

استخراج و اندازه گیری مقدار پیرترین های گیاه پیرتروم کشت شده در ایران

فاطمه نظری^{۱*}، مسعود کمبرانی^۲

۱- عضو هیات علمی جهاددانشگاهی واحد شهید بهشتی

۲- عضو هیات علمی جهاددانشگاهی واحد تهران

*آدرس مکاتبه: تهران، اوین، دانشگاه شهید بهشتی، جهاددانشگاهی واحد شهید بهشتی

صندوق پستی: ۱۱۷۱ - ۱۹۶۱۵، تلفن: ۳۵-۲۲۴۳۱۹۳۳ (۰۲۱)، نمابر: ۲۲۴۳۱۹۳۸ (۰۲۱)

پست الکترونیک: ftnazari@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸۶/۷/۱۱

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۲/۹

چکیده

مقدمه: گیاه پیرتروم گیاهی پایا با نام علمی *Chrysanthemum cinerariaefolium*. یکی از بهترین و کارآمدترین حشره کش های طبیعی است که برای انسان و حیوانات خونگرم سمیتی ندارد. ولی بسیاری از حشرات و حیوانات خونسرد را سریعاً از بین می برد.

هدف: در این بررسی ماده موثره گیاه پیرتروم که در مزرعه کرج توسط گروه کشاورزی جهاددانشگاهی واحد تهران کشت شده بود، استخراج و آنالیز شد.

روش بررسی: گل های خشک شده گیاه پیرتروم را کاملاً پودر نموده با حلال های آلی نظیر کلروفرم، هگزان و استونیتریل عصاره گیری کرده سپس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ماوراءبنفش و دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا آنالیز گردیده و درصد ماده موثره براساس وزن گل های خشک شده گیاه محاسبه شد.

نتایج: نتایج بررسی نشان داد که:

۱- از هر دو روش HPLC و اسپکتروفتومتری برای تعیین مقدار کل پیرترین ها می توان استفاده نمود.

۲- راندمان استخراج ۱/۶ درصد بود که نسبت به نمونه های خارجی در حد قابل قبولی است.

نتیجه گیری: با توجه به راندمان به دست آمده کشت گیاه پیرتروم در ایران دارای ارزش اقتصادی بالایی خواهد بود.

گل واژگان: پیرترین ها، پیرتروم، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، اسپکتروفتومتری



مقدمه

در اکثر کشورهای جهان یکی از مسائل بسیار مهم، کنترل حشرات در منازل و باغها است. حیوانات موذی سالیانه میلیونها ریال خسارت به مواد غذایی موجود در انبارها و منازل می‌رسانند و از این رو مسئولین امور دائماً سعی می‌نمایند به صورت‌های گوناگون حشرات مضر را از بین ببرند و از وارد شدن خسارات به گیاهان، منابع طبیعی و سلامت انسان جلوگیری نمایند.

در همین راستا استفاده از حشره‌کش‌های آلی گیاهی در منازل و باغچه‌ها توصیه می‌گردد. یکی از بهترین و کارآمدترین حشره‌کش‌های طبیعی گل‌های گیاه پیرتروم است که به طور گسترده در تهیه حشره‌کش‌ها استفاده می‌شود [۳، ۴]. رطوبت و اکسیژن تأثیری بر تجزیه پیرترین‌های طبیعی ندارند ولی هنگامی که پیرترین‌ها در معرض نور، گرما، میکروارگانیسم‌ها قرار می‌گیرند سریعاً تجزیه می‌شوند و به همین دلیل اثرات سوء زیست محیطی ندارند [۵، ۶، ۷].

گیاه پیرتروم یکی از قدیمی‌ترین گیاهان مورد استفاده بشر بوده، حدود چهارصد سال قبل از میلاد مردم ایران خواص حشره‌کشی آن را می‌دانستند و از آن برای از بین بردن برخی از حشرات استفاده می‌کردند. تا آنجا که از شواهد تاریخی بر می‌آید بذر این گیاه از ایران به سایر کشورها برده شده و از سال ۱۸۲۰ تا ۱۸۴۰ در اروپای جنوبی و مرکزی در مقیاس وسیعی کشت می‌شده است و به عنوان حشره‌کش ایرانی به صورت پودر یا محلول استفاده می‌گردیده است.

از سال ۱۸۴۰ گونه پیرتروم دالماسی که دارای ماده موثره بیشتری است جانشین گونه ایرانی شد و در مدت خیلی کوتاهی، اکثر کشورها به طور وسیعی اقدام به کشت گیاه جدید نمودند [۸]. امروزه کشورهای آفریقایی مخصوصاً کنیا و تانزانیا از مهم‌ترین تولیدکنندگان گل و عصاره پیرتروم هستند. ماده موثره گل‌های پیرتروم که خاصیت حشره‌کشی دارد شش نوع استر به نام‌های پیرترین I و II، سینرین I و II و جاسمولین I و II است که به مجموع این‌ها پیرترین می‌گویند [۹]. درصد پیرترین موجود در گل‌های پیرتروم از ۰/۵ تا ۲ درصد گزارش شده است [۱۰].

Wandahwa و همکاران در زمینه نیازهای اکولوژیکی، شرایط

کشت و کاربرد پیرتروم در کنیا تحقیقاتی انجام داده و با توجه به این که حشره‌کش‌های سنتزی سبب آلودگی محیط زیست می‌شود تقاضای تولید و کاربرد پیرتروم رو به افزایش است آن‌ها پیشنهاد پژوهش‌های بیشتری در مورد شرایط کشت، داشت و برداشت گیاه برای تولید محصولات با کیفیت بالا را نمودند [۱۱].

Kiriamiti و همکاران طی تحقیقی بر روی استخراج پیرترین از گل‌های پیرتروم توسط دی‌اکسیدکربن دریافتند عصاره حاصل از این روش شباهت زیادی به عصاره هگزانی توسط سوکسله دارد با این تفاوت که میزان رنگدانه‌ها و نسبت پیرترین I به پیرترین II در این روش کاهش یافته است [۱۲].

Wang و همکاران به کمک کروماتوگرافی مایع کارآیی بالا با فاز معکوس توانستند شش استر پیرترین با بهینه نمودن شرایط نظیر فاز متحرک، دما و با استفاده از ستون (C-8 Octyl) و اندازه ذرات ۵ میکرون جداسازی نمایند. در ضمن آنالیز کمی در طول موج ۲۳۰ و ۲۴۰ نانومتر با دتکتور (diode array) انجام شد [۱۳].

Caboni و همکاران طی تحقیقی در مورد باقی‌مانده پیرترین روی گندم الجزایری پس از برداشت دریافتند مقدار پیرترین‌ها تا ۲۲ روز ثابت مانده ولی پس از هشت ماه به طور کامل تجزیه می‌شود آن‌ها پس از انجام دو سری آزمایش براساس مقدار پیشنهادی شرکت سازنده و دو برابر آن مشاهده نمودند نیمه عمر مقدار پیشنهادی برای پیرترین I و II به ترتیب ۴۶ و ۷۲ روز است اما برای دو برابر مقدار نیمه عمری به ۴۱ و ۵۳ روز کاهش یافت [۱۴].

در این پژوهش که ادامه تحقیقات قبلی جهاددانشگاهی در مورد گیاه پیرتروم است مواد موثره گیاه کشت شده در کرج توسط روش اسپکتروفتومتری و HPLC تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

مواد

گل‌های گیاهی پیرتروم که توسط گروه کشاورزی جهاددانشگاهی تهران در مزرعه تحقیقاتی کرج کشت شده بود



عصاره‌گیری

۰/۲ گرم از گل‌های آسیاب شده با مش ۴۰ را در ارلن مایر ۵۰ میلی‌لیتری درب دار ریخته ۱۰ میلی‌لیتر حلال به آن افزوده به مدت یک ساعت آن را روی شیکر قرار داده سپس محلول را توسط کاغذ صافی واتمن صاف نموده عمل استخراج را طی دو مرحله دیگر انجام داده در هر مرحله ۱۰ میلی‌لیتر حلال روی تفاله‌های باقیمانده ریخته و آن را به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار داده سپس صاف نموده، عصاره‌های حاصل از مراحل مختلف را روی هم ریخته و حلال آن را تبخیر کرده عصاره باقیمانده در شیشه‌های کدر و در فریزر جهت آنالیز نگهداری شد.

در این مرحله از حلال‌های کلروفرم مرک، هگزان مرک، استونیتریل مرک، کلروفرم صنعتی و هگزان صنعتی استفاده گردید (جدول شماره ۱).

پس از انجام آنالیز و مشخص شدن اثر حلال‌های فوق در استخراج، در این مرحله عصاره‌گیری توسط حلال کلروفرم ولی در زمان‌های ۲ ساعت، ۸ ساعت، ۲۴ ساعت و ۳ روز صورت گرفته و اثر زمان نیز بررسی شد (جدول شماره ۲).

اندازه‌گیری پیرترین به روش اسپکتروفتومتری

ابتدا غلظت‌های ۲، ۴ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پیرترین

جهت عصاره‌گیری و آنالیز به آزمایشگاه شیمی جهاددانشگاهی شهید بهشتی منتقل گردید و تا زمان تهیه استاندارد و حلال‌های مورد نیاز نمونه‌ها در فریزر نگهداری شد. پس از آماده شدن شرایط استخراج و آنالیز، گل‌ها را توسط آسیاب پودر نموده سپس از الک مش ۴۰ عبور داده آن‌گاه از پودر حاصل برای عصاره‌گیری استفاده گردید.

استاندارد پیرترین از شرکت Sigma - Aldrich، کلروفرم، هگزان و استونیتریل از شرکت Merck و اتانول مطلق داخلی از شرکت بیدستان، کلروفرم صنعتی از پتروشیمی تهیه شدند.

دستگاه‌ها

۱- دستگاه اسپکتروفتومتر UV با دکتور Diode Array

مدل S 2000 ساخت شرکت WPA انگلستان

۲- سیستم HPLC مدل ۲۱۵۲ ساخت شرکت LKB

سوئد، پمپ‌ها مدل ۲۱۵۰، آشکارساز UV-VIS مدل ۲۱۵۱ و سیستم پردازش داده‌ها مدل ۲۲۲۱ و هم‌چنین ستون Spherisorb S 50 D 52 (LKB) با طول ۲۵۰ میلی‌متر، قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و اندازه ذرات ۵ μm

۳- روتاری مدل EL131 ساخت شرکت BUCH سوئیس

۴- ترازو با حساسیت ۵-۱۰ گرم مدل AC1205 ساخت

شرکت سارتریوس آلمان

جدول شماره ۱ - بررسی اثر نوع حلال بر میزان پیرترین

حلال‌ها	درصد پیرترین
کلروفرم مرک	۱/۱۵
هگزان مرک	۰/۹۵
استونیتریل مرک	۰/۸۶
کلروفرم صنعتی	۰/۸۵
هگزان صنعتی	۰/۵

جدول شماره ۲ - بررسی اثر مدت زمان استخراج بر میزان پیرترین

حلال	زمان			
	۲ ساعت	۸ ساعت	۲۴ ساعت	۳ روز
هگزان	۰/۹۵	۰/۹۶	۰/۹۶	۰/۹۸
کلروفرم	۱/۱۵	۱/۱۷	۱/۱۶	۱/۱۸



۱/۴ میلی‌لیتر در دقیقه، طول موج ۲۲۵ نانومتر و حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر جداسازی صورت گرفت.

روش محاسبه میزان پیرترین

ابتدا محلول‌های استاندارد تهیه شده با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر را به دستگاه تزریق نموده و با استفاده از سطح زیر منحنی به دست آمده برای غلظت‌های فوق‌الذکر منحنی کالیبراسیون سطح بر غلظت برای پیرترین I و II، جاسمولین I و II و پیرترین کل توسط نرم‌افزار Excel 2000 ترسیم گردید و معادله خط رگرسیون به دست آمد (شکل شماره ۲).

نتایج

معادله خط رگرسیون مربوط به منحنی کالیبراسیون عبارت است از:

$$Y=2E-07x-4.5257$$

با توجه به آن غلظت مواد موثره موجود در عصاره محاسبه گردید و مقدار کل پیرترین‌ها در گیاه ۱/۶ درصد به دست آمد. (جدول شماره ۳).

استاندارد در اتانول تهیه گردید. عصاره‌های استخراج شده را در اتانول حل نموده پس از رقیق‌سازی، جذب نوری استانداردها و عصاره‌ها در طول موج ۲۲۸ نانومتر اندازه‌گیری شد و از طریق رسم منحنی رگرسیون مقدار پیرترین در عصاره‌ها برحسب درصد وزن خشک گیاه محاسبه گردید (شکل شماره ۱).

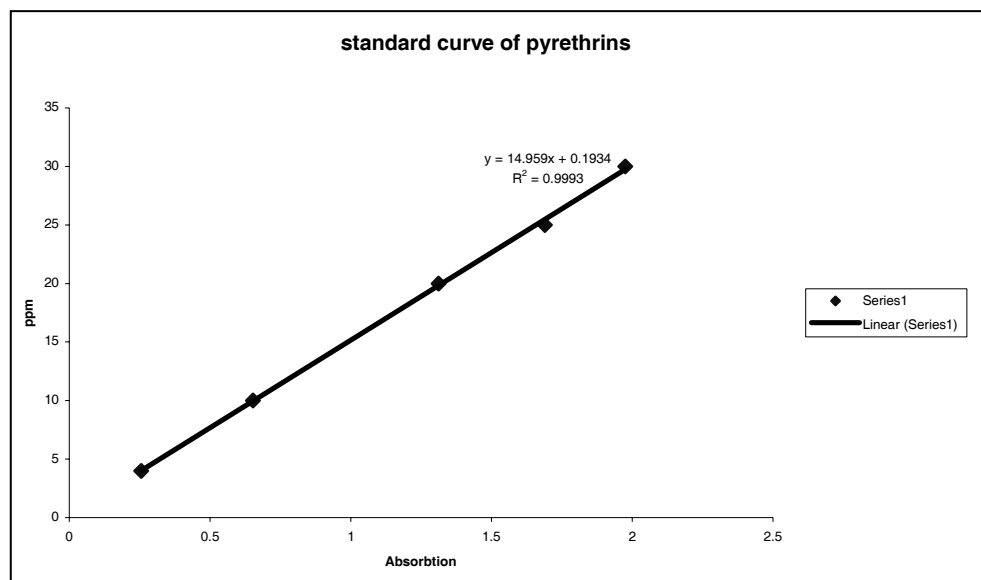
اندازه‌گیری پیرترین به روش کروماتوگرافی مایع

جهت بررسی دقیق‌تر و تعیین کمی اجزا پیرترین‌ها نمونه استخراج شده در شرایط ایتیم با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نیز آنالیز گردید [۱۵].

فاز متحرک استونیتریل و آب به نسبت (۶۰:۴۰) و با فلوی ۱/۴ میلی‌لیتر در دقیقه، طول موج ۲۲۵ نانومتر و حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر بود. ابتدا محلول‌های استاندارد تهیه شده با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر را به دستگاه تزریق نموده به ترتیب پیرترین II در زمان بازداری ۵/۳، جاسمولین II در ۶/۴۱، پیرترین I در ۹/۴ و جاسمولین I در ۱۰/۳۷ دقیقه خارج شده‌اند.

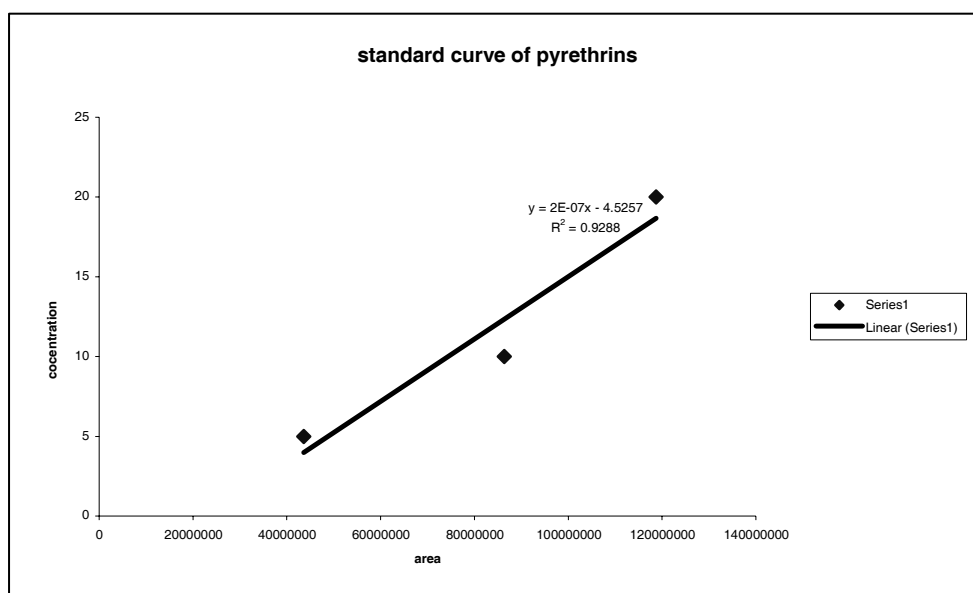
شرایط HPLC

فاز متحرک استونیتریل و آب به نسبت (۶۰:۴۰) و با فلوی



شکل شماره ۱- منحنی استاندارد پیرترین مربوط به روش اسپکتروفتومتری





شکل شماره ۲ - منحنی استاندارد کل پیرترین‌ها و فرمول آن مربوط به روش HPLC

جدول شماره ۳ - درصد مواد موثره وجود در نمونه

درصد	مواد موثره
۰/۸۸	پیرترین I
۰/۶۹	پیرترین II
۰/۰۴۵	جاسمولین I
۰/۰۱	جاسمولین II
۱/۶	کل پیرترین‌ها

و زمان ۲ ساعت بهترین راندمان را دارد. عصاره تهیه شده در شرایط فوق توسط هر دو روش اسپکتروفتومتری و HPLC آنالیز گردید. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که از هر دو روش برای تعیین میزان کل پیرترین‌ها می‌توان استفاده نمود ولی جهت تعیین میزان تک تک اجزا روش HPLC دقیق‌تر است.

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت با توجه به راندمان استخراج کشت گیاه پیرتروم در ایران دارای ارزش اقتصادی خواهد بود.

بحث

جهت استخراج ترکیبات موجود در گیاهان روش‌های گوناگونی وجود دارد. در این تحقیق با توجه به حساس بودن ماده موثره گیاه پیرتروم به حرارت و نور از روش خیساندن^۱ استفاده شد و از طرفی در این فرآیند نیاز به دستگاه‌ها و ابزارهای پیچیده نیست و به راحتی می‌توان آن را در مقیاس پایلوت و صنعتی انجام داد.

دو فاکتور موثر در این روش، نوع حلال و زمان استخراج است با بررسی هر دو مورد مشخص گردید که حلال کلروفرم

^۱ Maceration

منابع

1. Zargari A. Medicinal Plants, Tehran University Publications. 1375, 3: pp: 131 - 9.

2. Farooqi AHA, et al., Effect of plant growth regulators on flowering behavior of pyrethrum in



- north Indian plains. *Journal of medicinal and aromatic plant sciences*, 1999; 21: 681 - 5.
3. Baghdians A, Sanaee G. Insecticides and Their Applications in Health Programs, Tehran University Publications. 1349, pp: 76 - 81.
 4. Wainaina; Pyrethrum flowers, production in Africa. In: Casida J. and Quistad G., Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology and uses, Oxford University Press, New York. 1995, pp: 49 - 54.
 5. Otieno D, Patternden G. Degradation of the natural pyrethrins, *Pyrethrum Post*, 1979; 15: 30 - 7.
 6. Bonnie L, et al., The degradation of natural pyrethrins in crop storage, *J. Agric Food Chem.* 2004; 52: 280 - 7.
 7. Antonious G, et al. Residue levels of pyrethrins and piperonyl butoxide in soil and runoff water, *J. Environ. Sci. Health, Part B: Pestic. Food Contam. Agric. Wastes*, 1997; 32: 621 - 44.
 8. Casida J, Quistad G. Pyrethrum a benefit to human welfare, In Pyrethrum Flowers, Production, Chemistry, Toxicology and Uses, Oxford University Press, New York. 1995, pp: 345 - 50.
 9. Head W. A study of the insecticidal constituents in *Chrysanthemum cinerariaefolium*, *Pyrethrum Post*, 1966; 8: 32 - 7.
 10. Winney R. Performance of pyrethroids as domestic insecticides, *Pyrethrum Post*, 1979; 13: 132 - 6.
 11. Wandawa P. Pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis) cultivation in West Kenya: Origin, ecological conditions and management, *Industrial Crops and Products*, 1996; 5: 307 - 22.
 12. Kirihamiti H, et al., Pyrethrin extraction from Pyrethrum flowers using carbon dioxide, *J. Super critical Fluids*, 2003; 26: 193 - 200.
 13. Wang I, et al.; Direct determination of Pyrethrins in Pyrethrum extracts by reversed - phase high - performance liquid chromatography with diode - array detection, *J. Chromatogr. A.* 1997; 766: 277 - 81.
 14. Caboni P, et al. Degradation of Pyrethrin residues on stored durum Wheat after post harvest treatment, *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 832- 5.
 15. Essig K, Zhouming Z. Method Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatographic Method for Pyrethrum Extract. *Journal of Chromatographic Science*, 2001; 39: 473 - 80.

