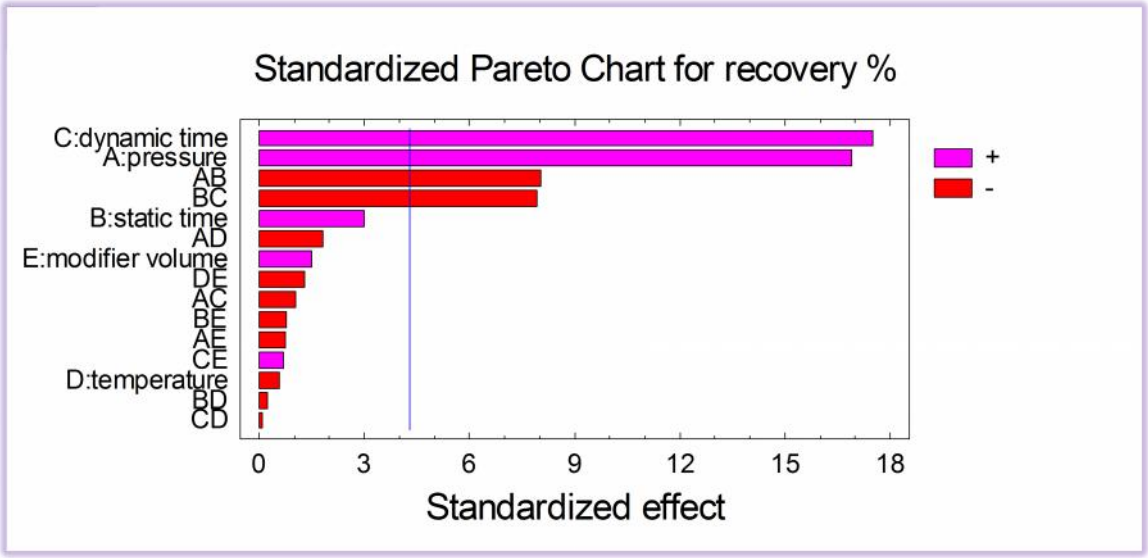
بیشترین بازدهی استخراج مربوط به آزمایش بهینه است که سطوح عامل‌های آن توسط طراحی آماری در مقدار بهینه قرار گرفته‌اند.

نتایج

بررسی اثر عامل‌های مختلف و تعیین عامل‌های اصلی

برای بدست آوردن تبائین با کیفیت و بازدهی بالا باید عامل‌های مؤثر بر استخراج SFE بهینه شوند. همان‌طور که قبلاً اشاره شد، در این تحقیق عامل‌های دما، فشار، زمان استخراج استاتیک، زمان استخراج دینامیک و حجم اصلاح‌گر اتانول به‌عنوان عامل‌های اصلی مؤثر بر کارایی و انتخاب‌گری استخراج مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به مقادیر بازدهی‌های استخراجی در آزمایش‌های مختلف مرحله طراحی فاکتوریال جزئی نیمه (جدول ۱) عامل‌هایی که بیشترین تأثیر را بر میزان استخراج داشتند، شناسایی شدند.

شکل ۲، نمودار پارتو استاندارد (Standardized Pareto Chart For Recovery %) را برای بازدهی‌های بدست‌آمده نشان می‌دهد.



شکل ۲- نمودار پارتو استاندارد برای درصد بازدهی

همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده‌است، با درصد اطمینان ۹۵٪، فاکتورهای A، C، AB و BC به‌عنوان فاکتورهای تأثیرگذار تعیین شدند. به‌طوری که A، B، C، D و E به‌ترتیب بیانگر عامل‌های فشار، زمان استاتیک، زمان دینامیک، دما و حجم اصلاح‌گر می‌باشند. طبق نمودار فشار و زمان دینامیک و برهم‌کنش بین دو عامل فشار و زمان استاتیک و برهم کنش بین دو عامل زمان دینامیک و زمان استاتیک بر بازدهی استخراج بیشترین تأثیر را دارند. با این تفاوت که فشار و زمان استخراج دینامیک اثر مثبت دارند و هر چه بیشتر باشند موجب افزایش میزان استخراج تبائین می‌شوند. اما برهم‌کنش‌های بین فشار و زمان استاتیک و بین زمان های دینامیک و استاتیک اثر منفی بر روی میزان استخراج دارند. بنابراین فشار و زمان دینامیک به‌عنوان عامل‌های مثبت و زمان استاتیک به‌عنوان عامل منفی در نظر گرفته شدند.

شکل ۳ نیز بیانگر اثر عامل‌های منفرد بر روی استخراج، بدون در نظر گرفتن برهم کنش بین آنها می‌باشد.

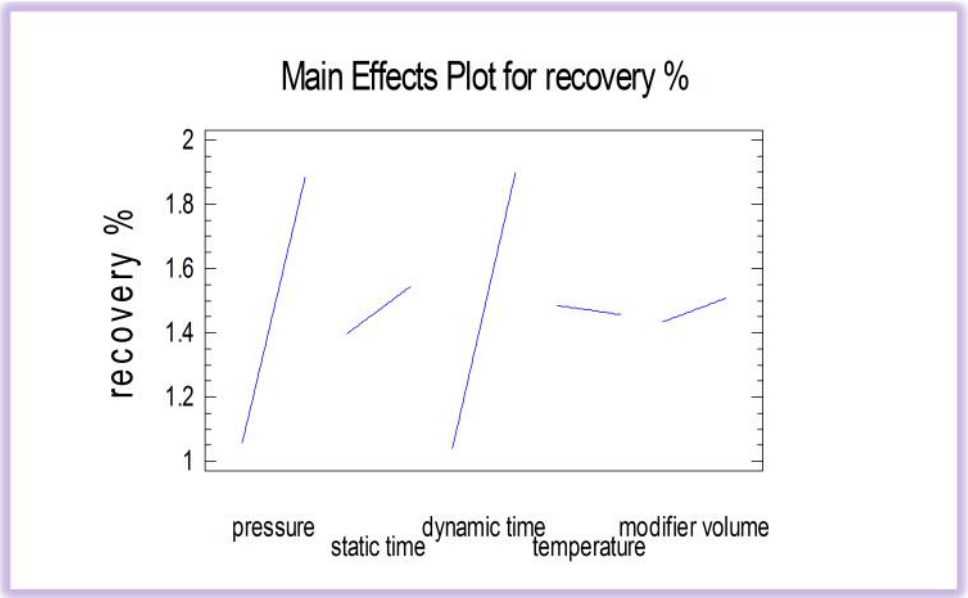
بررسی اثر فشار

اثر تغییرات فشار بر کارایی استخراج در شکل ۲ به‌خوبی نشان داده شده است. با افزایش فشار سیال، حلالیت ترکیب های موجود در گیاه و بازدهی استخراج افزایش می یابد. این افزایش حلالیت به دلیل حلال پوشی حلال است که از نیروهای جاذبه‌ای بین مولکول‌های حلال و حل شده ناشی می‌شود.

همان طور که انتظار می رود، بر طبق معادله گدینگ با افزایش فشار در دمای ثابت، دانسیته و قدرت حلالیت سیال CO_2 فوق بحرانی افزایش یافته، در نتیجه حلالیت ترکیب‌ها افزایش می‌یابد. نتایج نشان می‌دهد که در فرایند استخراج تبائین، فشار عامل تأثیرگذار بر بازدهی استخراج می‌باشد.

بررسی اثر دما

حلالیت با افزایش همزمان دانسیته و دما زیاد می‌شود. دما دو اثر متفاوت روی سیستم دارد. از یک جهت افزایش دما باعث کاهش دانسیته سیال و از جهت دیگر باعث افزایش فشار بخار گونه می‌شود.



شکل ۳- نمودار اثر عامل‌های مختلف بر روی درصد بازدهی استخراج

نقطه تقاطع (Crossover)، فشاری است که در آن حلالیت گونه مستقل از دما می باشد. قبل از رسیدن به نقطه تقاطع با افزایش دما اثر کاهش دانسیته بر افزایش فشار بخار گونه غالب است، در نتیجه حلالیت کم می شود. به‌عکس بعد از نقطه تقاطع افزایش دما با اثر غالب افزایش فشار بخار گونه و در نتیجه با افزایش حلالیت همراه است. به عبارت دیگر، دانسیته بعد از نقطه تقاطع وابستگی کمتری به دما دارد. در شکل ۳ اثر تغییرات دما بر روی کارایی استخراج گیاهان مورد آزمایش نشان داده شده‌است. نتایج بدست‌آمده نشان می دهند که در این تحقیق، دمای استخراج تأثیر چندانی بر روی بازدهی استخراج ندارد. یعنی اثر دما بر افزایش فشار بخار و کاهش دانسیته تقریباً با هم برابر بوده و اثر یکدیگر را خنثی می‌کنند.

بررسی اثر زمان استخراج استاتیک

همان طور که قبلاً اشاره شد، زمان استاتیک زمانی است که سیال برای مدت مشخصی در تماس با نمونه قرار می‌گیرد و گونه و سیال به تعادل می‌رسند، سپس ترکیب های استخراجی به بیرون از سل منتقل می شوند. نتایج نشان می دهند که در فرایند استخراج در کپسول خشخاش ایرانی زمان استخراج استاتیک به تنهایی تأثیر چندانی بر روی بازدهی استخراج ندارد و این بدان معنی است که حلالیت تبائین در سیال زیاد و زمان به تعادل رسیدن آنالیت و سیال کم می‌باشد.

بررسی اثر زمان استخراج دینامیک

در زمان استخراج دینامیک، سیال فوق بحرانی به‌صورت پیوسته از نمونه عبور می کند و ترکیب های استخراجی را به ظرف جمع‌آوری نمونه منتقل می کند. با افزایش زمان استخراج دینامیک، انتظار می‌رود که کارایی استخراج افزایش یابد. اما در برخی مواقع با افزایش زمان استخراج، همزمان با جدا شدن سیال و اصلاح‌گر از نمونه استخراج شده در لحظه جمع‌آوری نمونه، مقداری از آنالیت استخراجی نیز با آنها خارج و وارد فضا می شود، در نتیجه بازده استخراج تبائین را کاهش می دهد که این پدیده تحت عنوان کارایی جمع آوری نامیده می شود. البته نتایج بدست‌آمده طبق شکل ۲ نشان می دهد که زمان استخراج دینامیک تأثیر مثبتی بر روی بازدهی استخراج دارد.

بررسی اثر اصلاح گر

هنگامی که استخراج با CO_2 خالص کارایی لازم را ندارد، افزودن اصلاح گر باعث افزایش کارایی استخراج می شود. دو دلیل عمده برای استفاده از اصلاح گر وجود دارد: الف) اصلاح گر حلالیت مولکول‌های آنالیت را در سیال فوق بحرانی CO_2 با تغییر قطبیت سیال تغییر می دهد، ب) اصلاح گر می‌تواند با بافت نمونه برهم‌کنش کند و سرعت نفوذ سیال را در بافت نمونه افزایش دهد که این عمل باعث افزایش مکان های فعال برای انحلال آنالیت در سیال و در نتیجه افزایش بازدهی استخراج می‌شود.

اصلاح گر اتانول به‌صورت مستقیم به نمونه اضافه شد. نتایج بدست‌آمده در فرایند استخراج های انجام شده نشان دادند که حجم اصلاح گر اتانول تأثیر چندانی بر روی بازدهی استخراج کپسول خشخاش ایرانی ندارد.

انتخاب شرایط بهینه به‌وسیله CCD

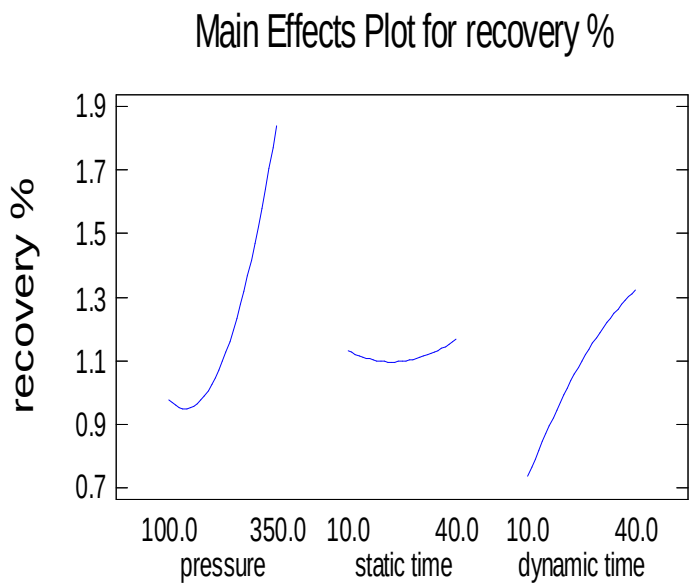
با انتخاب سه عامل فشار، زمان استخراج دینامیک و استاتیک به‌عنوان عامل‌های اصلی، و ثابت در نظر گرفتن دو عامل دما و حجم اصلاح گر می توان با به حداقل رساندن تعداد آزمایش ها به مقادیر بهینه برای افزایش بازدهی استخراج دست یافت.

جدول ۲ مربوط به طراحی مختلط مرکزی (CCD) نشان‌دهنده آزمایش‌های طراحی شده و بازدهی‌های مربوط به آنها می‌باشد.

بررسی اثر عامل‌های مهم

شکل ۴ نمودار اثر عامل‌ها را برای درصد بازده استخراج نشان می دهد. این نمودار نیز اثر افزایشی فشار و زمان استخراج دینامیک بر روی بازدهی را نشان می دهد. در حالی‌که زمان استاتیک نیز به مقدار بسیار جزئی باعث افزایش بازدهی استخراج می‌شود.

همان‌طور که نشان داده شده‌است با افزایش فشار همچنان بر میزان بازدهی استخراج تبائین افزوده می‌شود.



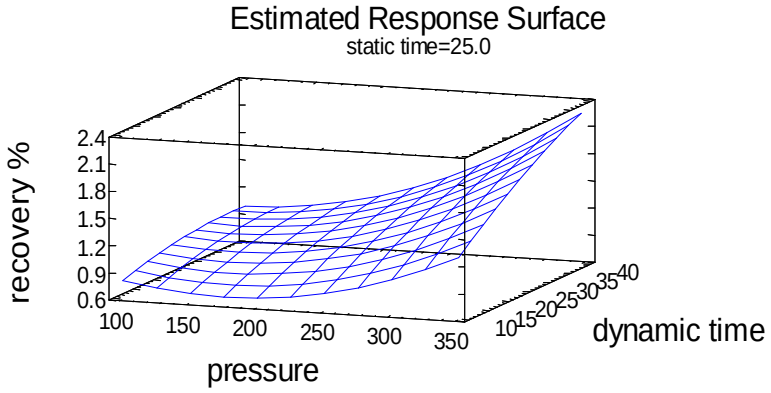
شکل ۴- نمودار اثر عامل‌های اصلی بر درصد کارایی

افزایش زمان استخراج دینامیک بیشتر از ۴۰ دقیقه نیز باعث افزایش استخراج می‌شود. اما بررسی‌های انجام شده نشان داد که این افزایش بازدهی بسیار کم است و برای جلوگیری از به هدر رفتن آنالیت استخراج شده و همچنین با توجه به اینکه زمان استخراج کوتاه‌تر یکی از مزایای استخراج با SFE می‌باشد، از افزایش زمان بیش از ۴۰ دقیقه خودداری شد.

بررسی برهم‌کنش عامل‌ها با یکدیگر

گفته شد که با روش آنالیز آماری علاوه‌بر بررسی اثر عامل‌ها به‌صورت مستقل، می‌توان تأثیر برهم‌کنش عامل‌ها را بر روی بازدهی نیز بررسی کرد. در شکل ۵ برهم‌کنش عامل‌های مختلف با یکدیگر به‌صورت سه بعدی نشان داده شده‌است.

این نمودار بیانگر برهم‌کنش‌های فشار و زمان دینامیک است. برهم‌کنش این دو عامل با ثابت گرفتن زمان استاتیک، تأثیر مثبت و افزایش دهنده بر روی بازدهی استخراج دارد. در شکل ۵ دیده می‌شود تنها در صورتی‌که این دو عامل در بیشترین مقدار خود باشند بیشترین بازدهی بدست می‌آید.



شکل ۵- نمودار سه بعدی سطح پاسخ تخمین زده شده به‌منظور بررسی اثر برهم‌کنش فشار و زمان دینامیک بر روی درصد کارایی

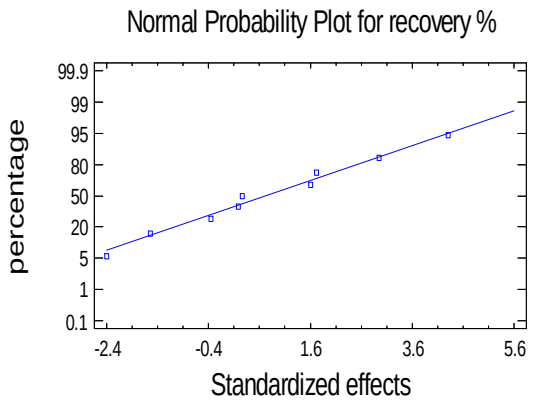
مقادیر بهینه زیر پس از طراحی CCD بدست آمدند:

t_s=۱۰min و t_d=۴۰min ،P=۳۵۰atm

تحت این شرایط حداکثر بازدهی برای استخراج تبائین، ۲/۹۶٪ می‌باشد.

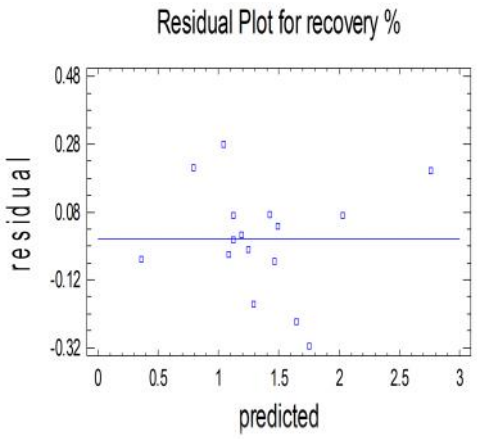
نمودار نرمال (Normal Plot)

برای کسب اطمینان از مناسب بودن مدل فرضی و بررسی نتایج آزمون، نرمال بودن مدل با رسم نمودار نرمال باقی‌مانده‌ها (Residuals) بررسی شد. این نمودار در شکل ۶ آورده شده‌است. این نمودار نشان می‌دهد که آیا باقی‌مانده‌ها از یک توزیع نرمال پیروی می‌کنند یا خیر. در این نمودار نشان داده شده‌است که تقریباً همه مقادیر مربوط به باقی‌مانده‌ها، روی خط می‌باشند. این امر نشانگر این مطلب است که توزیع باقی‌مانده‌ها به صورت نرمال می‌باشد.



شکل ۶- نمودار نرمال باقی‌مانده‌ها

در شکل ۷ نمودار باقی‌مانده برحسب مقادیر پیش‌بینی شده آورده شده‌است. توزیع نتایج به‌صورت پراکنده در دو سوی خط میانی در این نمودار، نشانگر عدم وجود خطای سیستماتیک در آزمایش می‌باشد.



شکل ۷- نمودار باقی‌مانده‌ها بر حسب مقادیر پیش‌بینی شده

آنالیز واریانس

در جدول ۳ نتایج حاصل از آنالیز واریانس آورده شده‌است. به‌منظور بررسی اهمیت هر عامل، مقدار P (p-Value) در سطح اطمینان ۹۵٪ بررسی شد. اگر مقدار p کمتر از ۰/۰۵ باشد، این امر نشان‌دهنده مهم بودن مدل و ترم‌هایش می‌باشد و اگر بیشتر از این مقدار باشد، به معنی عدم اهمیت آنهاست.

در اینجا دو عامل فشار و زمان استخراج دینامیک، مقدار p کمتر از ۰/۰۵ دارند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این دو عامل با سطح اطمینان ۹۵٪ از صفر متفاوت هستند و حائز اهمیت می‌باشند.

معادله زیر بیانگر مدل ریاضی بدست آمده می‌باشد:

Recovery%= ۰/۰۷۷۱۲۹۹ - ۰۰۵۷۷۹۴۹* pressure + ۰/۰۴۰۳۱۹۵* static time+۰/۰۴۱۵۸۶۲ * dynamic time+۰/۰۰۰۰۱۹۸۹۵۲* pressure^2- ۰/۰۰۰۰۹۲*pressure*static time+ ۰/۰۰۰۱۰۲۶۶۷* pressure*dynamic time+۰/۰۰۰۲۲۶۰۵۴* static time^2- ۰/۰۰۱۱۸۸۸۹* static time * dynamic time-۰/۰۰۰۳۰۷۲۸ * dynamic time^2

جدول ۳- نتایج حاصل از آنالیز واریانس فشار و زمان استخراج

P-Value	F- Ratio	Mean Square	D.f	Sum of squares	source
۰/۰۰۵۰	۱۸/۵۹	۱/۸۴۹۰	۱	۱/۸۴۹۰	A: pressure
۰/۸۶۲۷	۰/۰۳	۰/۰۰۳۲	۱	۰/۰۰۳۲	B: Static time
۰/۰۲۵۷	۸/۶۹	۰/۸۶۴۳	۱	۰/۸۶۴۳	C: dynamic time
۰/۱۶۰۶	۲/۵۶	۰/۲۵۴۷	۱	۰/۲۵۴۷	AA
۰/۱۷۲۸	۲/۳۹	۰/۲۳۸۰	۱	۰/۲۳۸۰	AB
۰/۱۳۵۰	۲/۹۸	۰/۲۹۶۴	۱	۰/۲۹۶۴	AC
۰/۸۰۲۲	۰/۰۷	۰/۰۰۶۸	۱	۰/۰۰۶۸	BB
/۰۵۳۴	۵/۷۶	۰/۵۷۲۴	۱	۰/۵۷۲۴	BC
۰/۷۳۴۰	۰/۱۳	۰/۰۱۲۶	۱	۰/۰۱۲۶	CC
		۰/۰۹۹۴	۶	۰/۵۹۶۷	Total erroe
			۱۵	۴/۷۷۸۰	Total (corr)

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که برای بهینه‌سازی شرایط استخراج از طراحی مرکب مرکزی (CCD) پس از یک مرحله غربال‌گری، شرایط استخراج شامل فشار ۳۵۰ atm، دما ۳۵°C، زمان استخراج استاتیک ۱۰min، زمان استخراج دینامیک ۴۰min و بدون اصلاح‌گر را به‌عنوان شرایط بهینه پیش‌بینی کرد و در شرایط بهینه بازدهی استخراج ۰/۹۶٪ بدست آمد.

به‌طور کلی، از آنجایی که غلظت ترکیب‌هایی موجود در گیاهانی که از نظر داروشناسی فعال هستند بسیار پایین می‌باشد، بنابراین برای استخراج این ترکیب‌ها از مواد اولیه، نیاز به یک روش استخراج مؤثر و کارآمد می‌باشد. استخراج با استفاده از سیال فوق بحرانی دارای عامل‌های زیاد قابل کنترل برای افزایش گزینش‌پذیری استخراج می‌باشد، از این‌رو یکی از بهترین روش‌های استخراج ترکیب‌های موجود در گیاهان محسوب می‌شود. این روش در مقایسه با سایر روش‌های استخراجی، به مقدار کمتری از نمونه نیاز دارد و در زمان کوتاه‌تری استخراج انجام می‌شود. در این کار، روش SFE برای استخراج تبائین از کپسول خشخاش ایرانی بکار گرفته شد.

منابع مورد استفاده

- Ara, M.K., Karami, M. and Raofie, F., 2014. Application of response surface methodology for the optimization of supercritical carbon dioxide extraction and ultrasound-assisted extraction of *Capparis spinosa* seed oil. The Journal of Supercritical Fluids, 85: 173-182.
- Barber, R.B. and Rapoport, H., 1976. Conversion of thebaine to codeine. Journal of Medicinal Chemistry, 19(10): 1175-1180.
- Daneshvand, B., Ara, K.M. and Raofie, F., 2012. Comparison of supercritical fluid extraction and ultrasound-assisted extraction fatty acids from quince (*Cydonia oblonga* Miller) seed using response surface methodology and central composite design. Journal of Chromatography A, 1252: 1-7.
- Ghasemi, E., Raofie, F. and Najafi, M.N., 2011. Application of response surface methodology and central composite design for the optimisation of supercritical fluid extraction of essential oils from *Myrtus communis* L. leaves. Food Chemistry, 126(3): 1449-1453.
- Kuppers, F., Salemink, C., Bastart, M. and Paris, M., 1976. Alkaloids of *Papaver bracteatum* presence of codeine neopine and alpinine. Phytochemistry, 15(3): 444-445.
- Lalezari, I., Nasseri, P. and Asgharian, R., 1974. *Papaver bracteatum* Lindl.: population AryaII. Journal Parmaceutical Scince, 63(8): 1331-1335.
- Maghssodi, R.H. and Fawzi, A.B., 1978. Direct spectrophotometer determination of thebaine in arya II population capsule of *Papaver bracteatum* Lindl. Journal of Pharmaceutical Sciences, 67: 32-35.
- Ramandi, F.N., Najafi, M.N., Raofie, F. and Ghasemi, E., 2011. Central Composite design for the optimization of supercritical carbon dioxide fluid extraction of fatty acids from *Borago officinalis* L. flower. Journal of Food Science, 76(9): 1262-1266.
- Shan, B., Xie, J-H, Zhu, J-H. and Peng, Y., 2012. Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from *Momordica charantia* L. and its antioxidant activity. Food and Bioproducts Processing, 90(3): 579-587.

Extraction of thebaine from *Papaver bracteatum* Lindl. Capsule using supercritical fluid CO_2

M. Ashrafkhorasani[1] and F. Raofie[2*]

1- Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
E-mail: f_raofie@sbu.ac.ir

Received: June 2014 Revised: November 2014 Accepted: November 2014

Abstract

Papaver bracteatum Lindl. is an Iranian native plant. *Papaver bracteatum* has red flowers and deep leaves; the end of leaves close to sepals is black in color. The plant has a length of 20 to 120 centimeter, growing wild in nature.The capsules of this plant contain thebaine. Thebaine can be converted to different types of painkiller in a simple reaction. In this project for the first time, thebaine was extracted from *Papaver bracteatum* using super critical fluid with high efficiency. The extracted thebaine was separated and identified using high performance liquid chromatography with UV detector (HPLC-UV). To optimize the extraction condition, a central composite design was used after a 2^{n-1} fractional factorial design. This model predicted the extraction conditions i.e. 350 atm pressure, 35°C temperature, static and dynamic time of 10 min and 40 min, respectively, and 100µL volume of modifier (ethanol). Under optimum condition, the efficiency of extraction was predicted to be 2.96%.

Keywords: *Papaver bracteatum* Lindl., thebaine, super critical fluid, extraction.