

بررسی پارامترهای موثر بر استخراج تیمول از دانه‌های زنیان

مریم خواجه نوری، علی حقیقی اصل^{۱*}

دانشگاه سمنان، دانشکده مهندسی شیمی، نفت و گاز

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۹/۲۶ تاریخ تصحیح: ۹۴/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۳۰

چکیده

اسانس‌ها ترکیبات معطر فراری هستند که در گیاهان یافت می‌شوند. روش استخراج اسانس‌های گیاهی می‌تواند راندمان استخراج، درصد و نوع ترکیبات شیمیایی موجود در آن را تغییر دهد. در این تحقیق، اسانس حاصل از دانه‌های گیاه زنیان با استفاده از آب دمای زیر بحرانی استخراج و ترکیب‌های شیمیایی اسانس به روش GC و GC-MS تجزیه و تحلیل شدند. اثر پارامترهای مختلف بر استخراج با آب دمای زیر بحرانی مانند دما، دبی جریان آب و توزیع اندازه ذرات با کمک روش طراحی آزمایش تاگوچی بررسی شد. شرایط بهینه از آنالیز نسبت S/N به ترتیب در دمای ۱۷۵ درجه سلسیوس، دبی جریان ۲ میلی‌لیتر در دقیقه و توزیع اندازه ذرات ۰/۲۵ میلی‌متر به دست آمد.

واژگان کلیدی: زنیان، تیمول، استخراج با آب دمای زیر بحرانی، روش تاگوچی، نسبت S/N.

۱- مقدمه

اسانس‌ها^۱ ترکیبات معطر فراری هستند که در گیاهان یافت می‌شوند. این ترکیبات آروماتیک در صنایع عطر، دارویی و غذایی استفاده گسترده‌ای دارند. برخی اسانس‌ها به دلیل خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضدقارچی شناخته شده هستند [۱]. برای قرن‌هاست که جداسازی، تغلیظ و خالص‌سازی اسانس‌ها فرآیند مهمی است. روش‌های معمول استخراج مانند استخراج مایع-مایع^۱، روش فراصوت^۲ و استخراج سوکسله^۳، با مصرف مقدار زیادی از حلال‌های آلی زیان‌آور همراه هستند و اغلب از بازده پایین، زمان استخراج طولانی و باقی مانده‌های حلال‌های آلی در عصاره نهایی برخوردار هستند [۲، ۳].

¹ Essential oils

¹Liquid Liquid Extraction (LLE)

²Sonication

³Soxhlet extraction

امروزه بر استفاده از روش‌هایی تأکید می‌شود که کمترین مقدار حلال آلی را مورد استفاده قرار می‌دهند و یا به طور کلی از حلال‌های آلی استفاده نمی‌کنند.

به منظور کاهش استفاده از حلال‌های آلی، استخراج آب دمای زیر بحرانی^۱ یک روش استخراج با حلال سبب است که موجب بکارگیری آب تحت فشار در دمای بالا و شرایط فشار کنترل شده می‌شود. در میان حلال‌هایی که در استخراج مواد بکار برده می‌شوند، آب به سبب داشتن پیوندهای هیدروژنی قوی در ساختار خود، یک حلال با ویژگی‌های منحصر بفرد می‌باشد. وجود این پیوندها آب را به حلال قطبی با ثابت دی‌الکتریک بالا در دماهای معمول تبدیل کرده است که تنها می‌تواند در استخراج مواد قطبی بکار رود [۲]. مطالعات محققان مختلف نشان داده که با افزایش دما و اعمال فشار خاص، قطبیت آب می‌تواند نزدیک به دسته‌ای از الکل‌ها تغییر کند. به عنوان مثال، در دمای ۲۲۰ درجه سلسیوس، ثابت دی‌الکتریک آب برابر ۳۰ است که مشابه با ثابت دی‌الکتریک متانول در دمای اتاق می‌باشد [۴،۵].

اصطلاح "آب دمای زیر بحرانی" به معنی منطقه فاز چگالش آب بین محدوده‌ی دمایی ۱۰۰ (نقطه جوش آب) تا ۳۷۴ درجه سلسیوس (نقطه بحرانی آب) استفاده شده است. به عبارتی دیگر، در هر دمایی فشار سیستم طوری تنظیم می‌شود که آب در فاز مایع بماند. اصطلاحات رایج دیگر مانند "آب داغ تحت فشار"، "آب فوق داغ" و "آب دما بالا" نیز استفاده شده‌اند [۶].

زنیان با نام علمی تراکی اسپرموم آمی^۲ گیاهی است علفی و یکساله از خانواده چتریان که به نام کاروم کاپتیکوم^۳ هم معروف است. زنیان گیاهی است بی‌کرک به ارتفاع ۳۰ تا ۹۰ سانتی‌متر که به حالت خودرو در نواحی شرقی هند، ایران و مصر می‌روید. برگ‌هایی با پهنک منقسم به بریدگی‌های نازک و ظریف و گل‌هایی به رنگ سفید و مجتمع به صورت چتر مرکب دارد. بخش دارویی این گیاه را میوه تشکیل می‌دهد.

میوه گیاه بر حسب مناطق رویش آن، دارای ۴-۲ درصد اسانس روغنی فرار است که با نام "آجوان"^۴ شناخته می‌شود و بخش اصلی آن را تیمول^۵ تشکیل می‌دهد که یک ضد عفونی‌کننده قوی و معروف است [۷]. این اسانس ظاهری بی‌رنگ یا مایل به قهوه‌ای دارد. تیمول جزء ترکیبات اکسیژن‌دار است که بسیار معطر می‌باشد. در تجزیه بذر زنیان ایرانی ترکیبات تیمول، سایمن^۶، بتاپینن^۷، گاماترپینن^۸ و اتیلن متاکریلات^۹ گزارش شده است [۸]. در تحقیقات قبلی نشان داده شده که استخراج با آب دمای زیر بحرانی شیوه توانمندی در استخراج ترکیبات اسانس زنیان (بویژه ترکیب عمدۀ تیمول) نسبت به دو شیوه متداول

^۱Subcritical Water Extraction (SWE)

^۲Trachyspermum ammi (T. ammi)

^۳Carumcopticum

^۴Ajowan

^۵Thymol

^۶Cymene

^۷Betepinene

^۸ γ -terpinene

^۹Ethylene methacrylate

تقطیر آبی و سوکسله می‌باشد [۹،۱۰]. هدف از این پژوهش تعیین شرایط بهینه برای افزایش بازده استخراج تیمول از گیاه زنیان با روش استخراج آب دمای زیر بحرانی با استفاده از طراحی آزمایش تاگوچی است. روش تاگوچی، به عنوان یکی از قدرتمندترین ابزار طراحی آزمایش بکار گرفته شده است.

۲- مواد و روش‌ها

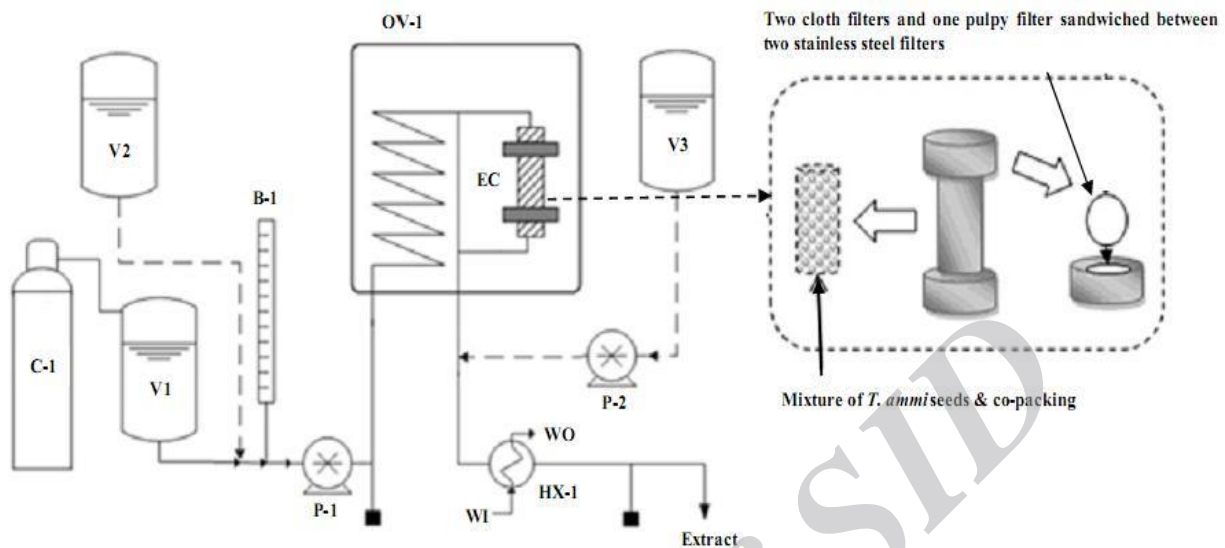
زمان و محل جمع‌آوری گیاه مورد نظر خرداد ماه ۱۳۹۰ در شیراز بود و دانه‌های زنیان پس از خشک شدن در دمای 25°C ، در کیسه‌های پلی اتیلنی تا زمان استخراج در دمای 20°C - نگهداری شدند. ما این گیاه را به صورت خشک شده از شرکت باریج اسانس کاشان تهیه کردیم. تیمول (Merck, Germany, 99.99%)، NaCl و Na_2SO_4 (Merck, Germany)، پنتان نرمال (Merck, Germany, 95%) و هگزان (Merck, Germany, HPLC grade) به ترتیب به عنوان استاندارد داخلی، شکننده محلول کلوئیدی، جاذب آب، جداکننده در استخراج مایع- مایع عصاره‌های آبی و رقیق کننده اسانس قبل از تزریق به GC¹ استفاده شدند. آب مقطر بدون گاز خالص شده توسط واحد یون زدایی (Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) به عنوان عامل استخراج کننده استفاده شد.

۳- سیستم استخراج با آب دمای زیر بحرانی

آزمایش‌های استخراج با آب دمای زیر بحرانی با استفاده از تجهیزات نشان داده شده در شکل ۱ انجام شدند. دستگاه دارای دو مخزن شیشه‌ای و مدرج برای خوراک آب دیونیزه و یا حلال هگزان می‌باشد. آب دی یونیزه در مخزن ۱-۷ به مدت ۲ ساعت با کپسول گاز نیتروژن برای حذف اکسیژن حل شده در آب پاکسازی شد. پمپ فشار قوی (P-1) از نوع HPLC برای تأمین فشار و انتقال آب به داخل سیستم در دبی‌های جریان مورد نظر استفاده شده است. خروجی پمپ می‌تواند در سرعت‌های جریان مورد نیاز با استفاده از بورت مجهز شده در ورودی خط لوله با دقت ± 0.1 mL چک شود. مارپیچ پیش گرمایش، ظرف استخراج کننده و سه شیر سوزنی در آن حاوی فنی که برای کارکردن در دماهای بالا تا 200°C طراحی شده است، قرار گرفته‌اند. مارپیچ پیش گرمایش از جنس لوله استیل ضد زنگ SS316 با طول ۳ m برای پیش گرم کردن آب استفاده شده است. استخراج کننده شامل محفظه استخراج استوانه‌ای استیل ضد زنگ (۱۲۰ mm \times ۱۲ i.d.mm) است. دو شیر سوزنی روی خط ورود و خروج استخراج کننده نصب شده‌اند و یک شیر سوزنی به عنوان خط کنار گذر استفاده شده است. فشار و دما در قبل و بعد از ظرف استخراج قابل اندازه‌گیری است. برای جلوگیری از اتلاف حرارتی اسانس داغ خروجی از آن، مبدل حرارتی دو لوله‌ای (اندازه لوله ۴۵/۷۲ mm o.d. \times ۳۰/۴۸ mm i.d.)، مساحت سطح انتقال حرارت 75 cm^2 بکار گرفته شده که با آب

¹ Gas Chromatography (GC)

شهری با دمای 15°C و دبی جریان 3 L/min سرد می‌شود تا عصاره خروجی از آن را تا دمای 20°C سرد کند. محصول خروجی وارد شیشه جمع آوری نمونه می‌شود.



شکل ۱. شماتیک از سیستم SWE: C-1: سیلندر نیتروژن، V-1: مخزن آب، V-2: مخزن حلال، V-3: مخزن حلال باقیمانده، B-1: بورت، P-1, 2: پمپ‌ها، EC: سلول استخراج، HX-1: مبدل حرارتی، OV-1: اون، WI: آب ورودی، WO: آب خروجی.

یک عدد میکروفیلتر $140\ \mu\text{m}$ (SS316, Nupro Co., USA) برای حفاظت از پمپ HPLC و شیر تنظیم کننده فشار استفاده شد. تنظیم و کنترل فشار تا حد 35 bar در دستگاه توسط یک عدد رگلاتور از نوع شیر تنظیم کننده فشار معکوس^۱ از جنس SS316 صورت می‌گیرد.

۴- انتخاب پارامترهای مؤثر برای انجام آزمایشات

با توجه به مطالعه کاربردهای آب دمای زیر بحرانی در زمینه استخراج اسانس‌ها [۱۵-۱۱]، شرایط عملیاتی که ممکن است در مقدار بازده استخراج مؤثر باشند عبارتند از: فشار، دما، توزیع اندازه ذرات، زمان و دبی جریان آب. مطالعات انجام شده در مورد استخراج اسانس گیاهان مختلف با فشارهای بالا مؤید این مطلب است که تا زمانی که آب در حالت مایع قرار دارد، فشار، تغییر مهمی در میزان و نوع ترکیبات اسانس استخراج شده ایجاد نمی‌کند [۱۶، ۱۵، ۲]. بنابراین در تمام استخراج‌ها فشار 20 bar را انتخاب کردیم.

¹ Back pressure regulator

جدول ۱ مقادیر هر یک از پارامترها را با نمادگذاری در سه سطح ۱، ۲ و ۳ نشان می‌دهد. سطوح مورد نظر با توجه به محدوده عملیاتی متداول آن‌ها که در منابع مختلف ذکر گردیده، انتخاب شد.

جدول ۱. سطح‌ها و فاکتورها برای طراحی آزمایشات در فشار ۲۰ bar

اندازه ذرات (mm)	دبی جریان (mL/min)	دما (°C)	سطح متغیر
۰/۲۵	۱/۰	۱۰۰	۱
۰/۵	۲/۰	۱۵۰	۲
۱/۰	۴/۰	۱۷۵	۳

به منظور طراحی آزمایش‌ها و آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار Qualitek-4 (نسخه ۱۵/۶/۱) استفاده شد [۱۷]. آزمایش‌های طراحی شده به صورت یک جدول با ۹ آزمایش (L9) (سه فاکتور در سه سطح)، در جدول ۲ بیان شده است.

جدول ۲. آزمایش‌های طراحی شده با استفاده از روش تاگوچی.

اندازه ذرات (mm)	دبی جریان (mL/min)	دما (°C)	شماره آزمایش
۰/۲۵	۱/۰	۱۰۰	۱
۰/۵	۲/۰	۱۰۰	۲
۱/۰	۴/۰	۱۰۰	۳
۰/۵	۱/۰	۱۵۰	۴
۱	۲/۰	۱۵۰	۵
۰/۲۵	۴/۰	۱۵۰	۶
۱/۰	۱/۰	۱۷۵	۷
۰/۲۵	۲/۰	۱۷۵	۸
۰/۵	۴/۰	۱۷۵	۹

در روش تاگوچی برای تحلیل آماری و دقیق‌تر نتایج، از یک تابع پاسخ تبدیل یافته (S/N) به صورت نسبت علامت هر اثر (S) به اثرات ناشی از خطا (N) استفاده می‌شود. مزیت استفاده از این پاسخ جدید در تحلیل آماری، نسبت به شکل اولیه پاسخ، مقایسه بزرگی اثرات ناشی از هر عامل اصلی با اثرات ناشی از عوامل خطا و اغتشاش در اندازه‌گیری است، که در نتیجه منجر به برداشت دقیق‌تری از تاثیر واقعی عوامل بر سیستم خواهد شد [۱۴، ۱۵]. این نسبت پراکندگی حول یک مقدار مشخصه را بیان می‌کند هر چند نسبت فوق بیشتر باشد پراکندگی کمتر خواهد بود. نحوه محاسبه نسبت S/N بسته به این که هدف چه نوع بهینه‌سازی باشد، متفاوت خواهد بود. از آن‌جا که در این مطالعه پاسخ در نظر گرفته شده درصد استخراج تیمول از دانه زنیان می‌باشد، نسبت S/N به صورت معادله ۱ محاسبه می‌گردد:

$$\frac{S}{N} = -10 \log \frac{\left(\frac{1}{Y_1^2} + \frac{1}{Y_2^2} + \dots + \frac{1}{Y_n^2} \right)}{n}$$

در این معادله Y_n مقدار پاسخ اندازه‌گیری شده برای هر آزمایش در هر آزمون و n تعداد تکرار آزمایش‌ها (برابر با ۲) می‌باشد.

۵- آزمایش‌های استخراج با آب دمای زیر بحرانی

۱۰۰ گرم بذر زنیان خشک و نگهداری شده در دمای 70°C ، با آسیاب خرد و با الک‌های استاندارد با مش‌های ۱۸، ۳۵ و ۶۰ (معادل با متو وسط اندازه ذرات ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ mm) الک شدند و طبق جدول آزمایش‌های طراحی شده میزان یک گرم در هر آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. سایر پارامترها مانند زمان استخراج و نسبت وزن نمونه به گلوله‌ها به ترتیب ۱۵۰ min و ۱:۱/۵ ثابت در نظر گرفته شدند. نمونه گیاه در کیسه‌ای قرار داده و درون سل گذاشته شد. به منظور پیشگیری از حرکت ذرات در بستر جامد، دو لایه فیلتر فلزی و پارچه‌ای و یک لایه فیلتر کاغذی در بالا و پایین سل قرار داده شد.

با باز کردن سه شیر سوزنی موجود در آون، بستن شیر خط پایانی تنظیم کننده و با پمپ کردن آب به طور پیوسته با دبی ۴ mL/min سیستم به فشار ۲۰ bar رسید. بعد از آن پمپ خاموش شده، شیر کنار گذر بسته و آون روی دمای مورد نیاز تنظیم شد. این عملیات حدود ۲۰ min طول کشید. سپس پمپ روشن و دبی جریان روی مقدار مورد نیاز توسط پمپ تنظیم شد. به سبب دبی جریان انتخابی و حجم خالی بین محفظه استخراج کننده و ظرف جمع‌آوری عصاره در سیستم (حدود ۴۰ mL)، در همه اجراها، حدود ۳۰ mL ابتدایی آب خروجی از سیستم را دور ریخته و زمان استخراج از آن لحظه به بعد شروع می‌شد. با استفاده از آنالیز GC اثبات شد که مقدار ابتدایی عاری از هر ترکیبی بوده است. برای آزمایش‌های سینتیکی، ظرف جمع‌آوری عصاره در فاصله‌های زمانی ۳۰ min جا به جا شدند.

بعد از جمع‌آوری حجم مورد نیاز عصاره، مرحله‌ی استخراج مایع-مایع با استفاده از پنتان نرمال انجام شد. ابتدا در عصاره محلول ۲۵٪ آب نمک به منظور آسان کردن شکستن محلول کلئیدی درست شد و سپس استخراج‌ها با دو حجم مساوی حلال در دو مرحله انجام شد. نسبت حجمی پنتان نرمال به عصاره در تمام آزمایش‌ها ۲:۱ بود. برای جدا کردن حلال آلی از اسانس حاصله، نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه زیر هود قرار داده شدند. سپس اسانس حاصل از هر کدام نمونه‌ها وزن و در ۱ میلی لیتر حلال هگزان تا قبل از آنالیز توسط GC نگه داری شدند.

۶- تجزیه و آنالیز مواد استخراج شده

جداسازی و شناسایی اسانس به دست آمده با استفاده از کروماتوگرافی گازی (ACME 6100, 6000 series) و کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی (Varian 3400, Walnut Creek, USA) انجام شد. واحد GC مجهز به ستون مویرگی Roham Gas (TRB-WAX (60 m × 0.25 mm i.d.) با یک فیلم پلی اتیلن گلیکول به ضخامت ۰/۵ μm بود. گاز حامل هلیوم (Roham Gas

با دبی ۱ mL/min استفاده شد. GC تحت شرایط برنامه دمایی از ۵۰ (۲ min) به ۲۳۰ (۱۰ min) درجه سلسیوس با سرعت ۴ °C/min و حالت نسبت تزریق Split less بکار گرفته شد. حجم ۱/۱۰ μL عصاره هگزان با استفاده از سرنگ تزریق شد. فشار سرستون ۰/۳۳ بار و دمای آشکارساز و تزریق کننده هر دو ۲۴۰ درجه سلسیوس بود. آنالیز GC-MS با کروماتوگرافی گازی مدل ۳۴۰۰ Varian مجهز شده به ستون سیلیکایی DB-5 (ضخامت لایه ۰/۲۵ μm و ۳۰ m × ۰/۲۵ mm i.d) انجام شد. انرژی یون زایی ۷۰eV، محدوده جرمی ۴۰-۴۰۰ amu و شیوه اسکن EI بود. GC-MS تحت شرایط برنامه دمایی از ۴۰ به ۲۰۰ درجه سلسیوس با سرعت ۳ °C/min و حالت نسبت تزریق ۱:۳۰ بکار گرفته شد. دمای آشکارساز در ۲۴۰ درجه سلسیوس تنظیم شده بود. درصد اجزای شناسایی شده از مساحت پیک GC و منحنی‌های استاندارد قابل محاسبه بود. ترکیبات با مقایسه زمان‌های ماندگاری و طیف جرمی آن‌ها با اجزاء مرجع خالص شناسایی شدند. برای کالیبراسیون دستگاه GC، ابتدا غلظت‌های ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۶ و ۱/۲ میلی‌گرم به میلی‌لیتر تیمول در هگزان تهیه و به دستگاه GC تزریق شد. سپس با استفاده از سطح زیر منحنی کروماتوگرام‌های حاصله، منحنی استاندارد تیمول رسم شد و معادله حاصل از برازش در مرحله کالیبراسیون ($R^2 = 0/999$) بدست آمد.

۷- نتایج

آزمایشات طراحی شده در جدول (۲) هر کدام دو مرتبه تکرار شدند و اسانس‌های بدست آمده هر کدام سه مرتبه به GC تزریق شدند و با توجه به منحنی کالیبراسیون، بازده تیمول در اسانس (g/g dry sample) بدست آمد و در نهایت نتایج توسط نرم‌افزار Qualitek-4 انجام شد. نتایج بدست آمده، متوسط نتایج و نسبت S/N در جدول ۳ گزارش شد.

جدول ۳. داده‌های بازده استخراج تیمول از بذر زنیان.

شماره آزمایش	میزان درصد جرمی ترکیب تیمول (g/g dry sample)		میانگین نتایج	میانگین مربعات انحراف (MSD)	نسبت S/N
	بازده اجرا اول	بازده اجرا دوم			
۱	۱/۱۸۳	۱/۰۶۳	۱/۱۲۳	$7/9976 \times 10^{-1}$	۰/۹۷
۲	۰/۷۳۴	۰/۸۰	۰/۷۶۷	۱/۷۰۹۳	-۲/۳۲۹
۳	۰/۸۲۳	۰/۷۷	۰/۷۹۶	۱/۵۸۱۵	-۱/۹۹۱
۴	۰/۷۱۱	۰/۶۲	۰/۶۶۵	۲/۲۸۹۸	-۳/۵۹۸
۵	۰/۸۷۷	۰/۹۳۶	۰/۹۰۶	۱/۲۲۰۸	-۰/۸۶۷
۶	۱/۸۲۵	۱/۷۶۷	۱/۷۹۶	$3/1026 \times 10^{-1}$	۵/۰۸۲
۷	۰/۷۸۶	۰/۸۳۲	۰/۸۰۹	۱/۵۳۱۶	-۱/۸۵۲
۸	۲/۵۱۱	۲/۵۳۸	۲/۵۲۴	$1/569 \times 10^{-1}$	۸/۰۴۳
۹	۱/۲۱۵	۱/۱۹۹	۱/۲۰۷	$6/865 \times 10^{-1}$	۱/۶۳۳

۷-۱- تاثیر عوامل مختلف بر فرآیند استخراج

پاسخ هر آزمایش با استفاده از معادله ۱ به نسبت S/N تبدیل شده است. میزان و نحوه تاثیر عوامل مختلف بر پاسخ تبدیل یافته سیستم (به صورت نسبت S/N) برای هر یک از عوامل تحلیل شده و نسبت S/N به دست آمده در هر سطح در جدول ۴ نشان داده شده است. افزایش نسبت S/N نشان دهنده بهتر شدن شرایط است. در جدول ۴ بیشترین مقدار S/N، شرایط بهینه را در بین سطوح مختلف هر عامل نشان خواهد داد.

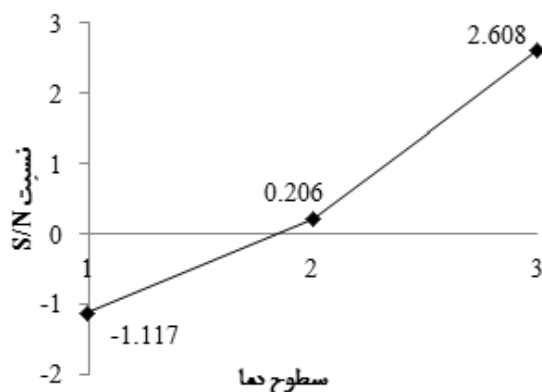
جدول ۴. نسبت‌های S/N اصلی برای هر سطح از پارامترها.

متغیر	نسبت S/N اصلی		
	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
دما (°C)	-۱/۱۱۷	۰/۲۰۶	۲/۶۰۸
دبی جریان (mL/min)	-۱/۴۹۴	۱/۶۱۶	۱/۵۷۵
متوسط اندازه ذرات (mm)	۴/۶۹۸	-۱/۴۳۱	-۱/۵۷

۷-۱-۱- تاثیر دما

دما، عامل کلیدی است که بر بازده و انتخاب پذیری استخراج در SWE تاثیر می‌گذارد. دما می‌تواند خواص فیزیکی و شیمیایی آب را بطور قابل ملاحظه‌ای تحت تاثیر قرار دهد. باید توجه شود که افزایش دمای استخراج به بالاتر از مقدار خاصی امکان تخریب ترکیبات اسانس را به همراه دارد و بیشترین دمای استخراج برای گیاهان مختلف با آزمایش بدست می‌آید [۱۹،۲۰]. اثر دمای استخراج معمولاً بین ۱۸۰-۱۰۰ درجه سلسیوس امتحان شده است. به منظور به دست آوردن بهترین دما برای استخراج اسانس زنیان سه دمای ۱۰۰، ۱۵۰ و ۱۷۵ درجه سلسیوس مطالعه شد.

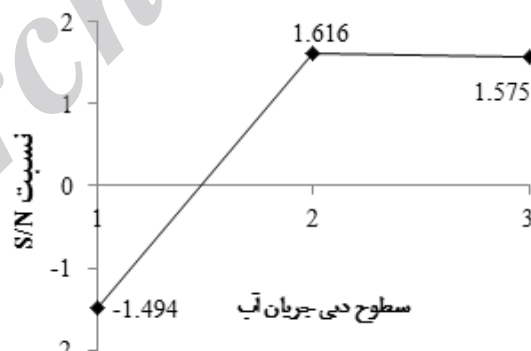
نتایج تحلیل تاگوچی نشان داد که دمای ۱۷۵ درجه سلسیوس در محدوده دمای بهینه قرار دارد. در شکل ۲ نسبت S/N برای سطوح مختلف دما نمایش داده شده است. همانطور که مشخص است افزایش دما تا ۱۷۵ درجه سلسیوس موجب افزایش نسبت S/N شده است. دلیل آن می‌تواند مربوط به تغییرات فیزیکی آب با افزایش دما مانند کاهش ثابت دی‌الکتریک، ویسکوزیته، دانسیته و کشش سطحی باشد، که در نتیجه قابلیت استخراج ترکیبات کمتر قطبی اسانس‌ها را با آب افزایش می‌دهد [۲].



شکل ۲. نمودار نسبت S/N برای سطوح مختلف دما:
(۱) ۱۰۰ °C، (۲) ۱۵۰ °C، (۳) ۱۷۵ °C.

۷-۱-۲- تأثیر دبی جریان

همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود با افزایش دبی جریان آب نسبت S/N افزایش می‌یابد و با تغییر از سطح ۲ (۲ میلی‌لیتر بر دقیقه) به سطح ۳ (۴ میلی‌لیتر بر دقیقه) کاهش نه چندان چشم‌گیری در میزان نسبت S/N مشاهده می‌گردد. بنابراین بیشترین میزان نسبت S/N مربوط به دبی جریان ۲ میلی‌لیتر بر دقیقه است. به نظر می‌آید که انتقال جرم ترکیب تیمول از سطح فاز جامد به فاز آب، بیشتر فرآیند استخراج را کنترل می‌کند. افزایش دبی جریان تا ۲ میلی‌لیتر بر دقیقه منجر به افزایش سرعت سطحی و انتقال جرم بیشتر می‌شود [۲۱]. در سرعت‌های بیش از ۲ میلی‌لیتر بر دقیقه نیز ممکن است به دلیل کاهش زمان اقامت حلال در بستر بازده استخراج تغییری نکرده و یا کمی کمتر شود.



شکل ۳. نمودار نسبت S/N برای سطوح مختلف دبی جریان آب: (۱) ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، (۲) ۲ میلی‌لیتر بر دقیقه، (۳) ۴ میلی‌لیتر بر دقیقه

از تحقیقات قبلی نیز بر می‌آید که هر چه دبی جریان کمتر باشد، استخراج کندتر و زمان آن طولانی‌تر و عصاره‌ی بدست آمده غلیظ‌تر است. از طرف دیگر هر چه دبی جریان بیشتر باشد، استخراج سریع‌تر و در زمان کوتاه‌تری انجام می‌شود ولی عصاره بدست آمده رقیق‌تر است و مراحل بعدی جداسازی از نظر زمان و هزینه حلال آلی طولانی و سخت می‌شود [۱۱، ۱۶].

در عمل باید بهترین دبی جریان با در نظر گرفتن دو نکته مهم زمان استخراج و غلظت عصاره‌ی نهایی انتخاب شود. بدیهی است که زمان استخراج کمتر و عصاره غلیظ‌تر مطلوب‌تر خواهد بود [۲۲].

۳-۱-۷- تاثیر توزیع اندازه ذرات

در شکل ۴ نسبت S/N برای سطوح مختلف اندازه ذرات نمایش داده شده است. همان طور که در شکل ۴ دیده می‌شود بیشترین میزان بازده مربوط به اندازه ذرات ۰/۲۵ میلی‌متر است. همچنین دیده می‌شود اثر عمده‌ی اندازه ذرات ۰/۵ و ۱ میلی‌متر نسبتاً نزدیک به هم است و این نشان می‌دهد که در دامنه ۰/۵-۱ میلی‌متر، انتقال جرم ترکیبات تا سطح ذرات کنترل‌کننده‌ی استخراج نیست.

بررسی مقالات علمی نشان می‌دهد که با کاهش اندازه ذرات مساحت سطح در واحد جرم بین ذره و حلال افزایش می‌یابد، بنابراین، مقدار استخراج بیشتر می‌شود ولی با این کار امکان تبخیر ترکیبات فرار در طول فرآیند خردکردن نیز وجود دارد و فیلتر کردن گیاه از جریان نیز سخت‌تر می‌شود. همچنین ذرات خیلی کوچک، فضاهای حجمی خیلی کوچکی را در شبکه نمونه تولید می‌کنند که مقاومتی برای جریان سیال درون استخراج‌کننده می‌باشند. از طرف دیگر هر چه اندازه ذرات بزرگ‌تر باشد، دیواره‌های سلولی کمتر آسیب می‌بینند. نفوذ حلال و محصول استخراج کاهش می‌یابد، فرآیند انتقال جرم توسط انتقال ترکیبات به سطح کنترل می‌شود و مقدار استخراج اساساً کمتر می‌شود [۱۱، ۱۲].



شکل ۴. نمودار نسبت S/N برای سطوح مختلف اندازه ذرات:
(۱) ۰/۲۵ mm ، (۲) ۰/۵ mm ، (۳) ۱/۰ mm

۷-۲- تحلیل واریانس نتایج

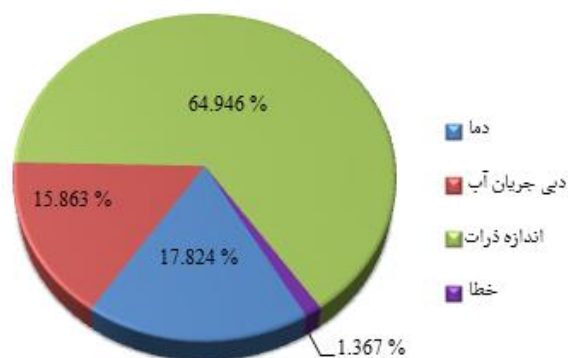
در این مرحله داده‌ها توسط جدول ANOVA^۱ تحلیل آماری گردیدند. هدف از تحلیل ANOVA به دست آوردن نسبت واریانس هر فاکتور به واریانس کل است [۲۳]. جدول ۵ تحلیل واریانس ANOVA نتایج را نشان می‌دهد. از آنجا که هر سه فاکتور در این تحقیق، سه سطحی در نظر گرفته شده‌اند، میزان درجه آزادی برای مقایسه مقادیر پاسخ در سه سطح از هر فاکتور برابر با دو می‌باشد و درجه آزادی کل برابر است با ۸ (۱-۹)، بنابراین، درجه آزادی برای خطا دو محاسبه شد.

جدول ۵. آنالیز ANOVA برای بازده استخراج تیمول از بذر زنبان با استفاده از استخراج با آب دمای زی‌ر بحرانی.

فاکتور	درجه آزادی (DOF)	مجموع مربعات (SS)	واریانس (V)	نسبت واریانس (F)	مجموع مربعات خالص (SS')	درصد مشارکت (P)
دما	۲	۲۱/۳۹۱	۱۰/۶۹۵	۵۳/۲۱۹	۲۰/۹۸۹	۱۷/۸۲۴
دبی	۲	۱۹/۰۸۳	۹/۵۴۱	۴۷/۴۷۵	۱۸/۶۸۱	۱۵/۸۶۳
اندازه ذرات	۲	۷۶/۸۸۳	۳۸/۴۴۱	۱۹۱/۲۷۴	۷۶/۴۸۱	۶۴/۹۴۶
خطا	۲	۰/۴۰۱	۰/۲۰۰	-	-	۱/۳۶۷
جمع کل	۸	۱۱۷/۷۶۰	-	-	-	۱۰۰

واریانس توسط محاسبه مجموع مربعات هر فاکتور و تقسیم آن بر درجه آزادی به دست می‌آید. نسبت واریانس که عموماً با F نامگذاری می‌شود، برابر با نسبت واریانس مربوط به اثر یک فاکتور و واریانس مربوط به بخش خطا می‌باشد. در بین پارامترهای آماری مختلف در جدول ۵، درصد مشارکت (سهم) هر فاکتور بر پاسخ، مفهوم روشن‌تری دارد. این پارامتر به کمک سایر پارامترهای آماری در این جدول محاسبه شده است و درصد سهم فاکتورهای مختلف بر بازده استخراج تیمول از دانه‌های زنبان در محدوده سطوح در نظر گرفته شده را نشان می‌دهد که همه فاکتورها کم و بیش دارای اهمیت نسبی برای تاثیر بر پاسخ می‌باشند. همان‌طور که مشخص است موثرترین فاکتورها، به ترتیب توزیع اندازه ذرات، دما و دبی جریان آب می‌باشد. سهم هر فاکتور به صورت نمودار دایره‌ای در شکل ۵ نشان داده شده است.

¹ Analysis Of Variance



شکل ۵. سهم پارامترها برای استخراج تیمول از زنیان با استفاده از استخراج با آب دمای زیر بحرانی.

۷-۳- شرایط بهینه نسبی

با توجه به شکل‌های تاثیر فاکتورها و نتایج جدول ANOVA می‌توان شرایط بهینه نسبی برای رسیدن به حداکثر میزان استخراج تیمول از دانه‌های زنیان را نسبت به دو سطح دیگر هر فاکتور به دست آورد. جدول ۶ شرایط بهینه نسبی تعیین شده در روش تاگوچی را نشان می‌دهد. با توجه به مشخصه کیفی "هرچه بزرگتر، بهتر"، شرایط فاکتورها در سطوح انتخاب شده عبارتست از: دما برابر با ۱۷۵ درجه سلسیوس، دبی جریان آب برابر با ۲ میلی‌لیتر بر دقیقه و توزیع اندازه ذرات برابر با ۰/۲۵ میلی‌متر.

جدول ۶ شرایط بهینه برای دستیابی به حداکثر میزان استخراج تیمول از زنیان با استفاده از استخراج با آب دمای زیر بحرانی.

نسبت S/N	مقدار بهینه محاسبه شده	پارامترهای مطالعه شده
۲/۰۴۲	۱۷۵	دما (°C)
۱/۰۵۰	۲	دبی جریان (mL/min)
۴/۱۳۲	۰/۲۵	متوسط اندازه ذرات (mm)
۷/۲۲۴	-	سهم کل عوامل در بهبود پاسخ
۰/۵۶۶	-	متوسط پاسخ‌های فعلی در آزمایش‌های انجام شده
۷/۷۹۰	-	پاسخ پیش بینی شده در شرایط بهینه (S/N)

هم چنین در جدول ۶ میزان سهم مقدار بهینه هر یک از فاکتورها در بهبود پاسخ تبدیل یافته (S/N) در ستون آخر نشان داده شده است. هنگامی که از نسبت S/N استفاده می‌شود، نتایج بدست آمده برای برآورد شرایط بهینه را باید به واحدهای

اولیه تبدیل کرد. در این کار، نتیجه مطلوب در حالت استفاده از S/N برابر با ۷/۷۹۰ می‌باشد که با توجه به معادله ۱ مقدار میانگین $Y_{exp}=2,452(./w)$ محاسبه می‌شود. از طریق مقایسه شرایط بهینه پیش بینی شده با جداول ۲ و ۳، مشاهده می‌شود که آزمایش ۸ با $Y_{exp}=2/524(./w)$ مقدار مطلوب خواهد بود که اختلاف ۲/۹ درصدی با شرایط بهینه پیش‌بینی شده دارد.

۸- نتیجه‌گیری

امروزه در صنعت بر روش‌هایی تاکید می‌شود که اسانس‌های با کیفیت بهتر را با کم‌ترین مقدار استفاده‌ی حلال آلی تولید می‌کنند و یا به طور کلی از حلال‌های آلی در آن‌ها استفاده نمی‌شود. شیوه‌های استفاده شده تا کنون، آشکارا کند، تهدیدکننده محیط زیست و نامناسب برای ترکیبات ناپایدار در برابر حرارت و ترکیبات فرار هستند. در بین شیوه‌های جدید استخراج با آب دمای زیر بحرانی می‌تواند روش مؤثری در تهیه مواد معطر گیاهی باشد به گونه‌ای که ترپن‌ها را به مقدار کم استخراج نموده و هیدروکربن‌های سنگین‌تر را استخراج نمی‌نماید.

با توجه به آزمایش‌های طراحی شده با روش تاگوچی در محدوده سطوح انتخاب شده در این تحقیق، هر سه فاکتور در استخراج تیمول از دانه‌های زنیان با استفاده از روش استخراج با آب دمای زیر بحرانی مهم بوده و ترتیب اولویت در تاثیرگذاری آن‌ها به صورت: توزیع اندازه ذرات، دما و دبی جریان آب می‌باشد. نتایج بهینه سازی به روش تاگوچی نشان داد که سطوح مناسب برای هر یک از فاکتورها در دمای استخراج 175°C ، توزیع اندازه ذرات 0.25 mm و دبی جریان آب برابر با 2 ml/min می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه سمنان، به خاطر حمایت‌های مالی و معنوی برای ساخت دستگاه استخراج با روش حلال‌های زیر دمای بحرانی که این آزمایش‌ها توسط آن انجام شده سپاس‌گزاری نمایند.

۹- مراجع

- [1] A. Mustafa and C. Turner, *Anal. Chim. Acta.*, **703** (2011) 8.
- [2] C. C. Teo, S. N. Tan, J. W. H. Yong, C. S. Hew and E. S. Ong, *J. Chromatogr. A.*, **1217** (2010) 2484.
- [3] W. J. Kim, B. Veriansyah, Y. W. Lee, J. Kim and J. D. Kim, *J. Ind. Eng. Chem.*, **16** (2010) 425.
- [4] E. Ong, J. S. H. Cheong and D. Goh, *J. Chromatogr. A.*, **1112** (2006) 92.

[۵] خواجه نوری، مریم؛ بدرخانی، ندا؛ حقیقی اصل، علی؛ مجله علمی ترویجی مهندسی شیمی ایران، شماره ۷۰ (۱۳۹۲) ص

۸۴

- [6] J. W. King and R. D Grabiell, US Patent 7,208,181, B1, (2007).
- [7] M. Moazeni, M. J. Saharkhizb and A. A. Hosseini, *Vet. Parasitol.*, **187** (2012) 203.
- [8] M. Mahboubi and N. Kazempour, *Iran. J. Microbiol.*, **3** (4) (2011) 194.
- [9] N. Badrkhani, M. Khajenoori, A. Haghghi Asl, *J. Applied Chemistry*, **7(25)** (2013) 51.
- [10] M. Khajenoori, A. Haghghi Asl and M.H. Eikani, *Essential oil Bearing Plants, TEOP*, **18** (5) (2015) 1165.
- [11] M. H. Eikani, F. Golmohammad and S. Rowshanzamir, *J. Food Eng.*, **80** (2007) 735.
- [12] M. H. Eikani, F. Golmohammad, M. Mirza and S. Rowshanzamir, *J. Food Process Eng.*, **30** (2007) 255.
- [13] C. H. Deng, N. Li and X. M. Zhang, *J. Chromatogr. A.*, **1059** (2004) 149.
- [14] C. H. Deng, N. Yao, A. Q. Wang and X. M. Zhang, *Anal. Chim. Acta.*, **536** (2005) 237.
- [15] C. H. Deng, A.Q. Wang, S. Shen, D. X. Fu, J. K. Chen and X. M. Zhang, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **38** (2005) 326.
- [16] M. Khajenoori, A. Haghghi Asl, F. Hormozi, M. H. Eikani and H. Noori Bidgoli, *J. Food Process Eng.*, **32** (2009) 804.
- [۱۷] بهرامی، امیر؛ نظری، ساناز؛ برزگر، شهرام، مجله اندیشه علوم-شیمی کاربردی، شماره ۲۱ (۱۳۹۰) ص ۷۳.
- [18] M. Khajenoori, A. Haghghi Asl, and M.H. Eikani, *Essential oil Bearing Plants*, **18** (6) (2015) 1310.
- [19] M. Khajenoori, A. Haghghi Asl and H. Noori Bidgoli, *International Journal of Engineering (IJE) Transactions B: Applications*. **26(5)** (2013) 489.
- [20] E. Spinnel, C. Danielsson and P. Haglund, *Anal. Bioanal. Chem.*, **390** (2008) 411.
- [21] S. J. Jahren, J. A. Rintala and H. Odegaard, *Water Res.*, **36** (2002) 1067.
- [۲۲] خواجه نوری، مریم؛ حقیقی اصل، علی؛ مجله علمی پژوهشی علوم و فنآوری‌های نوین غذایی، شماره ۱ (۱۳۹۲) ص ۳.